

BIODIVERSIDADE DE FUNGOS ENDOFÍTICOS PROVENIENTES DO ABACAXI

Vitória Eduarda Ferreira¹, Ismael de Oliveira Pinto², Camilla Martins Malta³, Raphael Sanzio Pimenta⁴

¹Estudante do Curso Técnico em Agropecuária – IFTO, Campus Colinas do Tocantins: vitoriaeduh@hotmail.com

²Professor EBTT – IFTO, Campus Colinas do Tocantins: ismael.pinto@ifto.edu.br

³Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia. e-mail: camilla.malta@ifto.edu.br

⁴Professor Associado – UFT, Campus Palmas: pimentars@uft.edu.br

Resumo: O abacaxi é uma fruta consumida em todo o mundo, tanto in natura quanto na forma de produtos industrializados, de forma geral, assim como outras espécies vegetais ela apresenta fungos endofíticos que colonizam seus diversos tecidos sem apresentar sintomas de infecção. Tais organismos são uma rica fonte de produtos naturais que podem apresentar-se úteis na agricultura e na indústria, particularmente na alimentícia e farmacêutica. Este trabalho tem como objetivo, contribuir para o conhecimento da microbiota endofítica associada a frutos de abacaxi de forma a somar conhecimentos às metodologias já estabelecidas e servir de base para novos estudos que visem apontar novas estratégias para o controle biológico. Para tanto foram isolados os fungos das folhas das coroas de abacaxi originárias do município de Miranorte – TO, sendo os mesmos classificados por características visuais em morfoespécies. Foram isoladas 95 colônias de fungos endofíticos, e agrupados em 23 morfoespécies, de acordo com sua semelhança macroscópica. Foi observada a presença de poucas morfoespécies dominantes e várias outras morfoespécies presentes de forma pontual neste hospedeiro.

Palavras-chave: *Ananas comosus*, morfoespécies, controle biológico

1 INTRODUÇÃO

O abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill), pertence ao gênero Ananás, que é o mais importante da família *Bromeliaceae*. A variedade “Pérola” é a mais cultivada no Brasil, seus frutos apresentam forma cônica, casca pouco colorida, haste frutífera e as folhas longas com finos espinhos. A polpa é saborosa, rica em suco, pouco ácida e de coloração branco ou amarelo pálido (CARVALHO *et al.*, 2009). O abacaxi é muito consumido em todo o mundo, tanto *in natura* quanto na forma de produtos industrializados (CUNHA *et al.*, 2005).

Fungos endofíticos colonizam assintomaticamente diversos tecidos de plantas (RODRIGUEZ *et al.*, 2009). Eles podem mediar o crescimento da planta hospedeira, aumentar sua tolerância ao stress, e alterar as interações com pragas e patógenos (PORRASALFARO & BAYMAN, 2011). Em algumas plantas os fungos endofíticos podem exercer influências sobre sua capacidade em interagir no seu habitat. Por exemplo, o termo tolerância de plantas que crescem em solos geotérmicos pode estar relacionado com os endófitos que lhes estão associados (REDMAN *et al.*, 2002). Estes endófitos de algum modo permitem que as plantas suportem as condições de altas temperaturas presentes no solo. Normalmente, plantas de regiões tropicais apresentam uma alta

diversidade de micro-organismos endofíticos quando comparadas com plantas de regiões temperadas (JALGAONWALA et al., 2011).

Micro-organismos endofíticos são uma rica fonte de produtos naturais que exibem um largo espectro de atividades biológicas (STROBEL & DAISY, 2003). Endofíticos são potencialmente úteis na agricultura e na indústria, particularmente na alimentícia e farmacêutica. Podem ser utilizados como vetores para introdução de genes de interesse nas plantas, como agentes inibidores de pragas e patógenos, e como fontes de metabólitos primários e secundários de interesse como o taxol, poderoso anticancerígeno e a cryptocandina, lipopeptídeo antimicótico e diversos outros antimicrobianos (GUIMARÃES, 2009).

