

# Fungos endofíticos associados a acículas de *Pinus taeda*

Ida Chapaval Pimentel<sup>1\*</sup>, Gisele Figura<sup>1</sup>, Celso Garcia Auer<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná, CEP 81531-990, Curitiba, PR; <sup>2</sup>Embrapa Florestas, C.P. 319, CEP 83411-000, Colombo, PR.

Autor para correspondência: Ida Chapaval Pimentel (ida@ufpr.br)

Data de chegada: 31/10/2008. Aceito para publicação em: 31/08/2009.

1627

## RESUMO

Pimentel, I. C.; Figura, G.; Auer, C. G. Fungos endofíticos associados a acículas de *Pinus taeda*. *Summa Phytopathologica*, v.36, n.1, p.xx-xx, 2010.

O presente trabalho objetivou estudar os fungos endofíticos em acículas de árvores jovens de *Pinus taeda* L. e avaliar o efeito da posição de coleta na árvore. As amostras foram coletadas em duas alturas (30-50 cm e 100-130 cm acima do solo) e nas quatro posições cardeais (norte, sul, leste e oeste), em plantas com 18 meses de idade, localizadas em Colombo, PR, Brasil. As acículas foram submetidas a assepsia e fragmentos com 10 mm de comprimento foram plaqueados em meio BDA e incubados a 28 °C, sob fotofase de 12 h, por 15 dias. Para a identificação, as estruturas reprodutivas dos fungos foram produzidas pelo método do microcultivo. Foram isolados e

identificados dezessete gêneros: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Coniothyrium*, *Diplodia*, *Drechslera*, *Hansfordia*, *Monocillium*, *Nodulisporium*, *Panidio*, *Papulaspora*, *Pestalotiopsis*, *Phialophora*, *Pithomyces*, *Rhizoctonia* e *Xylaria*. Alguns morfotipos sem identificação foram *Mycelia sterilia* e fungos demaciáceos. O número de isolados da altura 30-50 cm foi significativamente maior que na outra altura. Não foi observada diferença significativa no número de isolados entre as posições cardeais de uma mesma altura. Diferenças significativas foram observadas entre os gêneros isolados e *Xylaria* foi o gênero mais frequente.

**Palavras-chave adicionais:** filoplano, floresta, microrganismos, pínus.

## ABSTRACT

Pimentel, I. C.; Figura, G.; Auer, C. G. Endophytic fungi associated to *Pinus taeda* needles. *Summa Phytopathologica*, v.36, n.1, p.xx-xx, 2010.

The present work aimed to study the endophytic fungi in *Pinus taeda* needles and to evaluate the effect of sample points in the tree. Samples were collected in two different heights (30-50 cm and 100-130 cm over ground) and cardinal positions (North, South, East and West) in plants with 18 months old, located at Colombo, PR, Brazil. The needles were successively washed in sterile distilled water, 70 % ethanol, NaHClO 3 %, 70 % ethanol and sterile distilled water. Needle fragments of 10 mm of length were plated in PDA medium, incubated at 28 °C, photophase 12h to 15 days. The reproductive structures of fungi were produced by microculture technique. Seventeen genera

were identified: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Coniothyrium*, *Diplodia*, *Drechslera*, *Hansfordia*, *Monocillium*, *Nodulisporium*, *Panidio*, *Papulaspora*, *Pestalotiopsis*, *Phialophora*, *Pithomyces*, *Rhizoctonia* and *Xylaria*. Some non identified morphotypes were *Mycelia sterilia* and dematiaceous fungi. The number of isolates from the 30-50 cm height was significantly higher than the other. No differences were observed on number of isolates among cardinal positions at the same height. It was observed significant differences were observed among the isolated genera and *Xylaria* was the most frequent genus.

**Keywords:** forest, microorganisms, phyloplane, pine.

Espécies de *Pinus* foram introduzidas no Brasil há mais de um século, trazidas pelos imigrantes europeus para fins ornamentais e para a produção de madeira (22). Os primeiros ensaios com espécies europeias não obtiveram sucesso, devido a falta de adaptação ao clima brasileiro. Em 1948, foram introduzidas as espécies norte-americanas conhecidas como “pinheiros amarelos”, dentre as quais destacaram-se *Pinus elliottii* var. *elliottii* e *Pinus taeda* (22) que são as mais plantadas no Brasil.

