

**Isolamento e identificação de fungos endofíticos de *Passovia stelis*  
(*Loranthaceae*)****Isolation and identification of endophytic fungi of *Passovia stelis*  
(*Loranthaceae*)**

DOI:10.34115/basrv4n3-041

Recebimento dos originais: 05/04/2020

Aceitação para publicação: 18/05/2020

**Sarah Simões da Silva**

Bacharela em Química Industrial pela Universidade Federal do Amazonas

Instituição: Universidade Federal do Amazonas - ICET

Endereço: Rua Nossa Senhora do Rosário, 3863 – Tiradentes, Itacoatiara –AM, CEP:  
69100-000

Email: sarahsimoes94@gmail.com

**Maria Beatriz Silva Costa**Mestre em Ciência e Tecnologia para Recursos Amazônicos pela Universidade Federal  
do Amazonas

Instituição: Universidade Federal do Amazonas - ICET

Endereço: Rua Nossa Senhora do Rosário, 3863 – Tiradentes, Itacoatiara –AM, CEP:  
69100-000

Email: mariabeatrizsilvacosta@gmail.com

**Antônia Queiroz Lima de Souza**

Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de São Carlos

Instituição: Universidade Federal do Amazonas

Endereço: Av. General Rodrigo Otávio Jordão Ramos, 1200- Coroado I, Manaus- AM,  
CEP: 69067-005

Email: antoniaqlsouza@gmail.com

**Welma Sousa Silva Carneiro**

Doutora em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Federal de Goiás

Instituição: Universidade Federal do Amazonas - ICET

Endereço: Rua Nossa Senhora do Rosário, 3863 – Tiradentes, Itacoatiara –AM, CEP:  
69100-000

Email: welmabio@gmail.com

**Camila Martins de Oliveira**

Doutora em Química pela Universidade Estadual Paulista - Araraquara

Instituição: Universidade Federal de Rondonópolis

Endereço: Av. dos Estudantes, 5055- Cidade Universitária, Rondonópolis – MT, CEP:  
78736-900

Email: camila.ufr.icen@gmail.com

**RESUMO**

A floresta amazônica é constituída de uma vasta quantidade de matérias-primas, no entanto, os microrganismos endofíticos que a compõem ainda são pouco estudados. Seus metabólitos secundários bioativos possuem aplicações potencialmente úteis na agricultura, indústria e especialmente, no ramo farmacêutico. As plantas da família Loranthaceae, popularmente conhecidas como ervas-de-passarinho, têm sido reconhecidas há muito tempo como portadoras de propriedades terapêuticas, e a espécie *Passovia stelis* é amplamente encontrada na região Amazônica. Assim, o presente trabalho teve por objetivo isolar os fungos endofíticos das folhas e caule de *P. stelis*. As amostras vegetais foram submetidas à assepsia superficial, fragmentadas e inoculadas em placas de Petri contendo meios de cultura BDA, Ágar Aveia e Ágar ISP2 até o crescimento dos fungos, que foram repicados sucessivamente até purificação. Os isolados fúngicos foram analisados macro e micromorfológicamente, e posteriormente preservados em tubos criogênicos, tubos inclinados, palito e água destilada. Foram isolados 104 fungos endofíticos, dos quais 73 foram identificados como pertencentes aos gêneros *Guignardia* sp., *Phomopsis* sp., *Xylaria* sp. e *Colletotrichum* sp.. Os resultados obtidos neste estudo apresentam a diversidade de fungos endofíticos existentes nos tecidos vegetais da *P. stelis*, contribuindo para ampliação do conhecimento sobre a microbiota endofítica fúngica de espécies de Loranthaceae.

