



Identification of endophytic fungi associated with plants from the Alagoas Semi-arid, Brazil

Identificação de fungos endofíticos associados a plantas do Semiárido Alagoano

SILVA, Livia Ribeiro da ⁽¹⁾; SILVA, Maria Clariana da ⁽²⁾; JESUS, Évelly Vitória Oliveira de ⁽³⁾; COSTA, Maria Eduarda Lino da ⁽⁴⁾; SILVA, Paula Cibelly Vilela da ⁽⁵⁾; SILVA, João Manoel da ⁽⁶⁾.

⁽¹⁾ [ORCID: 0009-0000-6850-7383](https://orcid.org/0009-0000-6850-7383), Universidade Federal de Alagoas, discente e pesquisadora, Maceió-Alagoas (AL), Brazil, ribeirolivia1508@gmail.com;

⁽²⁾ [ORCID: 0009-0001-7405-7830](https://orcid.org/0009-0001-7405-7830), Universidade Federal de Alagoas, discente e pesquisadora, Maceió-Alagoas (AL), Brazil, maria.clariana@ceca.ufal.br;

⁽³⁾ [ORCID: 0009-0009-4115-0420](https://orcid.org/0009-0009-4115-0420), Universidade Federal de Alagoas, Zootecnista, pesquisadora, Maceió-Alagoas (AL), Brazil, vitoriaevelly61@gmail.com;

⁽⁴⁾ [ORCID: 0000-0001-5359-0639](https://orcid.org/0000-0001-5359-0639), Universidade Federal de Alagoas, graduanda, pesquisadora, União dos Palmares-Alagoas (AL), mariaeduardacosta54@hotmail.com;

⁽⁵⁾ [ORCID: 0000-0003-2157-4698](https://orcid.org/0000-0003-2157-4698), Universidade Federal de Alagoas, doutoranda e pesquisadora, Maceió-Alagoas(AL), Brazil, paulacibelly17@gmail.com;

⁽⁶⁾ [ORCID: 0000-0002-7654-5475](https://orcid.org/0000-0002-7654-5475), Instituto Federal de Alagoas, Santana do Ipanema, -Alagoas (AL), Brazil, jm.agro@hotmail.com. O conteúdo expresso neste artigo é de inteira responsabilidade dos/as seus/as autores/as.

ABSTRACT

In the semi-arid region of Alagoas, there are difficulties for small producers to provide food for animal production, water scarcity is one of the challenges faced and causes significant damage. However, lack of conservation and lack of knowledge are factors that attribute to overheating and lack of rainfall. By combining these factors, there is a need to study and prove the importance of these tree species not only in maintaining natural ecosystems, but also in improving the quality of animal production. Through the micro cultivation method, the primary identification of the endophytes was carried out, according to the Anvisa Manual (2004) for the identification of filamentous fungi. Morphological and microscopic aspects and sporulation patterns were observed. The fungi were isolated in sterile Petri dishes and, after purification, they were placed on slides with PDA agar blocks. After 3 days, the slides were removed for observation under an optical microscope. From this, the sporulation structures were consulted through bibliographic references such as atlases and manuals for the identification of the genus of endophytes, making it possible to identify the genera *Aspergillus* spp and *Penicilium* spp. Proving the importance of biological richness of tree species, as they have several biotechnological applications.

RESUMO

Na região do semiárido alagoano existem dificuldades para os pequenos produtores em fornecerem alimento para produção animal, a escassez de água é um dos desafios enfrentados e causa prejuízos significativos. No entanto, a falta de conservação e o desconhecimento, são fatores que atribuem ao superaquecimento e escassez da precipitação das chuvas. Ao combinar esses fatores, surge a necessidade de estudar e comprovar a importância dessas espécies arbóreas não apenas na manutenção dos ecossistemas naturais, mas também na melhoria da qualidade da produção animal. Através do método de micro cultivo, foi realizada a identificação primária dos endófitos, segundo o Manual da Anvisa (2004) para a identificação de fungos filamentosos. Foram observados os aspectos morfológicos, microscópicos e padrões de esporulação. Em placas de Petri estéreis foram isolados os fungos e após purificação foram colocados em lâminas, com blocos de ágar BDA. Esperados 3 dias, foram retiradas as lâminas para observação em microscópio óptico. A partir disso, foi feita a consulta das estruturas de esporulação mediante a referências bibliográficas como atlas e manuais para a identificação do gênero dos endófitos, sendo possível identificar os gêneros *Aspergillus* spp e *Penicilium* spp. Comprovando a importância de riqueza biológica das espécies arbóreas, pois os tais, possuem diversas aplicações biotecnológicas.

