



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA, GENÉTICA E BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL – PBA

**UTILIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS COMO BIOELICITOR
DE CULTURA DE CALOS DE *Cereus peruvianus* MILL. (Cactaceae)
PARA BIOSÍNTESE DE COMPOSTOS BIOATIVOS**

Graduando: Lucas Santos Lima

Orientador (a): Prof.^a Dra. Claudete Aparecida Mangolin

Coorientador (a): Prof.^a Me. Jesieli Beraldo Borrazzo

Maringá

2022

**UTILIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS COMO BIOELICITOR
DE CULTURA DE CALOS DE *Cereus peruvianus* MILL. (Cactaceae)
PARA BIOSÍNTESE DE COMPOSTOS BIOATIVOS**

RESUMO

Este projeto tem como objetivo identificar quais bactérias endofíticas são capazes de elicitar biomoléculas de interesse produzidas pela cultura de células de calos de *Cereus Peruvianus*. A produção em grande escala de compostos bioativos é essencial para suprir as necessidades industriais e seus interesses econômicos.

Palavras-chave:

Sumário

1. Introdução	04
2. Justificativa	05
3. Objetivos	06
3.1. Objetivo geral	06
3.2. Objetivos específicos	06
4. Metodologia	06
4.1. _	06
4.1.1. _	07
4.1.2. _	07
4.1.3. _	08
4.1.4. _	08
4.1.5. _	09
4.1.6. _	09
5. Cronograma de execução	11
6. Referências	12

1. Introdução

Seres eucarióticos coevoluíram integrados com comunidades procariontes, e a seleção natural atuou nesse complexo como se fosse um organismo único (RICARDO GUERRERO et al., 2013), este fato levou, por conseguinte, que durante suas vidas, plantas interagissem com diversos micro-organismos, tais como bactérias, fungos e algas. Essa relação é essencial para a sobrevivência tanto do vegetal, quanto dos micro-organismos, determinando o desenvolvimento da planta, assim como sua nutrição e aptidão, necessários para resistir às pressões ambientais. A associação de plantas e endófitos formam um organismo holobiont, nesse conceito os micro-organismos e o vegetal, não são considerados organismos independentes, mas sim um fitomicrobioma. Nessa relação simbiótica os micro-organismos endofíticos modificam as propriedades do solo, colonizam os tecidos das plantas e mudam seus traços ecofisiológicos, além de serem capazes de alterar biomoléculas produzidas pelo vegetal, como hormônios e moléculas do sistema imune (UROZ et al., 2019).

Um organismo anfitrião em conjunto com um microbioma é o que caracteriza um holobiont. A separação desse complexo pode causar diversos malefícios para a planta, como doenças e distúrbios fisiológicos, assim como acontece nos humanos (TROUVELOT et al., 2019). Como resultado dessa interação surgiu uma imensa variedade de micro-organismos que evoluíram e adquiriram genes para complementar ao complexo holobiont, contribuindo, além da sobrevivência e aptidão do organismo, com importantes serviços ecossistêmicos como especiação vegetal e ciclos geoquímicos, essa diversidade taxonômica microbiana forma o chamado núcleo funcional microbiano. (LEMANCEAU et al, 2017).

A diversidade pouco explorada dos biomas brasileiros tem um potencial imenso para a produção de fármacos e produtos biotecnológicos. Biomas como a Caatinga, Mata Atlântica, Cerrado, Amazônia, Pampa e Pantanal possuem raras espécies endêmicas de vegetais que possuem várias espécies de endófitos vivendo em conjunto. (REZENDE et al., 2018).

Metabólitos secundários substâncias produzidas naturalmente pelo sistema da planta como um mecanismo de defesa contra estresse ambiental, alguns desses metabólitos possuem grande importância na área da saúde, assim como na agricultura. (RAMACHANDRA RAO and RAVISHANKAR et al., 2002). Em condições normais as plantas produzem muito pouco dessas substâncias, e só produzem quando atingem um estado fisiológico, e quando são submetidas a condições ambientais específicas. A produção natural de metabólitos secundários das plantas não é o suficiente para satisfazer a procura pelos produtos no mercado, então, para atender a demanda, elas são cultivadas in-vitro, como por exemplo em

cultura de calos, onde técnicas biotecnológicas são utilizadas para ampliar a produção desses fitoquímicos continuamente em todas as estações o ano (DIXON et al., 2001; OKSMAN-CALDENTEY and INZÉ et al., 2004; YUKIMUNE et al., 1996; KARUPPUSAMY et al., 2009).