**Palavras chave:** Loranthaceae, Microrganismos, Diversidade.

**ABSTRACT**

The Amazon rainforest consists of a vast amount of raw materials, however, the endophytic microorganisms that comprise it are still poorly studied. Its secondary bioactive metabolites have potentially useful applications in agriculture, industry and especially in the pharmaceutical industry. Plants of the Loranthaceae family, popularly known as bird-weeds, have long been recognized as having therapeutic properties, and the species *Passovia stelis* is widely found in the Amazon region. Thus, the present study aimed to isolate the endophytic fungi from the leaves and stem of *P. stelis*. The vegetable samples were subjected to superficial asepsis, fragmented and inoculated in Petri dishes containing culture media BDA, Agar Oat and Agar ISP2 until the growth of the fungi, which were repeated successively until purification. The fungal isolates were analyzed macro and micromorphologically, and later preserved in cryogenic tubes, inclined tubes, toothpick and distilled water. 104 endophytic fungi were isolated, 73 of which were identified as belonging to the genera *Guignardia* sp., *Phomopsis* sp., *Xylaria* sp. And *Colletotrichum* sp. . The results obtained in this study show the diversity of endophytic fungi existing in the plant tissues of *P. stelis*, contributing to the expansion of knowledge about the fungal endophytic microbiota of Loranthaceae species.

**Keywords:** Loranthaceae, Microorganisms, Diversity.

**1 INTRODUÇÃO**

Brasil possui cerca de 20% da biodiversidade global, sendo a floresta amazônica, a maior do mundo, com matérias-primas nas mais diversas áreas. Todavia, as espécies que a compõem e suas interações filogenéticas são pouco compreendidas, inclusive seus microrganismos e suas relações com outros seres vivos (Santos *et al.*, 2013).

Os endófitos (do grego, *endon*: dentro de; *phyton*: planta) (Sudha *et al.*, 2016), são aqueles microrganismos que habitam a parte interna da planta, sendo encontrados em folhas, ramos e

raízes, podendo ocupar espaços inter e intracelulares. Em geral, os fungos endofíticos adentram as plantas por meio de lesões naturais e artificiais, e provavelmente estão presentes em todas as plantas, sendo que uma planta pode conter centenas deles (Calderani *et al.*, 2016), e pelo menos um é específico ao hospedeiro (Chapla *et al.*, 2013).

Estes microrganismos são fontes facilmente renováveis e reprodutíveis quando comparados com outras fontes naturais, como plantas e animais (Specian *et al.*, 2014). Os fungos endofíticos, em especial, são fontes promissoras de substâncias naturais novas e são capazes de produzir um grande número de importantes metabólitos secundários bioativos, conhecidos apenas em plantas (Chapla *et al.*, 2013; Soares e Pimenta, 2015).

Os metabólitos secundários são compostos que comumente apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular e atividades biológicas marcantes (Calderani *et al.*, 2016) pertencentes a diversas classes químicas, como policetídeos, alcalóides, terpenos e peptídios não ribossomais (Canuto *et al.*, 2012).

As plantas pertencentes à família Loranthaceae têm sido reconhecidas como portadoras de propriedades terapêuticas, que possui uma distribuição pantropical, compreende 73 gêneros e 800 espécies, sendo 12 gêneros e 131 espécies pertencentes à flora brasileira. Os gêneros *Passovia*, *Psittacanthus* e *Struthanthus* são mais diversificados na flora brasileira quando comparados aos de outros países da América do Sul, no entanto, pouco estudada. Quanto à disposição geográfica no Brasil, alguns gêneros são tipicamente tropicais e generalizados, tais como *Passovia*, *Psittacanthus* e *Struthanthus*, enquanto outros têm distribuições restritas, por exemplo, *Cladocolea*, *Gaiadendron*, *Peristethium*, *Phthirusa*, *Oryctanthus*, *Oryctina* e *Pusillanthus*. Esses gêneros são encontrados principalmente na Amazônia, mas *Pusillanthus* e *Oryctina* também habitam Caatinga (Arruda *et al.*, 2012).

