

## Caracterização do potencial de promoção de crescimento vegetal por *Penicillium citrinum*

### Characterization of the plant growth promotion potential of *Penicillium citrinum*

Eduardo Aguiar Barros Oliveira<sup>1</sup>, Patricia Dayane Carvalho Schaker<sup>2</sup>

#### RESUMO

*Penicillium citrinum* é um fungo endofítico com potencial de auxiliar no desenvolvimento de plantas, sendo capazes de promover uma maior tolerância a sais, escassez hídrica, altas temperaturas, podendo ser um novo viés para o desenvolvimento sustentável do agronegócio. Em vista disso, o presente trabalho caracterizou a linhagem de *P. citrinum* MO2, pertencente ao banco de linhagens da UTFPR-Toledo, em relação a sua capacidade de solubilizar fosfato, produzir de auxina e orgânicos voláteis (COVs). Inicialmente o fungo isolado teve seu DNA extraído e a região ITS utilizada para confirmação da sua identidade. A linhagem apresentou capacidade de produção de auxina, com valores de 67,52 e 82,42 µg/mL, em meio não suplementado e suplementado com triptofano, respectivamente; bem como foi capaz de solubilizar fosfato. A produção de COVs gerou um incremento de 69% no tamanho da raiz de agrião. Desse modo o *Penicillium citrinum* apresentou boas respostas para desenvolvimento vegetal sendo uma alternativa promissora para a diversificação do mercado de bioinoculantes.

**PALAVRAS-CHAVE:** COVs, bioinoculantes, fungos promotores de crescimento vegetal, bioinsumos

#### ABSTRACT

*Penicillium citrinum* is an endophytic fungus with the potential to assist in plant development, promoting greater tolerance to salts, water scarcity, high temperatures, which could be a new approach for the sustainable development of agribusiness. In view of this, the present work characterized the *P. citrinum* MO2 strain, belonging to the UTFPR-Toledo strain bank, in relation to its ability to solubilize phosphate, produce auxin and synthesize volatile organic compounds (VOCs). Initially, the isolated fungus had its DNA extracted and the ITS region was used to confirm its identity. The strain showed auxin production capacity, with values of 67,52 e 82,42 µg/mL, in non-supplemented and tryptophan-supplemented medium, respectively; as well as being able to solubilize phosphate. The production of VOCs generated a 69% increase in the size of the watercress root. Thus, *Penicillium citrinum* presented good responses for plant development, being a promising alternative for the diversification of the bioinoculants market.

**KEYWORDS:** VOCs, bioinoculants, plant growth-promoting fungi, bio-inputs.

## INTRODUÇÃO

Um possível substituto para os insumos químicos no agronegócio são os fungos endofíticos que têm despertado grande interesse por parte de pesquisadores, visto que possuem características importantes para o desenvolvimento vegetal. Esses fungos têm ganhado destaque por favorecer a tolerância a altas concentrações de sais, temperaturas elevadas, doenças, escassez hídrica, além de promover o crescimento e auxiliar no aumento de biomassa aérea e subterrâneas. Ainda, atuam melhorando a eficiência fotossintética em plantas que sofrem estresse metabólico, aumentam a eficiência do uso

<sup>1</sup> Bolsista do CNPq. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: eoliveira.2001@alunos.utfpr.edu.br ID Lattes:0344651053655573.

<sup>2</sup> Docente no Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil. E-mail: patriciaschaker@utfpr.edu.br. ID Lattes: 9674682418436293.



de nitrogênio e liberam compostos orgânicos voláteis (COVs) que estimulam o crescimento vegetal (TEJESVI, et al., 2007; REDMAN, et al., 2001, 2002; ARNOLD, et al., 2003; WALLER, et al., 2005; MARQUEZ, et al., 2007.)