Em animais, células tronco conseguem se diferenciar em um tecido especializado. No entanto, plantas são capazes de desdiferenciar seus tecidos para formar células capazes de regenerar um tecido prejudicado, ou até mesmo regenerar uma planta inteira, além disso os vegetais conseguem formar calos, que são aglomerados de células totipotentes indiferenciadas. Vários fatores transcricionais controlam a formação de meristemas e desdiferenciação, as condições laboratoriais para manter uma cultura de calos varia de espécie para espécie, e precisam ser elaboradas para cada caso individual. (THOMAS EFFERT et al., 2019). Os genes relacionados com as células tronco são de extrema importância para processos de desdiferenciação, mas a desdiferenciação não é regulada apenas por fatores transcricionais, é também controlada por eventos epigenéticos (JIANG F et al., 2015).

Cultura de calos são extremamente úteis para a indústria de fármacos e para a agricultura. Muitos produtos podem ser derivados de sistemas de plantas in-vitro, esses sistemas facilitam a manipulação genética, podendo assim formar novas plantas com características desejadas, como resistência a pragas e herbicidas, ou produtos derivados de plantas, metabólitos secundários. Os vegetais conseguem se adaptar a estímulos bióticos e abióticos, utilizando sua plasticidade para se remodelarem, e através da síntese de metabólitos secundários que são ativados com uma resposta defensiva. (ZHAO J et al., 2005).

Uma das estratégias mais importantes para aumentar a produção de metabólitos secundários é a eliciação, que consiste em adicionar substâncias químicas que acionam pathways biosintéticos ao ativar genes de regulação positiva e fatores de transcrição. Eliciação vem sendo bastante utilizada para amplificar a produção de metabólitos secundários em culturas de células vegetais in-vitro, ou induzir a síntese de novo dos metabólitos. Ataque de patógenos, estresse ambiental, radiação UV, luz intensa, fermentos, escassez de nutrientes, temperatura assim como herbicidas são exemplos de elicitores que frequentemente aumentam a acumulação de fenilpropanóides. (RAMACHANDRA RAO and RAVISHANKAR et al., 2011)

Elicitores podem ser de origem biótica ou abiótica, (RADMAN et al, 2003). Os elicitores abióticos são divididos em 3 categorias: físicos, químicos e hormonais. (NAIK and ALKHAYRI 2016). Os bióticos são originados de seres vivos e podem ser polissacarídeos ou

micro-organismos. Os polissacarídeos elicitores são extraídos, isolados e purificados da parede celular como lignina, pectina, celulose e quitina. Elicitores feitos de microorganismos podem ser por exemplo extratos de bactérias ou fungos. (NAMDEO A. G. 2007).

Elicitores derivados de bactérias podem ser tanto como as células bacterianas em si, quanto componentes presentes nas células bacterianas. Esse tipo de elicitor é bastante usado para aumentar a produção de metabólitos secundários por plantas in-vitro. Em razão da especificidade de cada espécie de bactéria consegue aumentar a produção de diferentes metabólitos secundários em quantidades diferentes. Essa variedade de elicitores bacterianos ocorre em razão dos receptores para os elicitores, que estão presente na membrana plasmática, serem diferentes em cada espécie, além disso a ativação de proteínas G, a acidificação do citoplasma e a formação de espécies de oxigênios bastante reativos. (ZHAO J et al. 2005; BISWAS et al. 2016). Quando as plantas estão na natureza precisam lidar com diversas bactérias, como por exemplo as bactérias que estão em seu solo, nessas condições o vegetal aumenta a produção de certos metabólitos secundários. Ao adicionar culturas de bactérias vivas, semelhantes as bactérias que se encontravam no solo, em um vegetal correspondente in-vitro, o estímulo para aumentar a produção de metabólitos secundários ainda é presente, sendo assim usadas como elicitores (MAÑERO et al. 2012).

2. Justificativa

A produção em escala industrial de compostos bioativos enfrentou, e enfrenta, muitas dificuldades em razão da pequena produção desses metabólitos secundários provida

pelo organismo, e essa produção ainda é dependente de outras variantes, como a estação do ano e o estado fisiológico da planta, que será o organismo estudado nesta pesquisa. O cultivo de vegetais in-vitro, como em cultura de células de calos, provou-se capaz de produzir compostos bioativos durante todo ano e em quantidade controlada, porém ainda em pequena quantidade, o que não é viável para atender as necessidades humanas. Para aumentar a produção de compostos bioativos é possível utilizar os bioelicitores, que precisam ser específicos para cada composto de interesse que será amplificada a síntese. Bactérias endofíticas são capazes de agir como bioelicitores, uma vantagem de usar esses endófitos como elicitores em uma cultura de células de calos é a possibilidade de identificar previamente as bactérias que constituem o fitomicrobioma, assim possuindo uma direção de quais bactérias estudar, outra vantagem é que as bactérias são elicitores muito específicos, assim podendo selecionar uma espécie de bactéria para a produção de um composto correspondente. No caso deste estudo, a cultura de calos utilizada será do vegetal *Cereus Peruvianus*, que tem importância medicinal e econômico industrial, assim os metabólitos secundários que serão elicitados podem ser usados para a produção de fármacos por exemplo, ou em outras finalidades ainda não esperadas.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Identificar os compostos bioativos que terão produção amplificada pelo *Cereus Peruvianus* Mill através da influência de bactérias endofíticas como bioelicitores.