INFORMAÇÕES DO ARTIGO

Histórico do Artigo:

Submetido: 20/06/2023

Aprovado: 15/05/2024

Publicação: 28/06/2024



Keywords:

micro cultivation, riparian forests, filamentous fungi

Palavras-Chave:

microcultivo, matas ciliares, fungos filamentosos

Introdução

O semi árido Brasileiro (SAB) representa uma das regiões mais vulneráveis do País, às mudanças e à variabilidade do clima, sobretudo aquelas associadas às secas é às enchentes (Marengo *et al.*, 2011). A partir de uma análise visual, Marengo mapeou o cenário nordestino, projetado pelo modelo regional Eta-CPTEC, e dos modelos globais do IPCC AR4, as mudanças na umidade do ar, e extremos térmicos, irão predominar, além dos possíveis distúrbios nas distribuições de chuva no futuro.

Neste contexto, para Marengo *et al.*(2011) a tendência geral seria de um clima com menor umidade do ar, redução de precipitação e elevação na deficiência hídrica, como resultado das elevações na temperatura do ar, pois o aumento paulatino de evaporação no Nordeste, transigindo com as alterações no equilíbrio natural de um ecossistema, condicionam a sua capacidade de fornecer serviços ambientais, ou seja, os subsídios que os seres humanos podem usufruir desse ambiente (Brambilla, 2016).

É notável a importância da biodiversidade e os estudos que gerem interesse na conservação da mesma, pois a importância da manutenção de matas ciliares está descrita no art. 225 da Constituição Federal, que se trata do direito de todos ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, de uso habitual do povo ser fundamental para promover bem-estar (Dallas Rosa, 2013). Além disso, há o valor econômico oportuno ao uso dos recursos naturais e biológicos, tais como alimentos, medicamentos e construção, entre outros (Jakievicius, 2011).

Visto que, o isolamento destes micro-organismos pode fomentar diversos produtos biotecnológicos, benéficos a agropecuária, como controle biológico (Thambugala *et al.*, 2020), Biorremediação, Bioproteção e Bioestimulação (Owen *et al.*, 2015), além de saúde pública, pois plantas como Quixabeira e Angico são espécies de grande importância nos estudos farmacológicos para que possam ser conduzidos fitoterápicos (Paulino *et al.*,2012).

Desta forma, alguns autores (Strobel & Daisy, 2003; Gunatilaka, 2006), comprovaram que certos fungos endofíticos produzem compostos tal qual suas plantas hospedeiras, como enzimas (celulases e ligninases) em *Xylaria* sp., fatores de crescimento como a giberelina em *Fusarium moniliforme*, substâncias antitumorais como o taxol em *Taxomyces andreanae*, antibiótico como *Penicillium* entre outros.

De acordo com Wallace (1994), o uso de *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus oryzae*, ou seus extratos, tem potencial para elevar o ganho em ruminantes a aumentar a produção em animais leiteiros, com potencial equivalente aos ionóforos, em virtude do resultado no aumento na ingestão de matéria seca. Entretanto, as respostas são variáveis e dependem da quantidade oferecida e do tipo de dieta. Segundo Krishnamoorthy *et al.* (1996), a utilização de aditivos a partir de leveduras nas dietas de ruminantes, causam alterações na

ração acetato/propionato além de elevar o fluxo de proteína microbiana para o intestino delgado.