Este trabalho tem como objetivo, contribuir para o conhecimento da microbiota endofítica associada a frutos de abacaxi (*Ananas comosus*) de forma a somar, conhecimentos às metodologias já estabelecidas e servir de base para novos estudos que visem apontar novas estratégias para o controle biológico.

2 METODOLOGIA

Para a obtenção dos Micro-organismos Endofíticos, vinte frutos de abacaxi comerciais foram aleatoriamente amostrados de produtores locais do município de Miranorte - TO. Os frutos foram recolhidos em condições assépticas e lavados em água estéril, para remoção de sujidades superficiais. Após esse processo os mesmos foram levados para o Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins, Campus Palmas. No laboratório foram retiradas da coroa dos frutos 3 folhas saudáveis onde foram obtidos 3 fragmentos de cada folha e desinfetados seguindo a metodologia proposta por Rosa *et al.* (2010).

Após a desinfecção superficial, os fragmentos foram transferidos para placas de Petri contendo BDA (Batata Dextrose Ágar), suplementado com cloranfenicol (100 µg/mL) para evitar possível contaminação por bactérias. As placas foram inoculadas com 3 fragmentos de folha, sendo a amostragem por indivíduo vegetal realizada em triplicata. Em seguida as placas foram incubadas a 25-28 °C por um período de até 60 dias.

As colônias fúngicas obtidas após a incubação foram individualmente transferidas para novas placas de Petri contendo BDA e incubadas a 25-28 °C por 7 dias para purificação. Em seguida, foi realizada a caracterização morfológica das colônias e agrupamento das mesmas em morfoespécies. Para tanto, as colônias foram agrupadas por similaridade visual.

Todos os endofíticos isolados tiveram suas colônias observadas (frente e verso) e agrupadas em morfoespécies, de acordo com características macromorfológicas: (a) cor da colônia (frente e verso), (b) textura da superfície (frente), (c) aspecto da borda e (c) produção de substâncias secretadas no meio.

A avaliação da riqueza observada foi realizada a partir dos dados de agrupamento morfológico em morfoespécies, utilizando-se o estimador de riqueza Jacckknife1 e para se revelar a suficiência do esforço amostral, foi produzida curva de acumulação de morfoespécies por indivíduo vegetal coletado a partir dos valores de Mao-Tau com 200 aleatorizações, ambos obtidos através do programa EstimateS.

A frequência de colonização, que corresponde ao número de fragmentos colonizados, foi calculada utilizando-se a fórmula: $F = [(Nd/Nt) * 100]$, onde **F** corresponde a frequência de colonização, **Nd** corresponde ao número de amostras das quais foi possível isolar um ou mais fungos endofíticos e **Nt** corresponde ao número total de isolados (TAYLOR et al., 1999).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Após o período de crescimento foram obtidas 95 colônias fúngicas, através do processo de purificação, sendo utilizados 85 isolados endofíticos devido as características de desenvolvimeto e possibilidade de isolamento (Tabela 1).

Tabela 1 - Número de fragmentos e de colônias crescidas e isoladas de *Ananas comosus*.

Fr	Pl	Is	To	Fr	Pl	Is	To	Fr	Pl	Is	To	Fr	Pl	Is	To			
1	A	3	7	6	A	1	5	11	A	1	4	16	A	1	4			
	B	1			B	1			B	2			B	1			B	1
	C	3			C	3			C	1			C	2			C	2
2	A	2	5	7	A	2	4	12	A	1	4	17	A	0	2			
	B	1			B	1			B	2			B	1			B	1
	C	2			C	1			C	1			C	1			C	1
3	A	3	5	8	A	0	5	13	A	1	4	18	A	1	5			
	B	1			B	2			B	1			B	3			B	3
	C	1			C	3			C	2			C	1			C	1
4	A	3	8	9	A	1	3	14	A	2	4	19	A	4	8			
	B	3			B	1			B	1			B	2			B	2
	C	2			C	1			C	1			C	2			C	2
5	A	2	4	10	A	1	4	15	A	2	5	20	A	1	5			
	B	1			B	1			B	1			B	2			B	2
	C	1			C	2			C	2			C	2			C	2