A espécie vegetal *Passovia stelis* recebe o nome popular de “erva-de-passarinho” devido ao expressivo número de espécies, cuja dispersão é feita sobretudo por aves, havendo uma estreita relação entre o grupo de plantas e as aves (Vasconcelos e Melo, 2015). As pseudobagas sulcosas atraem-nas e são avidamente ingeridas (Conceição *et al.*, 2010). A semente, após passar pelo trato digestório das aves, é eliminada com as fezes e ao cair sobre a casca de alguma árvore, geralmente, germina. A erva-de-passarinho se fixa nos galhos e troncos da planta hospedeira, se desenvolvendo vigorosamente e ocupando partes localizadas ou quase a totalidade da copa (Caires *et al.*, 2009). A *P. stelis* é utilizada na medicina popular como adstringente para as moléstias uterinas, antidiarreica, abortiva, hemostática, antiasmática, antileucorréica, contra a bronquite, afecções das vias respiratórias, tosses, pneumonia, antidiabética, anti-hemorrágica e cicatrizante (Paes *et al.*, 2010).

Por conseguinte, este trabalho teve como objetivo isolar os fungos endofíticos das folhas e caule de *Passovia stelis*, podendo assim, contribuir para futuras pesquisas sobre o isolamento de fungos endofíticos associados a espécies da família Loranthaceae, sendo justificável pela carência de informações na literatura sobre a espécie em questão e microbiota fúngica endofítica que nela habita.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 COLETA DAS AMOSTRAS**

Foram coletados em março de 2017, quatro folhas e um pedaço de caule aparentemente saudáveis da espécie vegetal *P. stelis*, que encontrava-se parasitando uma planta localizada no estacionamento da Universidade Federal do Amazonas - UFAM em Manaus (3°05'26.6"S e 59°57'52.6"W). Em seguida, as amostras foram acondicionadas em sacos plástico e transportadas para o Laboratório de Bioensaios e Micro-organismos da Amazônia – LABMICRA do Centro de Apoio Multidisciplinar – CAM – Central Analítica/UFAM, onde foi realizado todo o trabalho.

### **2.2 DESINFECÇÃO DAS AMOSTRAS E ISOLAMENTO DOS FUNGOS ENDOFÍTICOS**

Após a coleta, as amostras foram lavadas com detergente líquido e água corrente em abundância afim de remover as impurezas superficiais. Para o isolamento dos fungos endofíticos foi utilizada uma adaptação das metodologias descritas por Maier (1997) e Souza (2006). A remoção dos microrganismos epifíticos foi realizada em câmara de fluxo laminar, mediante a imersão sequencial das folhas em álcool 70% (1 minuto), hipoclorito de sódio 2,5 % (1 minuto) e novamente álcool 70% (1 minuto), seguida de lavagem em água destilada estéril. O caule foi imerso sequencialmente em álcool 70% (3 minutos), hipoclorito de sódio 2,5 % (3 minutos) e em álcool 70% (3 minutos), seguido também de lavagem em água destilada estéril.

Com o auxílio de um bisturi e uma pinça, ambos estéreis, tanto folhas quanto caule foram cortados em pequenos fragmentos e inoculados na forma de matriz (2 x 2) (4 fragmentos por placa) em placas de Petri contendo meios de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar), Ágar Aveia (aveia, extrato de levedura, extrato de malte, ágar e dextrose) e Ágar ISP2 (amido, extrato de levedura, extrato de malte, ágar e dextrose), acrescidos de ampicilina com tetraciclina (200µg.mL<sup>-1</sup>) e fluconazol, para evitar o crescimento de contaminantes. As placas foram incubadas em estufa BOD à 18 °C por 8 dias e posteriormente, à 26 °C. Durante todo esse período, foi observado o crescimento dos fungos e, conforme estes cresciam nas placas, foram realizados repiques sucessivos até que fosse obtido colônias puras.

Posteriormente, os isolados fúngicos foram agrupados por suas semelhanças macromorfológicas e alguns destes, foram analisados micromorfológicamente utilizando o lactofenol azul-algodão e microscópio ótico, onde foram observadas as presenças ou ausências das estruturas reprodutivas.