A ocorrência de fungos em folhas assintomáticas é comumente relatada, sugerindo que alguns microrganismos podem colonizar os órgãos das plantas sem o desenvolvimento de sintomas de doença. Tais microrganismos receberam a denominação de fungos endofíticos ou endófitos (19). Sabe-se que os endofíticos são importantes e podem produzir toxinas, antibióticos e outros fármacos, fatores de crescimento

e muitos produtos de interesse biotecnológico (4).

As espécies de fungo envolvidas podem variar de acordo com o hospedeiro, distribuição geográfica, idade da planta, condições ecológicas e sazonais, incluindo-se a altitude e precipitação. Uma ou duas espécies podem ser dominantes como endofíticas em determinado hospedeiro, enquanto outros isolados são pouco frequentes (2, 4, 6)

Na literatura científica são escassos relatos sobre fungos endofíticos em acículas de *Pinus*, envolvendo espécies de pínus não utilizadas em plantios no Brasil. Para o estado do Paraná não existem estudos para verificação da população de endofíticos colonizando acículas de *P. taeda*, a espécie mais representativa em termos de áreas de reflorestamento na região Sul do Brasil. Assim, o presente estudo objetivou realizar uma avaliação da população dos fungos endófitos presentes em acículas de *P. taeda* e coletadas em duas diferentes

posições na planta.

Por ser um estudo exploratório, três árvores de *P. taeda* com 18 meses de idade foram amostradas em duas alturas em relação ao solo (30-50 cm e 100-130 cm) e nas posições cardeais Norte, Sul, Leste e Oeste. As árvores estavam situadas em um plantio experimental da Embrapa Florestas localizada a 25 ° 20' S e 49 ° 14' W, com altitude média de 920 m. O clima é temperado sempre úmido, do tipo Cfb, segundo a classificação de Köppen. Essa área apresenta solos tipo HO1 (orgânicos álicos fase campestre subtropical, relevo plano) + tipo PV1 (Podzólicos Vermelho Amarelo, textura argilosa, relevo forte ondulado) + CA8 (associação cambisol álico e rubrozem, relevo suave ondulado) (16). As acículas foram coletadas pela manhã antes do sol incidir sobre as plantas, e colocadas em sacos de polietileno e identificadas.

No laboratório, as acículas coletadas foram lavadas em água corrente, tomando-se o devido cuidado para não se provocar ferimentos. A desinfestação da superfície das acículas consistiu em uma sequência de imersão das amostras por duas vezes em água destilada esterilizada, um minuto em etanol 70 %, cinco minutos em hipoclorito de sódio 3 %, trinta segundos em etanol 70 % e finalmente lavadas três vezes em água destilada esterilizada. Dez acículas foram selecionadas ao acaso, de cada amostra, e assepticamente cortadas em cinco fragmentos com aproximadamente 10 mm, totalizando 1.200 fragmentos (excluindo-se sempre as partes distais). Na sequência, os fragmentos foram transferidos para placas de Petri contendo meio batata-dextrose-ágar - BDA (extrato comercial de batata e dextrose, 39 g; água destilada 1000 mL). Para cada amostra, foram preparadas 20 placas com cinco fragmentos. Também, foram preparadas placas-controle contendo 0,1 mL da última água destilada esterilizada utilizada na lavagem, para verificação da presença de contaminantes epifíticos, de acordo com Petrini (18). As placas foram mantidas a 28 ± °C em câmara BOD, com fotoperíodo de 12 horas durante 15 dias, sendo observadas diariamente para verificação da formação de colônias. Logo após o início do crescimento dos fungos nas placas, pequenos fragmentos do ágar contendo pontas de hifas de fungos foram transferidos para tubos de ensaio contendo meio BDA inclinado. Os tubos foram mantidos a 28 ± 1 °C e, após o crescimento das colônias, mantidos em refrigerador a 4 °C.

Os isolados obtidos foram agrupados em morfotipos de acordo com as similaridades e aspectos da morfologia da colônia fúngica. Para a observação das estruturas reprodutivas utilizou-se a técnica do método de cultura em lâmina ou microcultivo (13). As estruturas foram coradas com lactofenol de Amann e analisadas ao microscópio ótico. A identificação dos isolados foi realizada de acordo com a literatura especializada (1, 3, 5, 7, 8, 11, 14, 15, 18, 20) e as colônias de fungos não identificadas foram denominadas como N.I. (não identificadas).

