

# DETEÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS EM FOLHAS DE OLIVEIRA INFETADAS COM OLHO-DE-PAVÃO

## ENDOPHYTIC FUNGI DETECTED IN OLIVE LEAVES INFECTED WITH PEACOCK DISEASE

MIGUEL LANDUM<sup>a,b</sup>, CARLA M. R. VARANDA<sup>a</sup>, JOANA ALHO<sup>b</sup>, FERNANDO REI<sup>b</sup>, ANTÓNIO DIAS<sup>c</sup> e MARIA DO ROSÁRIO FÉLIX<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Micologia, <sup>b</sup> Laboratório de Entomologia, <sup>c</sup> Departamento Engenharia Rural, ICAAM – Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas, Universidade de Évora, Apartado 94, 7002-554 Évora, Portugal

### RESUMO

Os fungos endofíticos, que colonizam naturalmente os tecidos de plantas, têm vindo a crescer de importância em termos de pesquisa e aplicações no âmbito da proteção das plantas. Todavia, a sua presença nos tecidos da oliveira ainda permanece bastante desconhecida. Dessa forma, com o objetivo de identificar e relacionar a presença de fungos endofíticos com o fungo patogénico *Spilocaea oleaginea*, agente causal da doença olho-de-pavão na oliveira, durante a primavera e verão de 2013 colheram-se folhas das cultivares Cobrançosa, Picual e Galega, que apresentavam lesões características da presença da doença, em quatro olivais localizados em diferentes regiões do Alentejo. Após a extração do DNA total e subsequente PCR com *primers* universais para a região ITS (*internal transcribed spacer*), foram sequenciados e analisados dez clones de cada cultivar. De acordo com as bases de dados *Fungal Barcode* e NCBI foi identificada a presença de fungos endofíticos pertencentes a oito famílias, nomeadamente, Botryosphaeriaceae, Dothioraceae, Leptosphaeriaceae, Mycosphaerellaceae, Phaeosphaeriaceae, Pleosporaceae, Sclerotiniaceae e Venturiaceae.

### PALAVRAS-CHAVE

*Spilocaea oleaginea*,; folhas Oliveira; Diversidade fúngica

### ABSTRACT

Endophytic fungi inhabiting naturally in plant tissues are gaining attention as a subject for research and applications in Plant Protection. However, little is known about the endophytes presence in olive tree tissues. For this reason, a first approach was done to relate the presence of endophytic fungi and the pathogenic fungus *Spilocaea oleaginea*, the causal agent of olive peacock disease. For that, in spring and summer of 2013, leaves of three olive cultivars, Cobrançosa, Picual and Galega, obtained from 4 different orchards in different regions of Alentejo, showing typical peacock disease lesions, were collected and the total DNA extracted. A PCR was performed using ITS universal

primers (internal transcribed spacer) and the amplified fragments were cloned. Ten clones from each cultivar were sequenced and analyzed. A 'BLAST n' search allowed the identification of fungi belonging to eight families, such as Botryosphaeriaceae, Dothioraceae, Leptosphaeriaceae, Mycosphaerellaceae, Phaeosphaeriaceae, Pleosporaceae, Sclerotiniaceae and Venturiaceae.

## KEYWORDS

*Spilocaea oleaginea*; olive leaves; fungal diversity

## INTRODUÇÃO

Os microrganismos endofíticos são geralmente fungos ou bactérias presentes no interior dos tecidos de plantas, que interagem com os seus hospedeiros sem lhes causar doença (Schulz & Boyle, 2006). Estes microrganismos, inicialmente classificados como assintomáticos, e apesar de muitos dos endófitos isolados não terem efeitos conhecidos para o hospedeiro, já demonstraram poderem ter alguma função para as plantas hospedeiras (Strobel & Daisy, 2003). No caso particular dos fungos endofíticos, embora a sua relação com o hospedeiro vegetal possa variar de hospedeiro para hospedeiro, a interação entre ambos ainda é pouco conhecida e compreendida (Chapla *et al.*, 2013). Todavia, o tipo de associação entre estes organismos sugere que possam ter co-evoluído, apresentando uma relação mutualística entre si. Os organismos endofíticos recebem benefícios da planta como nutrientes e proteção, enquanto as plantas podem obter maior resistência a ambientes adversos causados quer por fatores bióticos (insetos, herbívoros, nematodes e microrganismos fitopatogénicos), quer por fatores abióticos (pH, temperatura, stresse hídrico, ventos fortes e salinidade) (Jalgaonwala *et al.*, 2011; Chapla *et al.*, 2013).

