

## FUNGOS ASSOCIADOS À CASCA DO CAULE DE *Platanus orientalis* L.

### *Fungi Associated With Bark of* ***Platanus orientalis* L.**

Denise Zelak Leite Bastos<sup>\*1</sup>  
Ida Chapaval Pimentel<sup>\*\*1</sup>  
Christian Dykstra<sup>\*\*2</sup>  
Carlos Eduardo Kania<sup>\*\*2</sup>  
Juarez Gabardo<sup>\*\*\*</sup>  
Brás Heleno De Oliveira<sup>2</sup>

#### Resumo

Para posterior emprego na biotransformação do ácido betulínico e ácido betulônico, foram isolados fungos epifíticos e endofíticos da casca de caule de *Platanus orientalis* L. de acordo com metodologia específica. Para cada experimento foram utilizadas 800 amostras cortadas em pequenos pedaços e plaqueadas em dois meios de culturas diferentes: BDA (batata-dextrose-ágar) e SDA (sabouraud-dextrose-ágar). Os dados foram expressos em incidência de aparecimento do fungo. Foi realizado teste qui-quadrado (χ<sup>2</sup>) para verificar se algum dos meios favoreceu o isolamento e cultivo dos fungos isolados. Foram identificados 13 gêneros de fungos epifíticos: *Mucor* sp.; *Rhizopus* sp.; *Dematium* sp.; *Chaetophoma* sp.; *Arthobotrys* sp.; *Trichoderma* sp.; *Drecheslera* sp.; *Nigrospora* sp.; *Fusarium* sp.; *Pestalotia* sp.; *Rhizomucor* sp.; *Aspergillus* sp. e *Alternaria* sp. Constatou-se que *Mucor* sp., *Rhizopus* sp. apresentaram as maiores incidências nos dois meios. Oito gêneros foram identificados para os fungos endofíticos: *Mucor* sp.; *Stachibotrys* sp.; *Trichophyton* sp.; *Trichoderma* sp.; *Aspergillus* sp.; *Phoma* sp.; *Fusarium* sp. e *Curvularia* sp. Observaram-se as maiores incidências dos fungos: *Mucor* sp. presente nos dois meios; *Stachibotrys* sp. em BDA; *Trichophyton* sp. em SDA. Pôde-se comprovar pelo teste (χ<sup>2</sup>) que para alguns fungos a alteração do meio foi significativa.

**Palavras-chave:** Fungos Endofíticos; Fungos Epifíticos; *Platanus orientalis*.

<sup>\*1</sup> Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná – aluna de Doutorado de Química.  
Av. sete de setembro, 4229. CEP 80250-210  
E-mail dzelak@cam2000.com.br

<sup>\*2</sup> Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná – Professor.

<sup>\*\*1</sup> Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná - Professora.

<sup>\*\*2</sup> Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná – aluno de Graduação de Biologia.

<sup>\*\*\*</sup> Departamento de Genética, Universidade Federal do Paraná - Professor.

## Abstract

For a further use in the biotransformation of betulinic acid and betulonic acid, epiphytes and endophytes fungi were isolated from the bark of *Platanus orientalis* L. following the specific methodology. In each experiment 800 samples cut in small pieces were utilized. These samples were plated in two culture medium: Potato-dextrose-agar (PDA) and Sabouraud-dextrose-agar (SDA). The results were demonstrated in incidence of fungi presence. Afterwards qui-quadrante test was realized to verify if culture medium was in favour of some fungi. Thirteen epiphytes fungi genus were identified: *Mucor* sp.; *Rhizopus* sp.; *Dematium* sp.; *Chaetophoma* sp.; *Arthobotrysp.*; *Trichoderma* sp.; *Drecheslera* sp.; *Nigrospora* sp.; *Fusarium* sp.; *Pestalotia* sp.; *Rhizomucor* sp.; *Aspergillus* sp. and *Alternaria* sp. Besides, it was identified that the fungi *Mucor* sp. and *Rhizopus* sp. had the major incidence in both cultures medium. Eight genus were identified into the endophytes fungi: *Mucor* sp.; *Stachibotrysp.*; *Trichophyton* sp.; *Trichoderma* sp.; *Aspergillus* sp.; *Phoma* sp.; *Fusarium* sp. and *Curvularia* sp. It was observed that the major incidence was demonstrated by the fungi: *Mucor* sp. present into the two different cultures medium; *Stachibotrysp.* in PDA and *Trichophyton* sp. in SDA. All in all, the test (÷) demonstrated that the change of culture medium was significant to some fungi.