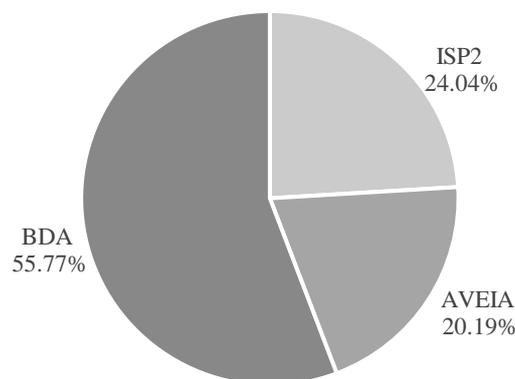
Os fungos endofíticos isolados da *P. stelis* foram preservados em tubos de ensaio contendo meio de cultura inclinado, recoberto com óleo mineral (*slant*); palito dentro de tubo de ensaio, que por sua vez foi inserido em tubo Falcon; água destilada (*Castellani*) e tubos criogênicos contendo glicerol 20%.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta pesquisa foram isolados 104 fungos endofíticos da espécie vegetal *P. stelis*, dos quais 80 foram obtidos a partir das folhas e 24 do caule.

Na análise dos dados coletados, foi observado que o maior percentual de fungos endofíticos cresceram em meio de cultura BDA (55,77 %), seguido de Ágar ISP2(24,04 %) e Ágar Aveia (20,19 %) (Figura 1). Semelhantemente a estes resultados, foram expostos no trabalho realizado por Almeida (2014), que isolou 59 %, 29 % e 12 % nos meios de cultura BDA, Ágar ISP2 e Ágar Aveia, respectivamente, de fungos endofíticos das folhas, galhos, caule e raiz de *Gustavia* sp. (Lecythidaceae). Percebe-se em ambos os resultados uma preferência dos endófitos pelo meio de cultura BDA.

Figura 1- Percentagem de fungos endofíticos isolados da *Passovia stelis* em relação aos meios de cultura.



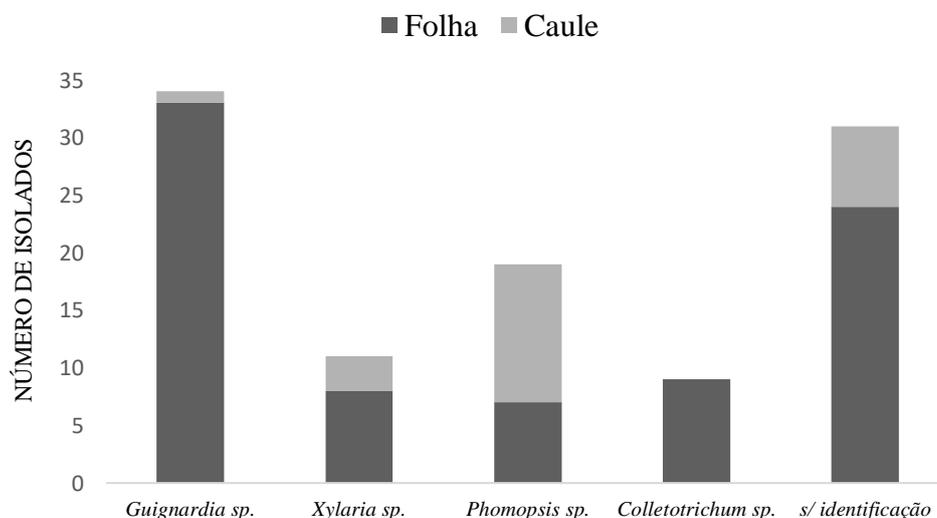
Dos 104 fungos endofíticos isolados das folhas e caule da *P. stelis*, 73 foram identificados como pertencentes aos gêneros *Guignardia* sp., *Phomopsis* sp., *Xylaria* sp.

e *Colletotrichum* sp., com destaque para o gênero *Guignardia* sp., o qual apresentou a maior frequência dentre os isolados, seguido de *Phomopsis* sp., *Xylaria* sp. e *Colletotrichum* sp., respectivamente. Os 31 isolados fúngicos restantes não puderam ser macro e micromorfológicamente identificados devido à ausência de estruturas reprodutivas passíveis de reconhecimento ao microscópio ótico (Figura 2).