Nos anos recentes, o estudo da população de fungos endofíticos presente em gramíneas, plantas não vasculares, coníferas e angiospérmicas, tem vindo a aumentar (Rodriguez *et al.*, 2009), o mesmo sucedendo na oliveira (*Olea europaea* L.), observando-se neste hospedeiro a existência de uma comunidade de fungos endofíticos diversificada e abundante. No conjunto dos fungos endofíticos já identificados na oliveira são de destacar, *Colletotrichum* sp., *Diaporthe* sp., *Fusarium oxysporum*, *Kabatina* sp., *Phomopsis columnaris*, *Trichoderma gamssi* e *Xylaria* spp. (Fisher *et al.*, 1992; Martins *et al.*, 2013; Sia *et al.*, 2013). Todavia, a interação entre essa diversidade de fungos endofíticos e as doenças do olival permanece ainda desconhecida. De entre as várias doenças que afetam a oliveira no nosso país, o olho-de-pavão, causado pelo fungo *Spilocaea oleaginea* (Castagne) S. Hughes, é uma das mais prevalentes e com grande impacto na copa da oliveira. Esta doença tem uma grande dispersão geográfica abrangendo toda a região mediterrânica, bem como regiões temperadas e subtropicais onde se verifica o cultivo da oliveira (Obanor *et al.*, 2010; Sanei & Razavi, 2011). A sintomatologia associada ao olho-de-pavão surge especialmente na primavera e no outono, quando as temperaturas são amenas e existe humidade suficiente para promover a esporulação do fungo resultando no aparecimento das lesões características nas folhas.

Permanecendo na árvore em folhas infetadas assintomáticas, este fungo pode originar elevadas desfoliações com o consequente enfraquecimento da árvore e impedindo a diferenciação floral, com consequências diretas na produção de frutos (Sanei & Razavi, 2011).

Neste trabalho foi feita uma identificação preliminar da comunidade de fungos endofíticos presente em folhas de oliveira com lesões típicas da doença causada pelo fungo *Spilocaea oleaginea*, de diferentes cultivares nacionais e recolhidas em diferentes locais do Alentejo.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Durante a primavera e verão de 2013, procedeu-se à recolha de amostras de folhas com lesões características da doença olho-de-pavão, pertencentes às cultivares de oliveira Cobrançosa, Galega e Picual, em olivais de quatro localidades do Alentejo (Évora, Mitra-Valverde, Monforte e Vidigueira). As folhas foram colhidas aleatoriamente em 10 árvores, sendo posteriormente colocadas em sacos hermeticamente fechados e transportadas para o laboratório onde foram armazenadas a -20°C, até serem processadas. Para garantir a exclusividade da análise apenas às áreas com presença de olho-de-pavão, as lesões concêntricas características desta patologia foram cortadas e o restante material das folhas descartado. A eventual presença e identificação dos fungos endofíticos presentes nas folhas infetadas foi realizada através da sua identificação molecular. Dessa forma, de cada olival utilizaram-se 500 mg de tecido vegetal com lesões, sendo o DNA total extraído de acordo com o protocolo CTAB/Proteinase K. A identificação dos fungos presentes em cada amostra foi realizada através da amplificação por PCR da região ITS (*internal transcribed spacer region*) do DNA ribossomal, recorrendo a um par de *primers* universais (ITS1/ITS4) (White *et al.*, 1990). Os produtos de PCR obtidos foram subsequentemente purificados com o *kit* Illustra GFX (GE Healthcare) e clonados utilizando o *kit* de clonagem (Nzytech, Portugal), seguindo as instruções dos fabricantes. Em cada olival experimental, foram obtidos 10 clones, posteriormente sequenciados em ambas as direções pela empresa Macrogen (The Netherlands). As sequências obtidas foram posteriormente analisadas com o programa *Bioedit Sequence Alignment Editor* v.7.2.3 (Hall, 1999), e a identificação das famílias dos fungos endofíticos presentes em cada amostra e olival foi baseada na melhor percentagem de semelhança obtida após a comparação com outras sequências presentes nas bases de dados *Fungal Barcode* ([www.fungalbarcoding.org](http://www.fungalbarcoding.org)) e NCBI. Com base nas sequências obtidas dos clones, juntamente com outras existentes no GenBank, foi construído um dendrograma filogenético pelo método *Neighbor-Joining*, com 1000 repetições e modelo *Jukes-Cantor*, gerado pela aplicação MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013).