**Keywords:** Endophyte Fungi; Epiphyte Fungi; *Platanus orientalis*.

## Introdução

A incidência de microrganismos nas plantas ocorre pela infecção natural no campo favorecida pelo clima úmido, sendo que o seu isolamento pode ser considerado o passo inicial para a compreensão do aparecimento de metabólitos secundários nas plantas e a ativação de enzimas específicas nos fungos.

Os fungos epifíticos são aqueles que vivem sob outro ser vivo e os endófitos são aqueles que vivem em associação íntima com plantas hospedeiras vivas e sadias, colonizando os tecidos vegetais. Acredita-se que muitas substâncias bioativas que ocorrem nas plantas podem ser produzidas por estes microrganismos associados,

porém a exata relação física e bioquímica entre os endófitos e a planta permanece obscura. (STROBEL, 2003).

O presente trabalho teve como objetivo isolar, identificar e observar a incidência de fungos epifíticos e endofíticos presentes na casca do caule de *Platanus orientalis* L. (Platanaceae). Esta árvore, original das regiões temperadas do hemisfério norte, é comumente utilizada na arborização urbana inclusive no Brasil. Os fungos isolados foram utilizados na biotransformação do ácido betulínico e ácido betulônico ("in press").

O ácido betulínico é o principal metabólito secundário desta planta e ambos os ácidos possuem atividades farmacológicas importantes frente ao HIV (Fujioka et al., 1994) e ao melanoma (Pisha et al., 1995; Kim et al., 1998).

## Material e métodos

A casca do caule de *P. orientalis* foi coletada de diversos indivíduos no município de Curitiba, Paraná, Brasil. O material botânico foi identificado pelo Prof. Dr. Olavo Guimarães e uma exsicata depositada no Herbário da UFPR sob número 47812.

O isolamento e identificação dos fungos sendo epifíticos presentes na casca do caule de *P. orientalis* foi realizada de acordo com metodologia descrita a seguir.

Para cada experimento foram utilizadas 800 amostras de casca cortadas em pequenos pedaços e plaqueadas em dois meios de cultura: Batata-dextrose-ágar (BDA) e Sabouraud (SDA) com adição de solução etanólica de tetraciclina (100 µg.L<sup>-1</sup> de meio de cultura).

Para o isolamento dos fungos epifíticos, as amostras foram previamente desinfetadas com hipoclorito de sódio 3% durante trinta segundos, posteriormente enxaguadas em água destilada esterilizada.

Para o isolamento dos fungos endofíticos, as amostras foram previamente parafinadas nas extremidades, desinfetadas em solução de etanol a 70% durante um minuto; com hipoclorito de sódio 3% por quatro minutos, novamente em solução etanólica 70% por trinta segundos, posteriormente enxaguadas três vezes em água destilada esterilizada (NETO et al., 2002).

Após a desinfecção, quatro amostras de aproximadamente 50 x 50 mm foram colocadas em placas de Petri de 9 cm contendo os meios citados e mantidas em estufa aproximadamente a 28°C durante três a cinco dias. Posteriormente os fungos foram isolados pela transferência dos micélios ou conídios em tubos de ensaio com meio BDA inclinados e mantidos sob refrigeração.

A identificação dos isolados foi realizada por meio da observação de suas estruturas de reprodução (sexual e assexual), utilizando o método de cultura em lâmina ou técnica do microcultivo (KERN e BLEVINS, 1999) e de acordo com literatura especializada (BARNETT; HUNTER, 1986; ELLIS, 1976; ARX, 1974). As lâminas foram fixadas, coradas em lactofenol com 0,05% de azul de algodão e/ou lactofenol de Amann e analisadas ao microscópio ótico.