Conforme destacado por Hermosa *et al.* (2014), o gênero *Trichoderma* está análogo com a habilidade de produzir uma diversidade de metabólitos secundários, com o intuito de colaborar com o crescimento e desenvolvimento de plantas, inibição de micro-organismos, resposta à estresses bióticos e abióticos, biorremediação, defesa contra patógenos e controle biológico. Adicionalmente, Ulhoa & Peberdy (1992) ressaltaram, que esta atividade de biocontrole, ocorre através da síntese de enzimas hidrolíticas extracelulares que deterioram parede celular, tais como celulasas e quitinases. Melo (1998) afirmou que fungos do gênero *Trichoderma* possuem capacidade de biossintetizar e ainda facilidade de crescimento em meios simples, possuindo glicose como fonte de carbono e alguns tipos de compostos orgânicos simples.

Além disso, as xilanases são produzidas pelo Gênero *Aspergillus*, como afirma Zaneti (2012), estas enzimas possuem vasta utilização no agronegócio como na fabricação de rações animais, adicionando algumas outras enzimas, como glucanases, pectinases, celulasas, proteases, amilases e lipases. Para Costa *et al.* (2004) essas enzimas têm a característica de possuir elevada produção, com menos custos e aumento na variabilidade e estabilidade, além de a degradar os carboidratos da parede celular dos vegetais auxiliando na absorção desses nutrientes no organismo do animal.

Metodologia

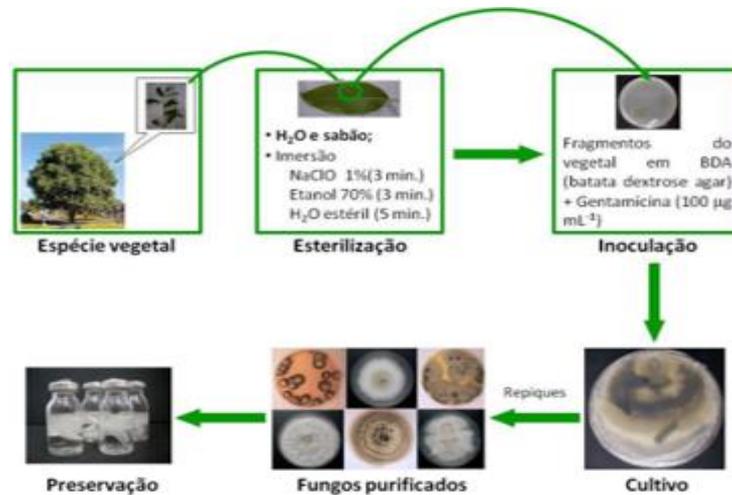
A coleta das folhas mais novas de cada espécie, foi realizada nas proximidades das coordenadas -9.491277, -37.755271, na Fazenda Ribeiro, AL-220 - Piranhas, AL, 57460-000, numa área de aproximadamente 210 m². Foram coletadas folhas de Quixabeira (*Bumelia sertorum*), Angico Vermelho (*Anadenanthera macrocarpa*), Pereiro (*Aspidosperma pyrifolium*) e Imburana (*Commiphora leptophloeos*). Logo após, as amostras foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis, que foram mantidos sob refrigeração até a manhã seguinte, para serem transportados para o Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), no Campus de Engenharias e Ciências Agrárias (CECA), onde as amostras foram desinfetadas.

Para desinfecção, as amostras sadias de tecidos vegetais foram lavadas sequencialmente com álcool 70% (30 segundos), hipoclorito de sódio 1% (3 minutos), etanol 70% (30 segundos) e duas vezes com água destilada esterilizada (6 minutos), segundo método de Petrini (1991), demonstrado na figura 1. As amostras vegetais desinfetadas superficialmente foram cortadas em fragmentos pequenos de 1x1 cm² distribuídos sobre meio de Batata-Dextrose-agar (BDA), em placas de Petri estéreis. As placas foram incubadas em temperatura

ambiente até o crescimento dos fungos ser visível e preservados em tubos estéreis de 10ml com BDA.

Figura 1.