## **RESULTADOS e DISCUSSÃO**

Após a análise bioinformática dos dados, os produtos de amplificação correspondentes à sequência ITS1-5.8S-ITS2 variaram entre os 522 pb e 699 pb. Considerando a melhor

percentagem de homologia entre os clones obtidos nos olivais e as sequências das bases de dados consideradas, foi identificada a presença de fungos endofíticos pertencentes a oito famílias, tão distintas como Botryosphaeriaceae, Dothioraceae, Leptosphaeriaceae, Mycosphaerellaceae, Phaeosphaeriaceae, Pleosporaceae, Sclerotiniaceae e Venturiaceae (Figura 1 e Tabela 1). De entre essas famílias merecem destaque as famílias Leptosphaeriaceae, Phaeosphaeriaceae e Pleosporaceae, incluídas na ordem Pleosporales, que contém fungos endofíticos e epifíticos, passando por parasitas e saprófitos (Zhang *et al.*, 2009). Também a família Botryosphaeriaceae inclui fungos diversos e conhecidos, fitopatogénicos, endofíticos ou saprofiticos, distribuídos por todas as áreas geográficas do globo, com a exceção das regiões polares. A sua associação frequente com doenças de plantas tem estimulado o interesse nesta família de fungos (Phillips *et al.*, 2013). Por sua vez, a família Venturiaceae engloba várias espécies de fungos fitopatogénicos, incluindo a espécie causadora do olho-de-pavão (*S. oleaginea*).

Os resultados obtidos permitiram constatar a existência de uma variedade de fungos endofíticos diversificada, em consonância com outros estudos já realizados na oliveira (Fisher *et al.*, 1992; Martins *et al.*, 2013; Sia *et al.*, 2013). Pela análise do dendrograma (Figura 1) pode observar-se que a diversidade de fungos não pareceu variar em função da cultivar nem com a localização do olival, uma vez que as mesmas famílias de fungos estavam igualmente presentes em oliveiras de cultivares distintas, localizadas no norte e sul do Alentejo, como sucedeu com as famílias Leptosphaeriaceae, Mycosphaerellaceae e Pleosporaceae. Este estudo permitiu ainda constatar, pela primeira vez, a existência de uma diversidade de famílias de fungos associada a lesões de *S. oleaginea*, sendo de referir que algumas das famílias identificadas possuem fungos já conhecidos como responsáveis pela contenção de algumas doenças, nomeadamente em vinhas, mostrando o seu papel no controlo de doenças associadas a fungos, como *Botrytis cinerea* Pers. (Martini *et al.*, 2009). Todavia, no estado atual dos conhecimentos não é ainda possível saber se a associação de fungos endofíticos com *S. oleaginea* poderá resultar igualmente num fator de contenção da doença ou, pelo contrário, ser um fator de exacerbação da patologia associada ao olho-de-pavão. Desse modo, a continuação dos estudos relacionados com a presença de fungos endofíticos em tecidos da oliveira revela-se de grande interesse, tendo em conta o potencial benefício associado à presença deste tipo de fungos na limitação de fungos patogénicos, como foi já observado noutras culturas.

Tabela 1. Famílias de fungos endofíticos presentes nas folhas de oliveira infetadas com *S. oleagina*.

