

Isolamento, crescimento e produção de extratos de fungos endofíticos de *Podocarpus lambertii*, utilizando reagentes e materiais alternativos.

DANIEL A. MUNIZ¹, MARCOS VENÍCIUS CASTRO²

¹ Graduando em Técnico em Informática Integrado ao Ensino Médio, bolsista PIBIFSP, IFSP, Câmpus Campos do Jordão, muniz.daniel@aluno.ifsp.edu.br

² Doutor em Ciências - Química Orgânica e Biológica, Professor, IFSP, Câmpus Campos do Jordão, marcos.castro@ifsp.edu.br
Área de conhecimento (Tabela CNPq): 2.12.01.00-5 – Biologia e Fisiologia dos Microrganismos

Apresentado no

10º Congresso de Inovação, Ciência e Tecnologia do IFSP ou no 4º Congresso de Pós-Graduação do IFSP

27 e 28 de novembro de 2019- Sorocaba-SP, Brasil

RESUMO: Os Fungos endofíticos destacam na produção de compostos bioativos. O trabalho tem como objetivo a obtenção de fungos endofíticos de *Podocarpus lambertii* ou pinho bravo. Foram utilizados materiais alternativos como, potes plásticos e utensílios de cozinha e para o meio de cultura, caldo de batatas cozidas e gelatina, além de dextrose e ágar não P.A. (Para Análise). Tudo foi esterilizado em autoclave. Para assepsia as folhas e caules foram mergulhados em água sanitária, álcool, e água estéril. Posteriormente pedaços das folhas e dos caules foram colocados sobre o meio de cultura. O meio cria condições para que o fungo saia de dentro da planta e se prolifere. A manipulação foi realizada o mais próximo possível da chama de um bico de Bunsen. O ágar utilizado deixou o meio muito escuro e sem consistência adequada e a gelatina não apresentou a consistência necessária. Esses materiais foram substituídos por um meio já pronto para análise (P.A.). Os potes não suportaram a autoclavação e se mostraram difíceis no manuseio. Foram substituídos por placas de Petri de policarbonato, já esterilizadas. Obteve-se por diversas vezes contaminação dos isolados. Foram isoladas 8 linhagens e serão selecionadas 5 para produção dos extratos e testes de atividade biológica.

PALAVRAS-CHAVE: FUNGOS ENDOFÍTICOS; MATERIAIS ALTERNATIVOS; EXTRAÇÃO; ISOLAMENTO; ASSEPSIA; CONTAMINAÇÃO.

Isolation, growth and production of endophytic fungi extracts from *Podocarpus Lambertii* or Wild Pine using alternatives reagentes and materials

Abstract: The endophytic fungi are known by producing bioactive compounds. This paper has the objective of obtaining endophytic fungi from *Podocarpus lambertii* or Wild Pine. Alternative materials were used in the process, such as plastic containers and kitchen utensils; to the medium culture, cooked-potato broth and gelatin, in addition to dextrose and non-F.A. (For Analysis) agar. All the types of equipment were sterilized in an autoclave. In order to ensure the leaves and stems asepsis, they had been immersed in bleach water, alcohol and sterile water. After this process leaves and stems pieces were put on the medium culture. The medium had good conditions that the fungi could be capable of getting out of the plant and proliferate. The manipulation was accomplished close to a burner flame. The agar let the medium dark and without a relevant consistency and the gelatin did not show the necessary consistency. Those materials were replaced by a ready medium for analysis (F. A.). The containers did not withstand the autoclave process and showed a complex usage. These were replaced by sterilized polycarbonate plates. The isolated group got contaminated many times. Eight different lineages were isolated and five were selected to produce extracts and biological activity tests.

KEYWORDS: endophytic fungi; alternative materials; extraction; isolation; asepsis; contamination.

INTRODUÇÃO

Fungos endofíticos são micro-organismos que vivem no interior dos tecidos de plantas. As interações endófito/planta são pouco compreendidas, podendo ser simbióticas (mutualismo ou comensalismo) ou tróficas (parasitismo) (Souza et al., 2004). Como os fungos endofíticos estão continuamente submetidos a interações com outros micro-organismos, estas interações promovem o surgimento de uma grande diversidade metabólica, levando à biossíntese de substâncias com potentes atividades biológicas (JIA et al., 2016).