Esquema do método de Petrini

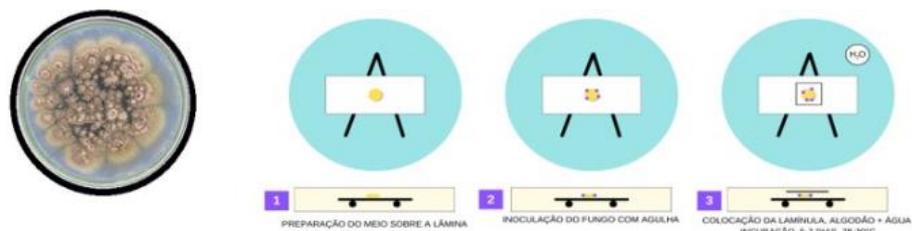


Nota: Chapla et al., 2013.

Após a visualização do crescimento dos fungos purificados, estes foram submetidos à técnica de micro cultivo seguindo a metodologia de Kern e Blevens (1999), esquematizado na figura 2. Para cada colônia de fungo isolada, duas placas de micro cultivo foram preparadas. Foi acomodada uma lâmina esterilizada sobre um pequeno bastão de vidro recurvado, contida em uma placa de Petri estéril, forrada com papel de filtro autoclavado e umedecido em água destilada, contendo também um fragmento em cubo de Batata-Dextrose -Ágar.

Figura 2.

Esquema do método de micro cultivo



Nota: Elaborado pelo autor (2023).

Para que os fungos fossem inoculados nos quatro cantos do cubo de ágar nos diferentes meios, as lâminas foram recobertas com lamínulas esterilizadas. As placas foram tampadas e incubadas à 30°C por 3 a 5 dias, e ficaram em observação para avaliação do crescimento com ou sem pigmentação. Após este período, as lamínulas foram retiradas cuidadosamente com auxílio de uma pinça.

O cubo de ágar foi desprezado e, em seu lugar, pingou-se uma gota de corante Azul de Metileno, depois disso uma lamínula foi colocada, para visualização das estruturas. Assim, foram observados por microscopia: colônia, micélio, estruturas de esporulação, forma dos

esporos e coloração. Logo, com base na morfologia da cepa e seguindo o Manual de Identificação de Fungos, descrita na figura 3, a identificação inicial do microrganismo pôde ser executada (Oliveira, 2019).

Figura 3.

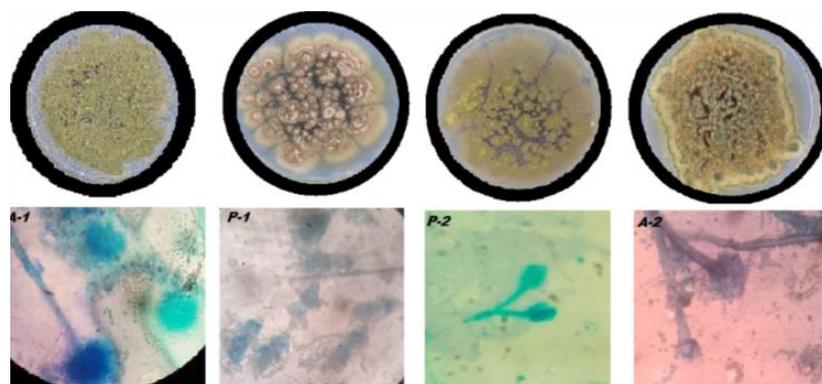


Nota: Elaborado pelo autor (2023).

Resultado e Discursão

Após o tempo de incubação dos micro-organismos em placas de Petri, apresentando crescimento suficiente para melhor análise visual de suas estruturas morfológicas, foram separadas para serem capturadas em fotografias. Das mesmas placas, foram preparadas lâminas, coradas com azul de metileno, para micro cultivo e posterior observação ao microscópio óptico. A figura 4 mostra cada isolado, estes foram nomeados, tais como A-1 e A-2, onde os do gênero *Aspergillus* isolados das folhas de Quixabeira e Angico Vermelho respectivamente, enquanto as P-1 e P-2 do gênero *Penicillium* isolados a partir das folhas de Imburana e Pereiro respectivamente.