De modo geral, a quantidade de isolados fúngicos a partir das folhas foi maior que do caule, reafirmando que dentre os tecidos vegetais, as folhas são mais colonizadas devido aos tecidos mais frágeis e também aos estômatos; possíveis portas de entrada para tais microrganismos (Souza *et al.*, 2004), o que explicaria a diversidade de fungos endofíticos isolados deste órgão vegetal.

Paes *et al.* (2010) avaliaram a microbiota fúngica endofítica existente nas folhas e caules de espécies de *Phthirusa Pyrifolia* (Loranthaceae), que parasitavam *Mangifera indica* L. (mangueira) e *Theobroma cacao* (cacau). Os resultados apontaram, de forma similar ao presente estudo, as folhas como a estrutura vegetal mais habitada pelos endófitos, sendo isolados das folhas, 39% da *P. Pyrifolia* que parasitava *M. indica* e 34% da *P. Pyrifolia* que parasitava *T. cacao*, enquanto que a partir do caule, foram isolados 26% da *P. Pyrifolia* que parasitava *T. cacao* e 27% da *P. Pyrifolia* que parasitava *M. indica*. Quanto aos gêneros isolados, não houveram semelhantes aos gêneros identificados neste estudo, a saber, *Aspergillus*, *Penicillium* e micélio estéril.

Figura 2 - Distribuição dos fungos endofíticos isolados da *Passovia stelis* segundo tecido vegetal utilizado.



**4 CONCLUSÕES**

Foram isolados um total de 104 fungos endofíticos das folhas e caule de *Passovia stelis*, dos quais 73 foram identificados como pertencentes aos gêneros *Guignardia* sp., *Phomopsis* sp., *Xylaria* sp. e *Colletotrichum* sp. Os endófitos isolados foram codificados e disponibilizados ao acervo de fungos endofíticos do Grupo de Estudos Químicos e Biológicos de Microrganismos da Amazônia – EQUIBIM, podendo ser utilizados para estudos posteriores.

**AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem o apoio financeiro do Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – INCT BioNat, processo n° 465637/2014-0.

**REFERÊNCIAS**

Almeida M. F. O. 2014. *Estudos químicos e biológicos de fungos endofíticos de Gustavia* sp. Manaus, Brasil. (Tese Doutorado. Universidade Federal do Amazonas. UFAM). 195f. Disponível em: <<https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/5191>>. Acesso em: 10 abr. 2018.

Arruda R. *et al.* 2012. Ecology of neotropical mistletoes: an important canopy-dwelling component of Brazilian ecosystems. *Acta Botânica Brasileira*, 26 (2) : 264-274. . Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-33062012000200003](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-33062012000200003)>. Acesso em: 08 abr 2017.

Caires C. S. *et al.* 2009. Frugivoria de larvas de *Neosilba* McAlpine (Diptera, Lonchaeidae) sobre *Psittacanthus plagiophyllus* Eichler (Santalales, Loranthaceae) no sudoeste de Mato Grosso do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Entomologia*, Mato Grosso do Sul, 53 (2): 272-277. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0085-56262009000200009](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0085-56262009000200009)>. Acesso em: 08 abr 2017

Calderani F. A., Orlandelli R. C., Pamphile J. A. 2016. Compostos bioativos com propriedades antitumorais produzidos por fungos endofíticos: a Review. *Revista Uningá*, 25(2): 79-86. Disponível em: <<http://revista.uninga.br/index.php/uningareviews/article/view/1756>>. Acesso em: 28 jan. 2018.