## Resultados e discussão

Os resultados dos fungos isolados foram expressos em incidência de fungos (f - número de cascas infectadas) e frequência de aparecimento (fr - presença em relação ao total) para cada amostra avaliada. Com o propósito de se verificar se algum dos meios utilizados (BDA, SDA) poderia ser mais adequado para o isolamento e cultivo dos fungos isolados, comparou-se a frequência absoluta dos mesmos através do teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ) no qual se considerou a hipótese de independência. As tabelas 1 e 2 mostram os gêneros isolados com os respectivos valores de frequência absoluta (f), relativa (fr), teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ), significância assim como a indicação do melhor meio para o isolamento (+).

**Tabela 1. Frequência absoluta (f) e relativa (fr) de fungos epifíticos isolados da casca de *Platanus orientalis* L. nos meios de cultura BDA e SDA.**

Gênero	BDA		SDA		—	BDA	SDA
	f	fr(%)	f	fr(%)			
<i>Mucor</i> sp.	158	39,50	136	34,00	2,600 n.s.	n.s.	n.s.
<i>Rhizopus</i> sp.	100	25,00	164	41,00	23,150**	-	+
<i>Dematium</i> sp.	57	14,25	0	0,00	61,380**	+	-
<i>Chaetophoma</i> sp.	0	0,00	32	8,00	33,350**	-	+
<i>Arthobotrys</i> sp.	0	0,00	27	6,75	27,940**	-	+
<i>Trichoderma</i> sp.	15	3,75	3	0,75	8,180**	+	-
<i>Drecheslera</i> sp.	15	3,75	3	0,75	8,180**	+	-
<i>Nigrospora</i> sp.	11	2,75	0	0,00	11,140**	+	-
<i>Fusarium</i> sp.	6	1,50	2	0,50	2,020 n.s.	n.s.	n.s.
<i>Pestolotia</i> sp.	2	0,50	0	0,00	2,004 n.s.	n.s.	n.s.
<i>Rhizomucor</i> sp.	0	0,00	2	0,50	2,004 n.s.	n.s.	n.s.
<i>Aspergillus</i> sp.	1	0,25	0	0,00	1,002 n.s.	n.s.	n.s.
<i>Alternaria</i> sp.	1	0,25	0	0,00	1,002 n.s.	n.s.	n.s.
Sem crescimento	34	8,50	31	7,75	0,150 n.s.	n.s.	n.s.
Total	400	100,00	400	100,00	-		

\* significância a 5%

\*\* significância a 1%

n.s. - não significativo

(+) melhor meio a ser utilizado

**Tabela 2. Frequência absoluta (f) e relativa (fr) de fungos endofíticos isolados da casca de *Platanus orientalis* L. nos meios de cultura BDA e SDA.**

Gênero	BDA		SDA		—	BDA	SDA
	f	fr(%)	f	fr(%)			
<i>Mucor</i> sp.	73	18,25	91	22,75	2,48n.s.	n.s.	n.s.
<i>Stachibotrys</i> sp.	162	40,50	0	0,00	203,00**	+	-
<i>Trichophyton</i> sp.	0	0,00	87	21,75	97,61**	-	+
<i>Trichoderma</i> sp.	26	6,50	37	9,25	2,08n.s.	n.s.	n.s.
<i>Aspergillus</i> sp.	49	12,25	52	13,00	0,10n.s.	n.s.	n.s.
<i>Phoma</i> sp.	32	8,00	86	21,50	28,99**	-	+
<i>Aspergillus niger</i>	2	0,50	2	0,50	0,00n.s.	n.s.	n.s.
<i>Fusarium</i> sp.	12	3,00	2	0,50	7,27**	+	-
<i>Curvularia</i> sp.	0	0,00	1	0,25	1,00n.s.	n.s.	n.s.
Não Identificado	9	2,25	13	3,25	0,74n.s.	n.s.	n.s.
Sem crescimento	35	8,75	29	7,25	0,61n.s.	n.s.	n.s.
Total	400	100,00	400	100,00	-		

significância a 5%

significância a 1%

não significativo

(+) melhor meio a ser utilizado

Dos 800 fragmentos de casca de caule utilizados em cada experimento foram isolados 21 fungos epifíticos e 17 endofíticos. Após a identificação resultaram em 13 gêneros de fungos epifíticos e oito endofíticos. Desses quatro apareceram em ambos os experimentos: *Mucor* sp.; *Trichoderma* sp.; *Aspergillus* sp.; *Fusarium* sp.