O número total de isolados de fungos endofíticos e o número de isolados de gêneros de fungos em acículas de *P. taeda* nas duas alturas: 30 - 50 cm e 100 -130 cm, a comparação da frequência de cada gênero, considerando oito tratamentos (posições norte, sul, leste e oeste nas duas alturas amostradas) foram as variáveis analisadas. Os dados foram analisados num esquema fatorial, transformados para log (x + 2), submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas por meio de teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o software ASSISTAT versão 7.5 (23).

Apartir dos 1.200 fragmentos de acículas de *P. taeda*, foram isolados 784 fungos endofíticos, sendo 460 isolados na altura 30 cm-50 cm e 324 na altura 100 cm- 130 cm (Tabela 1). Quando avaliado o número total de fungos endofíticos, valores do teste F significativos foram encontrados somente entre as diferentes alturas e na interação altura x

**Tabela 1.** Número total de colônias de fungos endofíticos isolados de acículas de *Pinus taeda* em função da posição de coleta na planta e altura em relação ao solo.

Altura da coleta	Posição cardinal				Total
	Norte	Sul	Leste	Oeste	
30 cm-50 cm	106 Aa	121 Aa	100 Aa	133 Aa	460 x
100 cm-130 cm	81 Aa	71 Aa	108 Aa	64 Ab	324 y
<b>Total</b>	187 X	192 X	208 X	197 X	784

CV = 28,3 %. Valores seguidos por letras distintas, nas linhas (maiúsculas) e colunas (minúsculas), diferem entre si (Tukey 5 %)

posição. Quando comparadas às médias, verificou-se diferenças significativas entre as posições sul e oeste quando comparadas as duas alturas e as médias das posições norte e leste não diferiram estatisticamente entre si. Não foi observada diferença significativa entre as diferentes posições cardeais de uma mesma altura.

No presente trabalho verificou-se aumento no número de espécies isoladas em função do tipo de acícula coletada e do local na planta, onde se observou maior frequência de fungos colhidas na altura de 30 cm-50 cm (acículas mais velhas) quando comparada com a frequência na altura de 100 cm-130 cm. Estudos com a caracterização de fungos endofíticos em folhas sadias de *Nicotiana* spp. (24), em condições de campo, mostraram que o número de endófitos aumentou significativamente com o desenvolvimento das folhas. Pereira et al. (17) relataram uma relação direta entre a frequência de infecção das folhas e a idade das plantas. Sabe-se que a idade da planta e os órgãos utilizados interferem no número e tipos de microrganismos isolados (4).

Fisher et al. (10) isolaram 23 gêneros de endofíticos de quatro plantas de *Opuntia stricta* crescendo em quatro localidades da Austrália, sendo a maioria constituída de gêneros de fungos com ampla distribuição e em grande número de hospedeiros. A posição de amostragem avaliada nas plantas de *O. stricta* e o seu estágio fenológico aparentemente determinaram o grau de colonização. Esses autores também relataram que a frequência de colonização do endofítico pode ser dependente da disponibilidade do inóculo e da posição do tecido da planta, muito mais do que da localização geográfica das plantas. No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas quando comparadas as diferentes posições em relação à frequência total de fungos endofíticos isolados.

Dezessete gêneros de fungos foram encontrados, independentemente da amostragem: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Coniothyrium*, *Diplodia*, *Drechslera*, *Hansfordia*, *Monocillium*, *Nodulisporium*, *Panidio*, *Papulaspora*, *Pestalotiopsis*, *Phialophora*, *Pithomyces*, *Rhizoctonia*, *Xylaria*. Os fungos isolados que apresentavam somente micélio escuro estéril (fungos demaciáceos) não foram classificados ao nível de gênero. Alguns isolados não produziram estruturas reprodutivas (*Mycelia sterilia*). Em relação ao total de fungos endofíticos de cada gênero encontrados, houve diferenças significativas para todas as posições amostradas.

Na altura de 30 cm-50 cm, o gênero *Xylaria* foi o mais frequente diferindo de todos os outros encontrados, em todas as posições cardeais. Na altura 100 cm-130 cm, posição norte, os gêneros *Xylaria* e *Coniothyrium* diferiram de todos os demais gêneros e também entre si, com *Xylaria* sendo o mais frequente. Nas posições sul, leste e oeste observou-se que *Xylaria* também foi o mais frequente e diferiu de todos os demais gêneros analisados.