O paclitaxel (taxol®) é um diterpenóide utilizado em tratamentos de câncer de mama e útero. A produção de taxol por um microrganismo endofítico foi demonstrada pela primeira vez através dos estudos de Stierle, Strobel e Stierle (1993), onde se evidenciou que o fungo endofítico *Taxomyces andreanea*, encontrado no interior da planta *Taxus brevifolia*, era capaz de produzir taxol (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993). Esse exemplo ilustra que os fungos endofíticos podem eventualmente ser os verdadeiros produtores de metabólitos isolados de plantas.

Plantas de ambiente úmido, que apresentam diferentes estratégias de sobrevivência e com biologia incomum, plantas endêmicas que ocupam solos antigos, plantas nativas de áreas com grande biodiversidade apresentam grande potencial para fornecer linhagens fúngicas desconhecidas (Strobel et al., 2004). Neste contexto o *Podocarpus lambertii* se destaca pois é considerado uma Gimnosperma endêmica da serra da Mantiqueira e segundo Ragagnin et al., (1994) citado por Milani (2010) sua distribuição está em uma área restrita. Segundo Carvalho (2003), citado por Milani (2010) o *Podocarpus lambertii* ocorre em duas áreas disjuntas: a primeira na Bahia, entre as latitudes de 10°30' S e 11°35' S; e a segunda, entre Minas Gerais (19°10' S) e o Rio Grande do Sul (31°20' S).

MATERIAL E MÉTODOS

Uma planta adulta da espécie *Podocarpus Lambertii* foi escolhida para fornecer as folhas e os caules que serão utilizados para obtenção das linhagens de fungos endofíticos.

Para o isolamento dos fungos endofíticos associados à *Podocarpus Lambertii*, a superfície do material vegetal (folhas e caules) foi esterilizada de acordo com a literatura (Maier et al. 1997) por imersão das folhas em hipoclorito de sódio (1%) por 5 minutos e em etanol 70% por 1 minuto, lavagem 2 vezes em água estéril por 10 minutos e a seguir colocada para secar. A última água foi plaqueada para verificação da presença de fungos. Pedacos de folhas cortados assepticamente (3 a 4) foram colocados para crescer em potes plásticos com tampa, contendo o meio de cultura sólido batata dextrose ágar ou gelatina. Os reagentes ágar e dextrose não são P.A. (para análise), ou seja, não têm um alto grau de pureza. Todo material foi previamente esterilizado utilizando-se uma autoclave modelo simples usada em salão de beleza. O crescimento dos fungos foi monitorado diariamente e quando as hifas estavam com crescimento de aproximadamente 2-3cm em diâmetro foram repicadas, sucessivamente.

-Meio de cultura

Batata Dextrose Agar ou gelatina.

200g de batata descascada e fatiada.

20g dextrose comercial.

20g de ágar ou gelatina incolor.

1 L água destilada.

Preparo: descascar, fatiar e pesar 200 g de batata; cozinhar as batatas por trinta minutos em 1,2 L de água; filtrar e manter o caldo;

Pesar a dextrose e o ágar e colocar em um frasco com capacidade superior a 1,2 L. No caso da gelatina utilizar 1 pacote de gelatina incolor 20g.

Adicionar o caldo ao frasco, completando o volume para 1l.

Tampar o frasco com rolha termo-resistente ou algodão.

Misturar e dissolver o conteúdo em banho-maria por 15 minutos.

Autoclavar o frasco por 30 minutos.

Resfriar a 50° C ou a temperatura onde seja suportável segurar o frasco e vertê-lo.

Manutenção dos fungos

Após o isolamento 5 isolados foram selecionadas aleatoriamente e armazenadas em triplicata, em água estéril conforme a metodologia de Castellani (1939). As culturas puras poderão ser enviadas para classificação caso seja possível conseguir algum colaborador.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O experimento utilizando-se os potes de plásticos demonstrou que estes não resistiram ao processo de autoclavagem. O material foi seriamente danificado chegando a derreter (Figura 1).



Figura 1: Potes plásticos após serem submetidos ao processo de autoclavagem.

Devido aos resultados obtidos com a utilização dos potes plásticos, buscou-se alternativas. As placas de petri de policarbonato, já esterilizadas, eram mais baratas que os potes plásticos. Pensou-se que estes recipientes fossem caros e inacessíveis, mas uma rápida pesquisa demonstrou que hoje estão no mercado a um custo baixo. Um pacote com 10 placas, esterilizadas, pode ser adquirido por 10 reais.