Em vista disso, no presente trabalho, realizamos a caracterização de uma linhagem fúngica com potencial de promoção do crescimento vegetal, que faz parte da coleção de microrganismos da UTFPR-TD. A partir do sequenciamento da região ITS o fungo foi descrito como pertencente à espécie *Penicillium citrinum*, o qual tem grande recorrência em cereais, como trigo, soja e tem sido alvo de estudo para desenvolvimento de bioinoculantes devido a produção de diversos metabólitos secundários como auxinas, giberelinas e quimiotripsinas (KHAN, et al., 2008; PANDEY, et al., 2008.), sendo potencialmente uma alternativa menos agressiva e tóxica para o desenvolvimento de vegetais. A linhagem de *Penicillium citrinum* do presente trabalho foi estudada em relação à sua capacidade de produção de auxina, solubilização de fosfato, e produção de compostos orgânicos voláteis que auxiliem no desenvolvimento vegetal aéreo e de raízes em experimentos *in vitro*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente a linhagem de fungo, classificada como amostra MO2, pertencente à coleção de microrganismos da UTFPR-TD foi repicada em meio BDA e incubada durante um período de aproximadamente 7 dias a 28°C. Após assegurar a pureza do microrganismo, deu-se prosseguimento a extração de DNA. Para isto, os esporos dos fungos foram recolhidos de placas de Petri usando 100 uL de solução de lise celular, e transferidos para um cadinho previamente esterilizado e macerados utilizando beads de vidro. Em seguida, iniciou-se o procedimento de extração de DNA com o Kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), de acordo com as instruções do fabricante, com modificações.

O material genético extraído foi amplificado com o uso dos primers TS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') ITS4 e (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'), seguido de PCR para amplificação e eletroforese em gel de agarose (1%), purificação e sequenciamento Sanger. As sequências obtidas foram analisadas utilizando o software Bioedit e comparadas com o banco de dados *nr* do NCBI, utilizando a ferramenta BLASTn. O alinhamento das sequências e obtenção do dendrograma foi realizado no software MEGA 4.0, por meio do método Neighbor-Joining tree (NJT), usando 1000 réplicas de Bootstrap.

O potencial de solubilização de fosfato foi verificado utilizando a metodologia de Pikovskaya's, 1948, utilizando o meio de cultivo PVK, a fim de observar a formação de halos de solubilização. Após o período de cultivo, os halos e colônias foram medidos e o índice de solubilização de fosfato calculado segundo a equação 1 (PREMONO, et al., 1996).

$$\text{Índice de solubilização (IS)} = \frac{\text{Diâmetro de halo}}{\text{Diâmetro da colônia}} \quad (1)$$

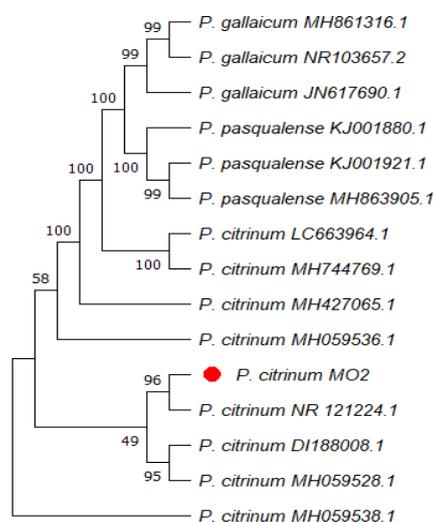
Para quantificação da produção de auxinas, a linhagem de *Penicillium citrinum* foi cultivada em meio líquido YM, suplementado com L-Triptofano na concentração final de 100 mg.L<sup>-1</sup> (teste) ou na ausência de L-Triptofano (Controle). O ensaio foi realizado em triplicata, com o cultivo mantido durante 6 dias a 28°C, a 150 rpm. Para o teste colorimétrico utilizou-se do reagente de Salkowski, utilizando-se a relação 1:1 de amostra livre de células. Após a adição do reagente incubou-se no escuro durante 30 minutos para posterior leitura em espectrofotômetro a 540 nm. As concentrações foram calculadas com base em uma curva padrão de ácido indolacético (0 a 100 µg. mL<sup>-1</sup>) seguindo a mesma metodologia utilizada para as amostras.