Fr = fruto; Pl = placa; Is = numero de isolados na placa; To = total de fungos isolados no fruto. Fonte: os autores

Caules e folhas têm sido as partes vegetais mais utilizadas para a obtenção de fungos endofíticos em estudos de diversidade e bioprospecção (WANG et al., 2007). Sabe-se que a frequência de fungos endofíticos cresce proporcionalmente à idade do tecido hospedeiro (FISHER et al., 1986). Isto pode ser explicado, porque, além das folhas maduras apresentarem uma área maior para captura de inóculo em sua superfície, elas ainda estariam expostas durante um período mais longo do que folhas jovens e, conseqüentemente, receberiam maiores quantidades de fungos.

Embora não existam dados a respeito da frequência de fungos endofíticos estima-se que ela seja inferior a 17% do total de micro-organismos associados a determinado hospedeiro vegetal (ARNOLD, 2007).

Os endofíticos isolados foram agrupados em 23 morfoespécies de acordo com sua semelhança macroscópica. Sendo as mais frequentes, morfoespécie de número 18 com 22,3% dos isolados, morfoespécie de número 20 com 18,8% dos isolados e morfoespécie de número 17 com 16,4% dos isolados (Tabela 2).

Tabela2. Número de endofíticos isolados de fragmentos de folhas de abacaxi (*Ananas comosus*) por morfoespécie.

Nº de Isolados	Morfoespécie	Total
01	2, 3, 4, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 21, 22, 23	13
02	1, 5, 15	06
03	7, 8	06
04	6,	04
07	19	07
14	17	14
16	20	16
19	18	19
TOTAL		85

Os endofíticos isolados foram agrupados em 23 morfoespécies de acordo com sua semelhança macroscópica. Sendo as mais frequentes, morfoespécie de número 18 com 22,3% dos isolados, morfoespécie de número 20 com 18,8% dos isolados e morfoespécie de número 17 com 16,4% dos isolados. Foi observada a presença de poucas morfoespécies dominantes e várias outras morfoespécies presentes de forma pontual neste hospedeiro.

Resultados semelhantes foram observados por Rakotoniriana et al. (2007) em *Centella asiatica*, caracterizado por duas espécies endofíticas mais frequentes e numerosas

outras com rara ocorrência, sendo aquelas com frequência de isolamento menor do que 1%, reconhecidas como espécies cosmopolitas, relatadas como endofíticos de uma grande variedade de hospedeiros vegetais distintos. No entanto, normalmente se observa a presença de uma ou duas espécies dominantes no hospedeiro e um número maior de espécies mais raras (PIMENTA et. al., 2012). No presente estudo treze morfoespécies apresentaram apenas um isolado.

A Tabela 3 representa o número de isolados de fungos endofíticos e de morfoespécies obtidas para cada fruto. Sendo que os espécimes vegetais de número 3, 16, 17, 19 e 25, foram os que apresentaram maior número de isolados e morfoespécies.

Tabela 3. Número de fungos endofíticos e morfotipos obtidos por indivíduo de abacaxi (*Ananascosmosus*).

Indivíduo	Nº de Isolados	Nº de Morfotipos
01	7	5
02	5	4
03	5	4
04	8	5
05	4	3
06	5	3
07	4	1
08	5	5
09	3	1
10	4	4
11	4	3
12	4	2
13	4	1
14	4	2
15	5	3
16	4	2
17	2	2
18	5	3
19	8	5
20	5	5
Total	95	-

A partir da curva de riqueza de morfoespécies por indivíduo vegetal (Figura 1), podemos visualizar o crescimento contínuo no número de morfoespécies com o aumento da amostragem sem, no entanto, se aproximar de uma parábola e, portanto, distante de uma estabilização. Isso indica a grande probabilidade de que fossem encontradas mais morfoespécies caso o esforço amostral tivesse sido maior, o que foi confirmado a partir do resultado obtido através do estimador de riqueza empregado (Jackknife1), o qual se baseia

no número de espécies que ocorrem em somente uma amostra (Figura 1). Com isso, percebemos que o método de coleta não atingiu o limite de saturação, embora tenha se adequado aos objetivos propostos neste trabalho.