Observou-se também que o ágar, comprado em casa de produtos naturais apresentava muita impureza e o meio de cultura não se solidificou adequadamente, ficou com uma textura porosa, com textura semissólida e extremamente escuro. A utilização da gelatina sem sabor e incolor mostrou-se satisfatória, porém após o crescimento dos fungos estes estavam utilizando os constituintes da gelatina em sua nutrição ou de alguma forma interagindo com seus constituintes. Isto causou a liquefação do meio de cultura. Foi necessário adquirir o meio pronto BDA (batata, dextrose, ágar) para análise (P.A).

Apesar dos vários experimentos muitas das nossas tentativas de isolamento acabaram sendo contaminadas, provavelmente devido à alta umidade do local, contaminação do próprio ar e problemas na maneira de fazer assepsia do local (Figura 2).



Figura 2: Contaminação por toda superfície do meio, mais visível na imagem B

Foram isolados um total de 3 fungos, porém após alguns dias as placas de onde os fungos 1 e 2 haviam sido obtidos, apresentou contaminação massiva (Figura 3). Além disso a amostra de água utilizada na lavagem do material foliar também apresentou intensa contaminação. Assim houve dúvidas se os fungos eram do material vegetal, ou seja, endofíticos ou originários de contaminação. O único fungo isolado, foi de um fragmento de caule e apresentava coloração rosa, mas foi perdido por contaminação no processo de repique (Figura 4).



Figura 3: Contaminação que surgiu alguns dias após o isolamento



Figura 4: Fungo isolado, mas perdido por contaminação posterior da placa

O corte do material vegetal, com o bisturi, exigia uma superfície plana que era difícil assegurar que estivesse livre de contaminação. Então, a substituição do bisturi por uma tesoura, para cortar o material vegetal, permitiu a eliminação de uma fonte de contaminação. Além disso, antes de cada experimento, passou-se a fazer a assepsia do chão, passando-se um pano com água sanitária, procedimento que era realizado apenas na bancada. Como estes ajustes foi possível isolar 7 linhagens de fungos endofíticos, serão selecionados 5 para continuidade das etapas seguintes do projeto.