Figura 4.



Nota: Elaborado pelo autor (2023).

As imagens circulares são referentes a fotos tiradas através de lupa, logo abaixo as respectivas imagens de microscopia, que mostram hifas, conidióforos, conídios e esporos. As nomeadas como A-1 e A-2 trata do gênero *Aspergillus*, já P-1 e P-2 do gênero *Penicillium*

Por ser o único e exclusivo bioma brasileiro de fato, a Caatinga possui necessidade gritante de ser conservada, visando a manutenção do seu alto grau de endemismo e riqueza de espécies pois, a ação antrópica, principal causa de sua degradação, continua acentuada, de forma que o uso inadequado e insustentável de seus recursos naturais coloca em risco este bioma (Santos, 2021). No presente estudo, foram obtidos 4 isolados morfológicamente distintos, sendo possível a identificação dos gêneros: *Aspergillus* e *Penicillium*, por meio da visualização de suas estruturas morfológicas como esporos, hifas e conídios.

O gênero *Penicillium*, é apresentado na literatura por promover o crescimento em plantas, como descreve El-Sharkawy *et al.* (2017), através da produção e síntese de hormônios vegetais como as giberelinas ou até por mecanismos indiretos que corroboram para uma nutrição eficaz das plantas, como a solubilização de fosfato.

Atualmente, só tem ampliado a procura das indústrias para o uso de espécies fúngicas que sintetizem enzimas fermentativas a partir de produtos com baixo valor agregado, além de serem utilizadas na decomposição de resíduos industriais. Algumas espécies do gênero *Aspergillus spp*, são fundamentais para utilização na fermentação de produto alimentício e ainda na produção de ácidos orgânicos, metabólitos secundários, enzimas e na biotransformação de químicos (Samson & Varga, 2009).

A utilização de *Aspergillus niger*, é eficiente em fármacos, em função da sua capacidade de biotransformação. Procedimento este, que inovou a indústria farmacêutica, pois causam menos efeitos adversos e prejudiciais aos seres humanos que necessitam de melhores condições de vida (Pollard & Woodley, 2007). De forma que, os dados aqui apresentados fomentam subsídios para futuros estudos mais perscrutados sobre as interações micro-organismos-plantas e suas aplicações biotecnológicas nas mais diversas áreas.

Conclusão

Desta forma, pôde-se comprovar que as espécies de plantas endêmicas às matas ciliares, a partir das quais foram isolados os fungos endofíticos, são hospedeiras de fungos dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, conferindo as espécies alto valor biológico, farmacológico e econômico. Assim, este trabalho cumpre a função (com diversas argumentações) de comprovar a necessidade de conservação das espécies arbóreas utilizadas no experimento. Outrossim, há necessidade de continuidade dos estudos sobre o bioma Caatinga, a fim de fornecer aos pequenos produtores uma educação ambiental, através de órgãos públicos como EMATER, para que haja um maior entendimento sobre a importância da conservação na mata nativa.

REFERÊNCIAS

Brambilla, M. (2016). Análise econômica de cenários de operação de reservatórios considerando o hidrograma ambiental para o baixo curso do rio São Francisco.