<b>Cultivar</b>	<b>Sequências</b>	<b>Família</b>	<b>Localização</b>
Cobrançosa	Cob1	-	Évora
Cobrançosa	Cob2	Leptosphaeriaceae	Évora
Cobrançosa	Cob6	Botryosphaeriaceae	Évora
Cobrançosa	Cob7	-	Évora
Cobrançosa	Cob8	-	Évora
Cobrançosa	Cob9	-	Évora
Cobrançosa	Cob10	-	Évora
Cobrançosa	Cob11	-	Évora
Cobrançosa	Cob13	-	Évora
Cobrançosa	Cob14	Mycosphaerellaceae	Évora
Galega	Mitra1	Phaeosphaeriaceae	Mitra-Valverde
Galega	Mitra2	Pleosporaceae	Mitra-Valverde
Galega	Mitra3	Tremellaceae	Mitra-Valverde
Galega	Mitra6	Venturiaceae	Mitra-Valverde
Galega	Mitra8	Elsinoaceae	Mitra-Valverde
Galega	Mitra9	Dothioraceae	Mitra-Valverde
Galega	Mitra10	Pleosporaceae	Mitra-Valverde
Galega	Mitra12	Mycosphaerellaceae	Mitra-Valverde
Galega	Mitra13	-	Mitra-Valverde
Galega	Mitra16	Xylariaceae	Mitra-Valverde
Picual	Mon1	Phaeosphaeriaceae	Monforte
Picual	Mon8	-	Monforte
Picual	Mon9	Phaeosphaeriaceae	Monforte
Picual	Mon15	Phaeosphaeriaceae	Monforte
Picual	Mon16	Phaeosphaeriaceae	Monforte
Picual	Mon17	Pleosporaceae	Monforte
Picual	Mon18	Mycosphaerellaceae	Monforte
Picual	Mon19	Mycosphaerellaceae	Monforte
Picual	Mon20	Mycosphaerellaceae	Monforte
Picual	Mon21	Montagnulaceae	Monforte
Galega	Vid1	Pleosporaceae	Vidigueira
Galega	Vid2	Sclerotiniaceae	Vidigueira
Galega	Vid3	Leptosphaeriaceae	Vidigueira
Galega	Vid4	Incertae sedis	Vidigueira
Galega	Vid5	Sclerotiniaceae	Vidigueira
Galega	Vid6	Leptosphaeriaceae	Vidigueira
Galega	Vid8	Tremellaceae	Vidigueira
Galega	Vid9	Phaeosphaeriaceae	Vidigueira
Galega	Vid10	Leptosphaeriaceae	Vidigueira
Galega	Vid12	-	Vidigueira