A avaliação da produção de VOCs foi feita por meio do uso de placa de Petri subdividida, contendo dois meios diferentes: BDA para cultivo do fungo e MS ajustado Ph 7 para cultivo da planta teste, agrião, permitindo a passagem de gases de um sítio para outro. As sementes de agrião foram desinfectadas superficialmente por meio de etanol 70% (v/v) 1 minuto, hipoclorito 1% (v/v) durante 5 min seguido de 10 lavagens com água estéril a fim de remover qualquer resíduo do protocolo de limpeza. O ensaio foi mantido e observado durante 7 dias no escuro, e as placas foram vedadas com parafilme o qual permite a troca gasosa de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>. Ao final do teste as plântulas foram medidas com o auxílio do software image J, e os dados foram submetidos à análise estatística Anova e Teste de Tukey a 95%.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foi possível obter uma confirmação acerca da identidade do fungo, apresentando 99,81 % de identidade e 100% de cobertura com sequências de *Penicillium citrinum* (Figura 1) depositadas no banco de dados.

Figura 1 - Dendograma indicando o posicionamento da linhagem estudada em relação às demais linhagens de *Penicillium*, utilizando a sequência de ITS.



Fonte: Autoria própria (2023).

O halo de solubilização de fosfato foi perceptível (Figura 2), demonstrando o potencial de solubilização de fosfato pelo isolado, atingindo IS de 1.18. Em relação ao estudo com fungos comparou-se o resultado com outro trabalho com 57 cepas fungos sendo um dos mais promissores citados os *Penicillium italicum* com IS de 3,15, o que demonstra que o gênero *Penicillium* aparenta ser promissor no quesito biodisponibilização de fosfato (GOMEZJURADO, et al., 2012).

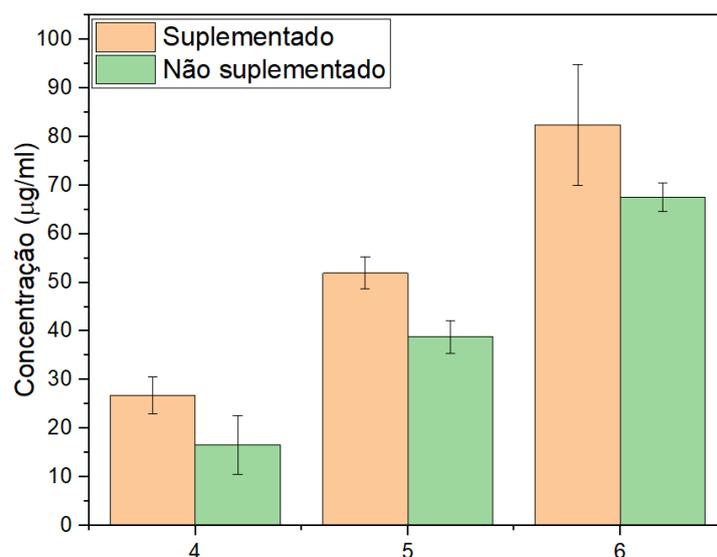
Figura 2 - Demonstração da formação de halo em função da solubilização de fosfato por *Penicillium citrinum* MO2.



Fonte: Autoria própria (2023).

Outro fator importante que foi avaliado foi o nível de produção de AIA ao longo do tempo (Figura 3). Não foi detectada a produção de auxinas até o 3º dia de análise, após esse período iniciou-se a produção do hormônio, com produção de 12,88 e 12,99 µg/mL para o não suplementado e o suplementado, respectivamente, no 4º dia, atingindo os picos máximos no 6º dia, com 67,52 e 82,42 µg/mL. No entanto, não houve diferença significativa entre os tratamentos (p-valor > 0,05).