Quando da análise separada dos gêneros, com base na frequência total de fungos encontrados em todas as posições de coleta de acículas,

verificou-se que para o gênero *Coniothyrium* o valor de F foi significativo para as variáveis altura e posição, e para a interação das duas variáveis. Pode-se afirmar que houve diferenças para o gênero em questão entre as duas alturas da posição oeste, porém nas posições norte, sul e leste esta diferença não foi observada. Entre as posições da altura 30-50 cm, a oeste diferiu significativamente das demais, que apresentaram semelhanças entre si. Entre as posições da segunda altura não foi observada diferença significativa. Os valores de F foram significativos para a variável altura no gênero *Colletotrichum*, com frequência significativamente maior de isolados na altura de 30 cm-50 cm. Para o gênero *Phialophora*, os valores de F foram significativos para as duas variáveis, inclusive para a interação entre altura e posição. Quando comparadas as frequências, observou-se que a posição leste diferiu significativamente das outras posições na altura 100 cm-130 cm, enquanto que não houve diferença estatística entre as demais. A diferença entre as duas alturas foi constatada na posição leste, sendo que as demais não diferem significativamente. Para os gêneros *Pithomyces* e *Xylaria* foram encontrados valores significativos de F somente na altura 30 cm-50 cm apresentou valores significativamente maiores que a 100 cm-130 cm.

Para os gêneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Hansfordia*, *Nodulisporium* e *Rhizoctonia* e fungos demaciáceos e *Mycelia sterilia* não foram verificadas diferenças significativas.

O gênero mais frequente nas duas alturas e nas quatro posições foi *Xylaria*, totalizando 631 colônias (80,5 %) do total de endofíticos isolados, o qual pode ser chamado de dominante (4). Na sequência os mais frequentes foram *Colletotrichum*, *Pithomyces* e *Phialophora*, com 29, 19 e 14 colônias, respectivamente (3,7 %, 2,4 % e 1,8 %). O gênero *Alternaria* e os fungos demaciáceos apresentaram 10 colônias (1,3 %). Os demais gêneros tiveram as menores frequências: *Mycelia sterilia* apresentou seis colônias (0,8 %), *Cladosporium* e *Nodulisporium* totalizaram quatro colônias (0,5 %), *Coniothyrium* apresentou três colônias (0,4 %) e *Monocillium*, *Hansfordia* e *Rhizoctonia* apresentaram duas colônias (0,3 %) cada. Os gêneros *Aspergillus*, *Diplodia*, *Drechslera*, *Panidio*, *Papulaspora*, *Pestalotiopsis* apresentaram apenas uma colônia (0,1 %) cada.

Dentre os gêneros citados, *Rhizoctonia* já foi isolado de *Pinus sylvestris* (21) e em mudas de *Pinus caribaea* var. *hondurensis* e *Pinus tecunumanii* e híbridos entre essas duas espécies, no estado de São Paulo (9), enquanto que os gêneros *Cladosporium*, *Alternaria* e *Phialophora* foram relatados como endófitos de *Pinus ponderosa* por Hoff et al. (12).

Nas placas-controle foram observadas 17 colônias, os quais se dividiram em 10 diferentes morfotipos, os quais se supõem serem contaminantes ou epifíticos (Tabela 2). Os seguintes gêneros foram identificados: *Cladosporium*, *Stachybotrys*, *Phoma*, *Aureobasidium*, *Candida*, *Trichoderma*, *Mycelia sterilia* e fungos dematiáceos. Os gêneros *Cladosporium*, *Mycelia sterilia* e fungos dematiáceos já haviam sido encontrados anteriormente, mas os morfotipos diferiram dos que foram considerados endofíticos. Dos diferentes morfotipos

**Tabela 2.** Número total de colônias de fungos contaminantes (epifíticos) isoladas das placas-controle realizadas com a última água de lavagem das amostras de acículas de *Pinus taeda*.

Altura da coleta	Posição cardinal				Total
	Norte	Sul	Leste	Oeste	
30 cm-50 cm	5	2	3	1	11
100 cm-130 cm	1	1	2	2	6
<b>Total</b>	6	3	5	3	17

encontrados, duas colônias não foram identificadas, sendo classificadas como N.I.

Apesar dos fungos endofíticos muitas vezes se apresentarem de forma latente, sem causar sintomas na planta hospedeira, seu estudo é de grande importância. Esses fungos podem produzir substâncias de interesse farmacológico ou serem utilizados para o controle biológico de doenças de plantas (4).