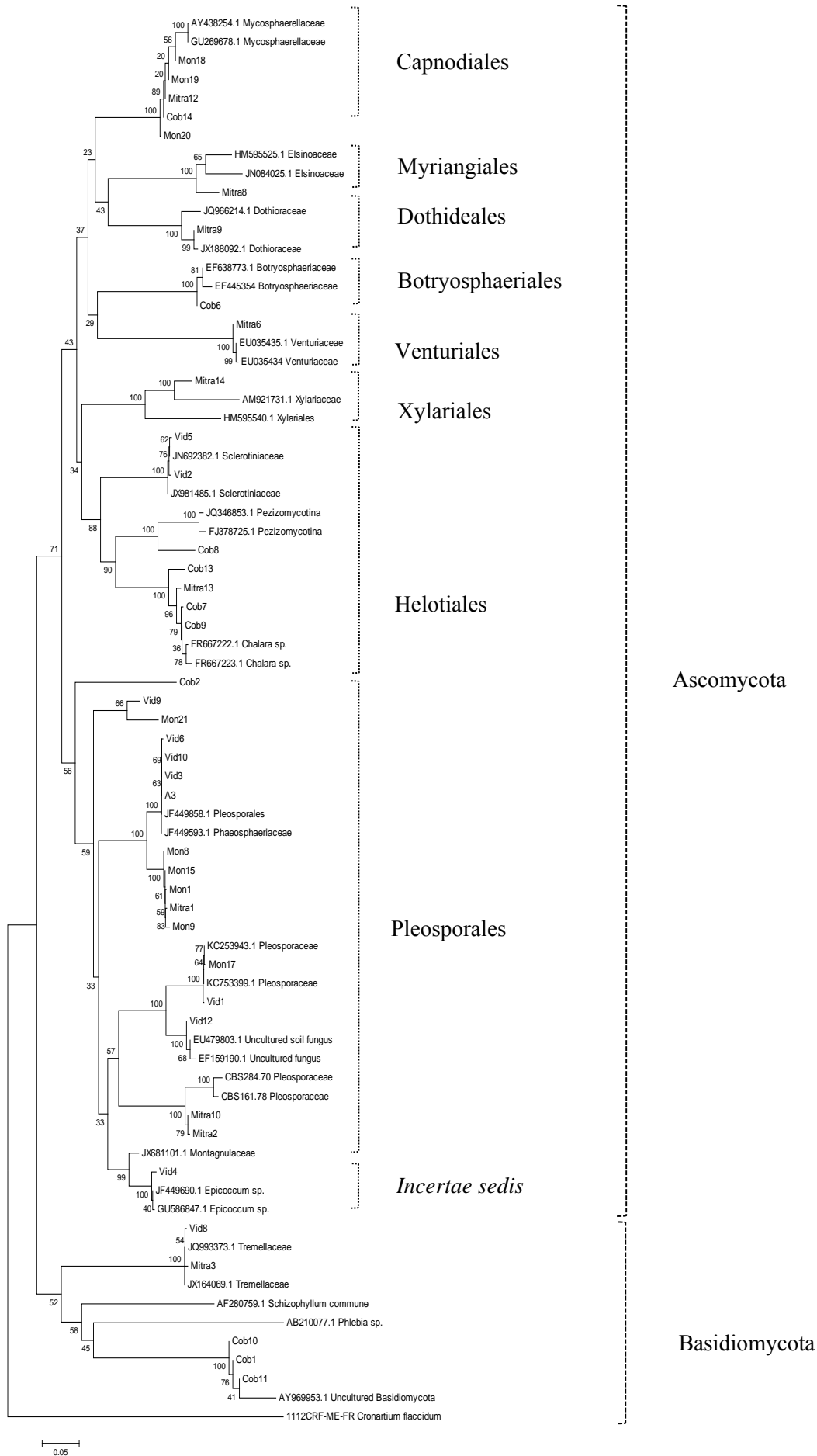


Figura 1. Dendrograma Filogenético exibindo as famílias de fungos presentes nas folhas analisadas.

## BIBLIOGRAFIA

- Chapla, V. M., Biasetto, C. R., & Araujo, A. R. (2013). Fungos Endofíticos : Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais. *Rev. Virtual Quim.*, 5(3), 421–437.
- Fisher, P. J., Petrini, O., Petrini, L. E., & Descals, E. (1992). A preliminary study of fungi inhabiting xylem and whole stems of *Olea europaea*. *Sydowia*, 44, 44.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Jalgaonwala, R. E., Mohite, B. V., & Mahajan, R. T. (2011). A review : Natural products from plant associated endophytic fungi. *J. Microbiol. Biotech. Res.*, 1(2), 21–32.
- Koichiro Tamura, Glen Stecher, Daniel Peterson, Alan Filipski, and Sudhir Kumar (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*:30 2725-2729.
- Martini, M., Musetti, R., Grisan, S., Polizzotto, R., Borselli, S., Pavan, F., Scienze, V. (2009). DNA-Dependent Detection of the Grapevine Fungal Endophytes *Aureobasidium pullulans* and *Epicoccum nigrum*. *Plant Disease: An International Journal of Applied Plant Pathology.*, 93(10), 993–998
- Martins, F., Pereira, J. A., Bento, A., & Baptista, P. (2013). Diversidade e distribuição de fungos endofíticos em *Olea europaea* L . Livro de Resumos - VII Congresso Ibérico de Agroingenieria Y Ciencias Horticolas, (Madrid, 26-29 Agosto), 353.
- Obanor, F. O., Walter, M., Jones, E. E., Candy, J., & Jaspers, M. V. (2010). Genetic variation in *Spilocaea oleagina* populations from New Zealand olive groves. *Australasian Plant Pathology*, 39, 508–516.
- Phillips, A. J. L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2013). The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*, 76, 51–167. doi:10.3114/sim0021.
- Rodriguez, R. J., White, J. F., Arnold, a E., & Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *The New Phytologist*, 182(2), 314–30. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x
- Sanei, S. J., & Razavi, S. E. (2011). Survey of *Spilocaea oleagina*, causal agent of olive leaf spot, in North of Iran. *Journal of Yeast and Fungal Research*, 2(3), 33–38. doi:10.5897/JYFR11.004
- Schulz, B., & Boyle, C. (2006). What are Endophytes? *Microbial Root Endophytes*, 9, 1–14.
- Sia, E. D. F., Marcon, J., Luvizotto, D. M., Quecine, M. C., & Tsui, S. (2013). Endophytic fungi from the Amazonian plant *Paullinia cupana* and from *Olea*

*europaea* isolated using cassava as an alternative starch media source. SpringerOpen Journal. doi:10.1186/2193-1801-2-579

Strobel, G., & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products, 67(4). doi:10.1128/MMBR.67.4.491

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. San Diego, CA: Academic Press, Inc.

Zhang, Y., Schoch, C. L., Fournier, J., Crous, P. W., de Gruyter, J., Woudenberg, J. H. C., Hyde, K. D. (2009). Multi-locus phylogeny of Pleosporales: a taxonomic, ecological and evolutionary re-evaluation. Studies in Mycology, 64, 85–102. doi:10.3114/sim.2009.64.04