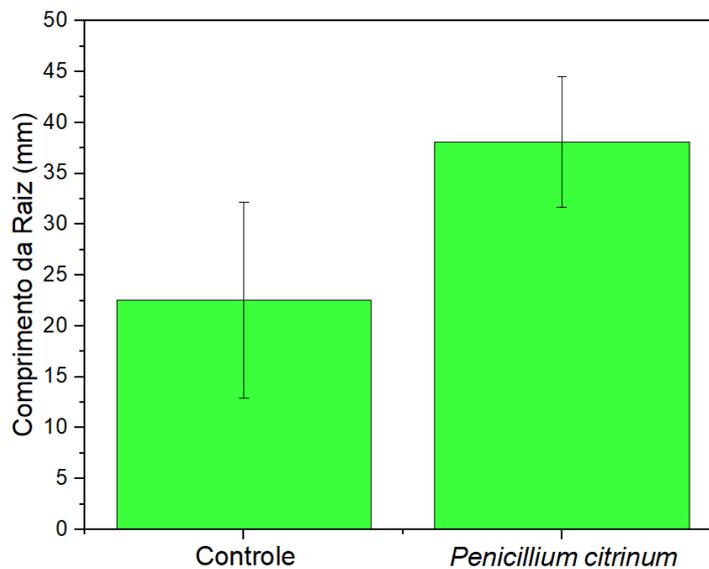
Figura 3 - Produção de AIA pelo fungo *Penicillium citrinum* MO2.



Fonte: Autoria própria (2023).

Em relação à produção de COVs e seu efeito no crescimento vegetal (Figura 4), observamos que no mesmo período de tempo, as plantas expostas a atmosfera gerada pelo crescimento do fungo apresentaram-se mais desenvolvidas que as plantas controle apresentando cerca de 69% de aumento no tamanho das raízes em contato com o fungo (p-valor < 0,05).

Figura 4 - Efeito dos COVs de *Penicillium citrinum* MO2 no crescimento de agrião *in vitro*.



Fonte: Autoria própria (2023).

## Conclusão

A linhagem de *P. citrinum* demonstrou potencial para o desenvolvimento de bioinoculantes, sendo capaz de produzir hormônios vegetais como o ácido indol-3-acético em altas concentrações, solubilizar fosfato e auxiliar indiretamente no desenvolvimento de raiz vegetal por meio da produção de COVs. Ainda, é necessário identificar e quantificar os COVs produzidos e elaborar formulações para a aplicação do microrganismo para garantir sua sobrevivência e atividade no solo.

## Agradecimentos

Agradeço a UTFPR pelo apoio financeiro e estrutura para realização dos experimentos.

## Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

## Referências



ARNOLD, A. Elizabeth; MEJÍA, Luis Carlos; KYLLO, Damond; ROJAS, Enith I.; MAYNARD, Zuleyka; ROBBINS, Nancy; HERRE, Edward Allen. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 100, n. 26, p. 15649-15654, 11 dez. 2003.

GOMEZJURADO, Marco Esteban Gudino *et al.* **Solubilização de fosfato por fungos do solo e eficiência de sua inoculação em caupi e milho**. 2012. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

KHAN, Sumera Afzal *et al.* Plant growth promotion and *Penicillium citrinum*. **Bmc Microbiology**, Paquistão, v. 231, n. 8, p. 543-553, dez. 2008.

Marquez LM, Redman RS, Rodriguez RJ, Roossinck MJ. A virus in a fungus in a plant–three way symbioses required for thermal tolerance. **Science** 2007, v.315, n .26, p.513-515, jan. 2007.

PANDEY, Anita; DAS, Namrata; KUMAR, Bhavesh; RINU, K; TRIVEDI, Pankaj. Phosphate solubilization by *Penicillium* spp. isolated from soil samples of Indian Himalayan region. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, India, v. 1, n. 24, p. 97-102, jun. 2008.

Premono, M. E., Moawad, A., and Vlek, P. Effect of phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere. **Indonesian J. Crop Sci.** v.11, n. 1, p. 13–23, abr. 1996.

Redman RS, Dunigan DD, Rodriguez RJ: Fungal symbiosis: from mutualism to parasitism, who controls the outcome, host or invader? **New Phytologist.** v.151, n. 3, p. 705-716, set. 2001.

Redman RS, Sheehan KB, Stout RG, Rodriguez RJ, Henson JM: Thermotolerance conferred to plant host and fungal endophyte during mutualistic symbiosis. **Science.** v.298, n. 5598, p. 1581-1581, nov. 2002.

Waller F, Achatz B, Baltruschat H, Fodor J, Becker K, Fischer M, Heier T, Huckelhoven R, Neumann C, Von Wettstein D, Franken P, Kogel KH: The endophytic fungus *Piriformis indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. **PNAS.** v.102, n. 38, p. 13386-13391, set. 2005.