Escassos são os relatos a respeito de fungos endofíticos em *P. taeda*. Assim, considera-se o estudo como pioneiro na investigação e identificação de gêneros endofíticos em acículas de *P. taeda*. Estudos complementares para um melhor entendimento da relação endófito/hospedeiro dos gêneros encontrados são requeridos.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, S. B. **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ/USP, 1998. 1163 p.
- Arnold, E. A.; Mejía, C. L.; Kylo, D.; Rojas, E. I.; Maynard, Z.; Robbins, N.; Herre, E. A. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. **PNAS**, Washington, v.100, p. 15649-15654, 2003.
- Arx, J. A. von. **The genera of fungi sporulating in pure culture**. 2. ed. Vaduz: J. Cramer, 1974. 351 p.
- Azevedo, J.L. Microrganismos endofíticos. In: Melo, I.S.; Azevedo, J.L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998, p. 117-137.
- Barnett, H. C.; Hunter, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3. ed. Minneapolis: Burgess, 1972. 241p.
- Carrol, G. C.; Carrol, F. E. Studies on the incidence of coniferous needle endophytes in the Pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.56, p. 3034-3043, 1978.
- Ellis, M. B. **Dematiaceous hyphomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1971. 608 p.
- Ellis, M. B. **More dematiaceous hyphomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1976. 507 p.
- Ferreira, F. A.; Mendes, J. E.; Maia, J. L. Mortalidade de estacas enraizadas de *Pinus* spp. causada por *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v. 30, n. 2, p. 92, 2005.
- Fisher, P. J.; Sutton, B. C.; Petrini, O. Fungal endophytes from *Opuntia stricta*: a first report. **Nova Hedwigia**, Stuttgart, v. 59, n.1/2, p. 195-200, 1994.
- Hoog, G. S.; Guarro, J. **Atlas of Clinical Fungi**. Virgili: Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat roviria i., 2004. 1126 p.
- Hoff, J. A.; Klopfenstein, N. B.; McDonald, G. I.; Tonn, J. R.; Kim, M. S.; Zambino, P. J.; Hessburg, P. J.; Rogers, J. D.; Peever, T. L.; Carris, L. M. Fungal endophytes in woody roots of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and ponderosa pine (*Pinus ponderosa*). **Forest Pathology**, Berlin, v. 34, n. 4, p. 255-271, 2004.
- Kern, M. E.; Blevins, K. S. **Micologia Médica**. 2. ed. São Paulo: Editora Premier, 1999. 256 p.
- Koneman, E. W.; Roberts, G. D. **Micologia pratica de laboratório**. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1987. 221p.
- Larone, D. H. **Medically important fungi: a guide to identification**. New York: Elsevier, 1987. 230 p.
- Oliveira, Y. M. M.; Rotta, E. Levantamento da estrutura horizontal de uma mata de araucária no primeiro planalto paranaense. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Colombo, n. 4, p. 1-46, 1982.
- Pereira, J. O.; Azevedo, J. L.; Petrini, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a preliminary study. **Mycologia**, New York, v. 85, n. 3, p. 362-364, 1993.

18. Petrini, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: Fokkema, N. J.; Heuvel, L. van den (Ed.). **Microbiology of the phyllosphere**. Cambridge: University Press, 1986, p. 175-87.
19. Petrini, O. Fungal endophytic of tree leaves. In: ANDREWA, J.; HIRANO, S. S. (Ed.). **Microbial ecology of leaves**. Viena: Spring Verlag, 1991, p. 179-197.
20. Rossman, A. Y.; Palm, M. E.; Spielman, L. J. **A literature guide for the identification of plant pathogenic fungi**. Saint Paul: APS, 1987. 252 p.
21. Sen, R.; Hietala, A. M.; Zelmer, C. D. Common anastomosis and internal transcribed spacer RFLP grouping in binucleate *Rhizoctonia* isolates representing root endophytes of *Pinus sylvestris*, *Ceratohiza* spp. from orchid mycorrhizas and phytopathogenic anastomosis group. **New Phytologist**, Oxford, v. 144, n. 2, p. 331-341, 1999.
22. Shimizu, J.Y. Pinus na silvicultura brasileira. **Revista Madeira**, Curitiba, edição especial, p.22-28, 2004.
23. Silva, F.A.S. The ASSISTAT Software statistical assistance. In: International Conference on Computers in Agriculture. American Society of Agricultural Engineers, v.6, p.294-298, 1996.
24. Spurr, H.W.; Welty, R.E. Characterization of endophytic fungi in healthy leaves of *Nicotiana* spp. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 65, p.417-422, 1975.