As incidências dos fungos epi e endofíticos nos meios BDA e SDA apresentaram diferenças, no entanto, pôde-se constatar que os fungos *Mucor* sp.; *Rhizopus* sp.; *Trichoderma* sp.; *Aspergillus* sp.; *Drecheslera* sp.; *Phoma* sp. e *Fusarium* sp. desenvolveram-se nos dois meios, sendo que *Mucor* sp. apresentou a maior incidência representando 36,75% dos fungos epifíticos, 20,50% dos endofíticos resultando em 28,62% do total das amostras.

Os fungos epifíticos *Trichoderma* sp., *Drecheslera* sp. e *Fusarium* sp. foram encontrados

nos dois meios, porém foram mais frequentes em BDA. Os fungos *Dematium* sp., *Nigrospora* sp., *Pestolotia* sp., *Aspergillus* sp. e *Alternaria* sp. foram encontrados somente em BDA enquanto *Chaetophoma* sp., *Arthobotrys* sp. e *Rhizomucor* sp. em SDA.

Os gêneros que apresentaram diferença significativa quanto à frequência observada nos diferentes meios foram: *Dematium* sp., *Trichoderma* sp., *Drecheslera* sp. e *Nigrospora* sp. mais frequentes em BDA, enquanto que *Rhizopus* sp., *Chaetophoma* sp. e *Arthobotry* sp. o foram em SDA. Para os demais fungos o teste  $\chi^2$  mostrou que a alteração do meio não foi significativa.

Os fungos endofíticos *Mucor* sp.; *Trichoderma* sp.; *Aspergillus* sp.; *Phoma* sp.; *Aspergillus niger* e *Fusarium* sp.; foram encontrados nos dois meios sendo que os quatro primeiros

foram mais frequentes em SDA. O fungo *Stachibotrys* sp. foi encontrado somente em BDA; enquanto *Trichophyton* sp. em SDA, nesses casos, de acordo com teste  $\neq$ , a alteração do meio foi fundamental para o crescimento dos fungos.

Portanto, pôde-se concluir que os diferentes meios de cultivo utilizados favoreceram o crescimento de determinados fungos o que se justifica pela composição diferenciada dos mesmos. De posse desta informação, foi testado o melhor meio para a biotransformação do ácido betulínico e ácido betulônico.

### Agradecimentos

Os autores agradecem ao Prof. Dr. Olavo Guimarães (Departamento de Botânica, UFPR) pela identificação botânica e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro concedido.

### Referências

ARX, J.A. **The genera of fungi sporulation in pure culture**. Vaduz: A.R. Gantner, 1974.

BARNETT, H.C.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. New York: Burgess, 1986.

ELLIS, M.B. **More dematiaceous hyphomycetes**. Kew: Survey Commonwealth Mycological Institut, 1976.

FUJIOKA, T., KASHIWADA, Y., KILKUSKIE, R.E., COSENTINO, L.M., BALLAS, L.M., JIANG, J.B., JANZEN, W.P., CHEN, I.S.; LEE, K.H. Anti-aids agents, 11. Betulinic acid and platanic acid as anti-HIV principles from *Syzigium claviflorum*, and the anti-HIV activity of structurally related triterpenoids. **Journal of Natural Products**, v. 57, p. 243-247, 1994.

KERN, M.E.; BLEVINS, K.S. **Micologia médica**. São Paulo, SP: Premier, 1999.

KIM, D.S.H.L., PEZZUTO, J.M.; PISHA, E. Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.8, p.1707-1712, 1998.

NETO, P.A.S., AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Microrganismos endofíticos interação com plantas e potencial biotecnológico. **Revista Biotecnologia**, v. 29, p. 62-76, 2002.

PISHA, E., CHAI, H., LEE, I.S., CHAGWEDERA, T.E., FARNSWORTH, N.R., CORDELL, G.A., BEECHER, C.W.W., FONG, H.H.S., KINGHORN, A.D., BROWN, D.M., WANI, M.C., WALL, M.E., HIEKEN, T.J., GUPTA, T.K.; PEZZUTO, J.M. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. **Natural Medicine**, v. 1, p.1046-1051, 1995.

STROBEL, G. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 535-544, 2003.

Recebido em/ Recived in: 31/10/2003  
Aprovado em/ Approved in: 01/12/2003