Segundo Schilling & Batista (2008), o uso da relação espécie-área, ou curva de acumulação de espécies, ou curva de riqueza de espécies, para determinar a suficiência amostral em estudos fito sociológicos é uma técnica usual. A definição de um tamanho ótimo de amostra está baseado na ideia de que quanto maior o tamanho da amostra, maior o número de espécies que será encontrado, mas a uma taxa decrescente, até o ponto em que a curva estabiliza e torna-se horizontal.

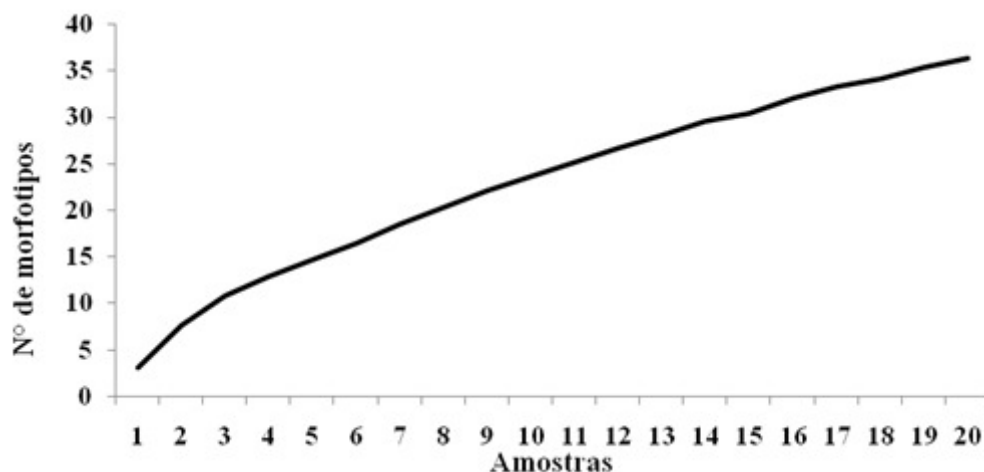


Figura 1 -Curva de riqueza de morfoespécies por indivíduo vegetal, estimador Jackknife1.

A frequência de colonização normalmente é dada em porcentagem e pode ser amplamente variável em decorrência de inúmeros fatores, como a localização geográfica da planta, as condições climáticas do local de coleta, idade e parte das plantas utilizadas (TAYLOR et al., 1999). A frequência de colonização global obtida neste trabalho para *Ananas comosus* foi de 63,1%.

Chareprasert et al. (2006) estudaram a diversidade de fungos endofíticos associados a duas espécies de plantas na Tailândia, *Tectona grandis* e *Samanea saman* Merr., levando em consideração a idade das folhas coletadas. Descobriu-se que a frequência de colonização de folhas maduras é maior do que de folhas jovens, recém-emergidas. Resultados semelhantes foram encontrados por Suryanarayanan et al. (2003), avaliando a variação temporal na assembléia endofítica de folhas de *Plumeria rubra*. Isto pode ser

explicado, porque, além das folhas maduras apresentarem uma área maior para captura de inóculo em sua superfície, elas ainda estariam expostas durante um período mais longo do que folhas jovens e, conseqüentemente, receberiam maiores quantidades de fungos.

Fatores ambientais tais como, intensidade de luz e calor, nível de precipitação, déficit hídrico, estabilidade de vetores, influenciam a colonização e permanência de micro-organismos em seus hospedeiros. Taylor et al. (1999) obtiveram frequências de colonização que variaram de 23,4 a 57,3% em *Trachycarpus fortunei*, em função do local e das condições climáticas onde a planta foi coletada.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram isoladas 95 colônias de fungos endofíticos provenientes de frutos de abacaxi (*Ananas comosus*), sendo agrupadas em 23 morfoespécies. A curva de riqueza de morfoespécies manteve-se de forma ascendente, demonstrando que não foi possível verificar a real diversidade de fungos endofíticos devido ao número amostral ou método de isolamento utilizado.