Canuto K. M. *et al.* 2012. Fungos Endofíticos: Perspectiva de Descoberta e Aplicação de Compostos Bioativos na Agricultura. *Embrapa Agroindústria Tropical*, Fortaleza, vol.1. . Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/951754/fungos->

endofiticos-perspectiva-de-descoberta-e-aplicacao-de-compostos-bioativos-na-agricultura >. Acesso em: 08 abr 2017.

Chapla V. M., Biassetto C. R., Araújo A. R. 2013. Fungos endofíticos: uma fonte inexplorada e sustentável de novos e bioativos produtos naturais. *Revista Virtual de Química*, 5(3): 421-437. Disponível em:<  
<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/seminabio/article/view/8241>>. Acesso em: 10 abr. 2018.

Conceição G. M. *et al.* 2010. Erva-de-Passarinho: substratos vegetais, uso e aplicações na medicina popular. *Scientia Plena*, Maranhão, 064501. Disponível em:<  
<https://www.scienciaplena.org.br/sp/article/view/24>>. Acesso em: 08 abr 2017.

Maier W. 1997. Accumulation of sesquiterpenoid cyclohexenone derivatives induced by *Arbuscular Mycorrhizal* fungus in members of the Poaceae. *Planta*, 202(I): 36- 42.

Paes L. S. *et al.* 2010. Levantamento da microbiota fúngica endofítica de *Phthirusa pyrifolia* Kunth com caracterização anatômica dos tecidos colonizados. *Revista Igapó*, 4(1). Disponível em: <<http://200.129.168.183/ojs/index.php/igapo/article/view/224> >. Acesso em: 11 maio 2018.

Santos T. T., Varavallo M. A. 2011. Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, 32(2): 199-212. Disponível em:< DOI: 10.5433/1679-0367.2011v32n2p199>. Acesso em: 10 abr. 2018.

Soares D. A., Pimenta, R. S. 2015. Avaliação da atividade antimicrobiana de pigmentos extracelulares produzidos por fungos endofíticos. *Journal of Bioenergy and Food Science*, Macapá, 2(4) :152-155. Disponível em:<[https://www.researchgate.net/publication/289555409\\_Avaliacao\\_da\\_atividade\\_antimicrobiana\\_de\\_pigmentos\\_extracelulares\\_produzidos\\_por\\_fungos\\_endofiticos](https://www.researchgate.net/publication/289555409_Avaliacao_da_atividade_antimicrobiana_de_pigmentos_extracelulares_produzidos_por_fungos_endofiticos)>. Acesso em: 08 abr 2018.

Souza A. Q. L. 2006. *Potencial genético e químico dos endófitos de Murraya paniculata L. (Jack)*. São Carlos, Brasil. (Tese doutorado em Ciências Biológicas. Universidade Federal de São Carlos. UFSC). 155f. Disponível em:<  
<https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/5364?show=full>>. Acesso em: 10 abr. 2018.

## **Brazilian Applied Science Review**

Souza A. Q. L. *et al.* 2004. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazônica*, 34(2): 185-195. Disponível em:<[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0044-59672004000200006&script=sci\\_abstract](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0044-59672004000200006&script=sci_abstract)>. Acesso em: 11 maio 2018.

Specian V. *et al.* 2014. Metabólitos secundários de interesse farmacêutico produzidos por fungos endofíticos. *UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde*, 16 (4) : 345-351. Disponível em:< <http://www.pgsskroton.com.br/seer/index.php/JHealthSci/article/view/393>>. Acesso em: 08 abr 2017.

Sudha V. *et al.* 2016. Biological properties of Endophytic Fungi. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, vol. 59: e16150436. Disponível em:<[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-89132016000100413&script=sci\\_abstract](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-89132016000100413&script=sci_abstract)>. Acesso em: 10 maio 2018.

Vasconcelos G. C. L., Melo J. I. M. 2015. Flora of the state of Paraíba, Brazil: Loranthaceae Juss. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, Maringá, 37 (2) : 239-250. Disponível em:<<http://www.redalyc.org/html/1871/187141162014/>>. Acesso em: 08 abr 2017.