3.2 Objetivos específicos

4. Metodologia

4.1

4.1.1

4.1.2

4.1.3

4.1.4

4.1.5

4.1.6

5. Cronograma de execução

Atividades	2022		2023	
	1º sem.	2º sem.	1º sem.	2º sem.
Levantamento Bibliográfico		X	X	X
Ensaaios analíticos			X	X
Redação Relatório Final				X

6. Referências

BERALDO-BORRAZZO, J.; POLONIO, J.C.; SCHOFFEN, R.P.; OLIVEIRA, J.A.S.; POLLI, A.D.; FILHO, B.A.A.; CRUZ, E.; CORREA, J.L.; MANGOLIN, C.A.; MACHADO, M.F.P.S. Communities of endophytic bacteria from *Cereus peruvianus* Mill.(Cactaceae) plants obtained from seeds and from in vitro-regenerated somaclone. **South African Journal of Botany**, v. 142, p. 335-343, 2021.

BISWAS T, KALRA A, MARTHUR AK, LAL RK, SINGH M, MARTHUR A. Elicitors influenced differential ginsenoside production and exudation into medium with concurrent Rg3/Rh2 panaxadiol induction in *Panax quinquefolius* cell suspensions. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2016.

DICOSMO F; MISAWA M. Eliciting secondary metabolism in plant cell cultures. **Trends Biotechnology**, 1985.

DIXON RA. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, 411:843–847. 2001.

GUERRERO, R; MARGULIS, L; BERLANGA, M. Symbiogenesis: The holobiont as a unit of evolution. **Internacional Microbiology**, 2013.

JIANG F, FENG Z, LIU H, ZHU J. Involvement of plant stem cells or stem-cell like cells in dedifferentiation. **Front Plant Sci**, 2015

KARUPPUSAMY S. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. **J Med Plants Res**, 2009.

LEMANCEAU, P.; BLOUIN, M.; MULLER, D.; MOENNE-LOCCOZ. Let the core microbiota be functional. **Trends in Plant Science**, 2017.

MAÑERO FJG, ALGAR E, MARTÍN GOMES MS, SACO SIERRA MD, SOLANO BR (2012) Elicitation of secondary metabolism in *Hypericum perforatum* by rhizosphere bacteria and derived elicitors in seedlings and shoot cultures. **Pharm Biol**, 2012.

NAIK PM, Al-KHAYRI J. Abiotic and biotic elicitors–Role in secondary metabolites production through in vitro culture of medicinal plants. In: SHANKER AK, SHANKER C (eds) Abiotic and biotic stress in plants - **Recent Advances and Future Perspectives**. **InTech Open**, 2016.

NAMDEO AG. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A Review. **Pharmacogn Ver**, 2007.

OKSMAN-CALDENTEY K-M, INZÉ D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. **Trends Plant Sci** 9:433–440, 2004.

RADMAN R, SAEZ T, BUCKE C, KESHAVARZ T. Elicitation of plants and microbial cell systems. **Biotechnol Appl Biochem** 37:91, 2003.

RAMACHANDRA RAO S, RAVISHANKAR GA. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnol Adv**, 20:101–153. 2002.

RAMACHANDRA RAO S, TRIPATHI U, SURESH B, RAVISHANKAR GA. Enhancement of secondary metabolite production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* and *Tagetes patula* under the influence of microalgal elicitors. **Food Biotechnol**, 15:35–46. 2001

RAMACHANDRA RAO S, RAVISHANKAR GA. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants **Plant Signaling & Behavior**, 2011.

REZENDE, C.L.; SCARANO, F.R.; ASSAD, E.D.; JOLY, C.A.; METZGER, J.P.; STRASSBURG, B.B.N.; TABARELI, M.; MITTERMEIER, R.A. From hotspot to hopespot: An opportunity for the Brazilian Atlantic Forest. *Perspectives in Ecology and Conservation*, v.16, p. 208–214, 2018.

TROUVELOT, S; FONTAINE, F; MAHÉ, H; BETTENFELD, P; SCHAİK, E.V; ADRIAN, M; FERNANDEZ, F.D.O; GROSJEAN, C; LARIGNON, P; MOUILLE, G; MARTIN-LAURENCE, F; ZEKRI, O; MONDY, S; WIPF, D; Courty, P. The holobiont, a biological lever to manage some declines of grapevine. **Hal, science ouverte**, 2020.

YUKIMUNE Y, TABATA H, HIGASHI Y, HARA. Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. **Nat Biotechnol**, 1996.

ZHAO J, DAVIS LC, VERPOORTE R Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. **Biotechnol Adv**, 2005.