REFERÊNCIAS

ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, p. 51-66, 2007.

CARVALHO, S. P., PEREIRA, J. M., BORGES, M. S. MARIN, J. O. B. Panorama da produção de abacaxi no Brasil e comportamentos sazonal dos preços do abacaxi “pérola” comercializados na CEASA-GO. **XLVII CONGRESSO SOBER: desenvolvimentos rurais e sistemas agroalimentares: os agronegócios no contexto de integração das nações**, 2009 Porto Alegre, Brasil. 26-30.

CHAREPRASERT, S.; PIAPUKIEW, J.; THIENHIRUN, S.; WHALLEY, A.J.S.; SIHANONTH, P. Endophytic fungi of teak leaves *Tectona grandis* L. and rain tree leaves *Samanea saman* Merr. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 481-486, 2006.

CUNHA, G.A.P.; REINHARDT, D.H. MATOS, A.P.; SOUZA, L.F.S.; SANCHES, N.F.; CABRAL, J.R.S.; ALMEIDA, O.A. Recomendações Técnicas para o Cultivo do Abacaxizeiro. **Circular Técnica 73. EMPRAPA**, Cruz das Amas, BA, Dezembro, 2005.

FISHER, P. J.; ANSON, A. E.; PETRINI, O. Fungal endophytes in *Ulex europaeus* and *Ulex gallii*. **Transactions British Mycological Society**, v. 86, p. 153-193, 1986.

GUIMARÃES, D. O. **Produtos naturais de fungos endofíticos associados a espécies de Asteraceae e ensaio antibiótico no modelo de infecção em *Caenorhabditis elegans***. 2009. 186f. Tese. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Riberão Preto – Universidade de São Paulo, Riberão Preto, 2009.

JALGAONWALA, R. B.; MOHITE, B. V.; MAHAJAN, R. T. Natural products from plant associated endophytic fungi: a review. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, vol. 1, pp.21–32, 2011.

PIMENTA, R. S.; DA SILVA, J. F. M.; BUYER, J. S.; JANISIEWICZ, W. J. Endophytic Fungi from Plums (*Prunus domestica*) and Their Antifungal Activity against *Monilinia fructicola*. **Journal of Food Protection**, v. 75, p. 1883-1889, 2012.

PORRAS-ALFARO, A.; BAYMAN, P. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. **Phytopathology**, v. 49, p. 291, 2011.

REDMAN, R.S.; SHEEHAN, K.B.; STOUT, R.G.; RODRIGUEZ, R.J.; HENSON, J.M. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. **Science**, 298:158, 2002.

ROSA L. H.; GONÇALVES, V. N.; CALIGIORNE R. B.; ALVES T. M. A.; RABELLO, A.; SALES P. A.; ROMANHA, A. J.; SOBRAL M. E. G.; ROSA, C. A.; ZANI, C. L. leishmanicidal, trypanocidal, and cytotoxic activities of endophytic fungi associated with bioactive plants in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 41: 420-430, 2010.

SCHILLING, A.C.; BATISTA, J.L.F. Curva de acumulação de espécies e suficiência amostral em florestas tropicais. **Revista Brasileira de Botânica**, v.31, n.1, p.179-187, jan.-mar. 2008.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **MicrobiolMolBiol Rev**, v. 4, p. 491–502, 2003.

SURYANARAYANAN, T.S.; VENKATESAN, G.; MURALI, T.S. Endophytic fungal communities in leaves of tropical forest trees: diversity and distribution patterns. **Current Science**, v. 85, p. 489–493, 2003.

TAYLOR, J. E.; HYDE, K. D.; JONES, E. B. G. Endophytic fungi associated with the temperate palm, *Trachycarpus fortunei*, within and outside its natural geographic range. **New Phytologist**, v. 142, p. 335-346, 1999