- Dissertação apresentada à Escola Politécnica da Universidade Federal da Bahia, em Meio Ambiente, Águas e Saneamento, 157.
- Costa, F. G. P., Clementino, R. H., Jácome, I. M. T. D., do Nascimento, G. A. J., & Pereira, W. E. (2004). Utilização de um complexo multienzimático em dietas de frangos de corte. *Ciência Animal Brasileira*, 5(2), 63-71.
- Dalla Rosa, M. (2013). A Importância das Matas Ciliares na Tutela Jurídica dos Corpos D'água. *Journal of Law and Sustainable Development*, 1(1), 53-84.
- El-Sharkawy, I., Sherif, S., Abdulla, M., & Jayasankar, S. (2017). Plum fruit development occurs via gibberellin-sensitive and-insensitive DELLA repressors. *PLoS One*, 12(1), e0169440.
- Freire, K. T. L. S., Araújo, G. R., Bezerra, J. D. P., Barbosa, R. N., Silva, D. C. V., Svedese, V. M., ... & Souza-Motta, C. M. (2015). Fungos endofíticos de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.(Cactaceae) sadia e infestada por *Dactylopius opuntiae* (Cockerell, 1896)(Hemiptera: Dactylopiidae). *Revista Gaia Scientia*, 9, 104-110.
- Gunatilaka, A. L. (2006). Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. *Journal of natural products*, 69(3), 509-526.
- Hermosa, R., Cardoza, R. E., Rubio, M. B., Gutiérrez, S., & Monte, E. (2014). Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of *Trichoderma*. In *Biotechnology and biology of Trichoderma* (pp. 125-137). Elsevier.
- Jakievicius, M. (2011). Secretaria do Meio Ambiente / Coordenadoria de Educação Ambiental. Matas Ciliares e o Meio Ambiente Rural: uma proposta de trabalho para educadores. São Paulo: SMA/CEA, 152.
- Krishnamoorthy, U., & Krishnappa, P. (1996). Effect of feeding yeast culture (Yea-sacc1026) on rumen fermentation in vitro and production performance in crossbred dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 57(3), 247-256.
- Kern, M. E., & Blevins, K. S. (1999). *Micologia Médica*. 2 Edição. Editora Premier, São Paulo, 256.
- Marengo, J. A., Alves L, M., Beserra, E. A., & Lacerda, F. F. (2011). Variabilidade e mudanças climáticas no semiárido brasileiro. Recursos Hídricos em regiões Áridas e Semiáridas. Campina Grande - PB. 385-422.
- Melo, I. S. (1998). Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogenicos. Em I. S. Melo & J. L. Azevedo (Eds.), Controle biológico.
- Oliveira, I. N. D. (2019). *Detecção de pigmentos e metabólitos secundários bioativos de extratos de fungos endofíticos associados à Manilkara salzmannii, planta da restinga de Salvador, Ba.*

- Owen, D., Williams, A. P., Griffith, G. W., & Withers, P. J. (2015). Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorous acquisition. *Applied Soil Ecology*, 86, 41-54.
- Paulino, R. D. C., Henriques, G. P., Moura, O. N., Coelho, M. D. F. B., & Azevedo, R. A. (2012). Medicinal plants at the Sítio do Gois, Apodi, Rio Grande do Norte State, Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22, 29-39.
- Petrini, O. (1991). Fungal endophytes of tree leaves. In *Microbial ecology of leaves* (pp. 179-197). New York, NY: Springer New York.
- Pollard, D. J., & Woodley, J. M. (2007). Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *TRENDS in Biotechnology*, 25(2), 66-73.
- Samson, R. A., & Varga, J. (2009). Molecular systematics of *Aspergillus* and its teleomorphs. Em *Aspergillus: molecular biology and genomics* (pp. 19–40). Horizon Press.
- Santos, J. É. M. (2021). Uma análise territorial sobre o uso e a preservação das plantas medicinais nas comunidades Povoados Caraíbas do Lino, Delmiro Gouveia/AL, e Serra das Viúvas, Água Branca/AL.
- Strobel, Gary; Daisy, Bryn. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and molecular biology reviews*, v. 67, n. 4, p. 491-502, 2003.
- Thambugala, K. M., Daranagama, D. A., Phillips, A. J., Kannangara, S. D., & Promptuttha, I. (2020). Fungi vs. fungi in biocontrol: An overview of fungal antagonists applied against fungal plant pathogens. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 604923.
- Ulhoa, C. J., & Peberdy, J. F. (1992). Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. *Enzyme and Microbial Technology*, 14(3), 236-240.
- Wallace, R. J. (1994). Ruminant microbiology, biotechnology, and ruminant nutrition: progress and problems. *Journal of Animal Science*, 72(11), 2992-3003.
- Zaneti, V. (2012). *Produção de xilanases por Aspergillus niger utilizando planejamento experimental: purificação de xilanase*, 74.