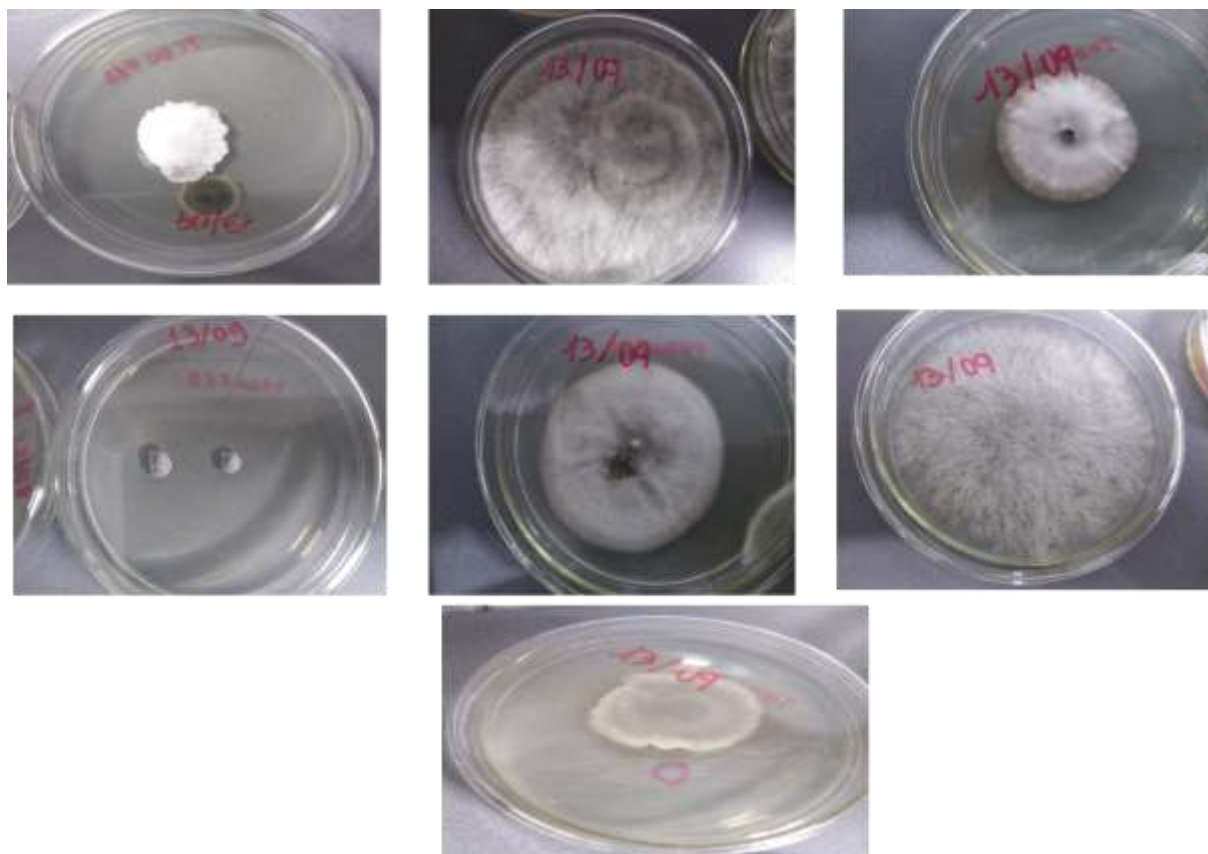


Figura 5: Linhagens isoladas para as próximas etapas

CONCLUSÕES

A utilização de potes plásticos em substituição as placas de Petri não foram viáveis. Não foi possível substituir o meio pronto BDA – (P.A.) por gelatina ou ágar não puro. Foi possível isolar 7 linhagens de fungos endofíticos, mesmo com condições limitadas e equipamentos sofisticados como a câmara de fluxo laminar, mas deve-se ter cuidado especial com a assepsia e manipular dos materiais o mais próximo possível da chama do bico de Bunsen.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao IFSP – Câmpus Matão que fez a doação das vidrarias para a realização do projeto e também ao Prof. Dr. Marcos Venícius de Castro que também nos forneceu os ingredientes para preparação dos meios.

REFERÊNCIAS

- CARVALHO, P. E. R. Espécies arbóreas brasileiras. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2006. 627p. (Coleção Espécies Arbóreas Brasileiras, v.2).
- CONCEIÇÃO, D. M. et al. New petrified forest in Maranhão, Permian (Cisuralian) of the Parnaíba Basin, Brazil **Journal of South American Earth Sciences**, v. 70, p. 308-323, October, 2016.
- GUBIANI, J. R. **Bioprospecção de fungos endofíticos Camarops sp., Periconia atropurpurea e Pseudofusicoccum stromaticum e avaliação epigenética de Phoma sp.** 2015. 225f. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015.
- HERRERA, J. et al. Precipitation increases the abundance of some groups of root-associated fungal endophytes in a semiarid grassland **Ecosphere**, v. 2, n. 4, p. 1-14, April, 2011.
- JIA, M. A et al. Friendly Relationship between Endophytic Fungi and Medicinal Plants: A Systematic Review **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-14, June, 2016.
- JIA-YAO, L. et al. Endophytic taxol-producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum* **Microbiology**, v. 142, p. 2223-2226, 1996.
- Li H. et al. Chaetoglobosins from *Chaetomium globosum*, an Endophytic Fungus in *Ginkgo biloba*, and Their Phytotoxic and Cytotoxic Activities **J. Agric. Food Chem.** v. 62, p. 3734–3741, 2014.
- LI, et al Endophytes and their role in phytoremediation **Fungal Diversity** v. 54, p. 11-18, 2012.
- MEHL, H. L.; COTTY, P. J. Influence of plant host species on intraspecific competition during infection by *Aspergillus flavus* **Plant Pathology**, v. 62, p. 1310-1318, February, 2013.
- MILANI, E. J. **Crescimento de *podocarpus lambertii* klotzsch ex endl. em duas regiões fitogeográficas no estado do rio grande do sul.** 2010. 155f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal, Área de Concentração em Manejo Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.
- Ortega, H.E. et al Mycoleptodiscins A and B, Cytotoxic Alkaloids from the Endophytic Fungus *Mycoleptodiscus* sp. F0194. **J. Nat. Prod.**, v. 76, n. 4, p. 741-744, 2013.
- PANACCIONE, D. G.; BEAULIEU, T. W.; COOK, D. Bioactive alkaloids in vertically transmitted fungal endophytes **Functional Ecology**, v. 28, p. 299-314, 2013.
- RODRIGUES, K.f.; DIAS-FILHO, M.B. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *B. humidicola* **Pesq. Agropec. Bras**, v. 31, n. 12, p. 905-909, December, 1996.
- STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew **Science**, v. 260, p. 214-216, April, 1993.