

INTERAÇÕES DA MICROBIOTA FUNGICA EM PLANTAS MEDICINAIS E PRODUÇÃO DE MATERIAIS DIDÁTICOS PARA O ENSINO DE BIOLOGIA

Sônia LIMA (1); Winnie SOUZA (2); Lucilene PAES (3)

(1) CEFET-AM, Avenida Sete de Setembro, (092) 3621-6735, fax, e-mail: smmlima@cefetam.edu.br

(2) CEFET-AM, e-mail: winnie_lagoa@hotmail.com; (3) CEFET-AM, e-mail: leguly@ig.com.br

RESUMO

No Amazonas a medicina popular é algo que está arraigado na cultura do povo. Além de ser praticada prioritariamente pelas populações tradicionais, a dificuldade de acesso à medicina convencional faz com que muitas pessoas se utilizem dessa alternativa por acreditarem que os medicamentos naturais possam ser menos danosos à saúde. Com o objetivo de caracterizar a microbiota fungica (epifítica) de plantas utilizadas na medicina popular e relacionar a incidência de fungos na estrutura foliar e seus apêndices, como também elaborar material didático para as disciplinas Vegetais Superiores e Estudos dos Microrganismos do Curso de Ciências Biológicas do CEFET-AM, realizou-se esta pesquisa experimental com estudo de campo. Foram estudadas as seguintes espécies de plantas medicinais: *Kalanchoe brasiliensis* (Crassulaceae), *Jatropha curcas* L. (Euphorbiceae), *Vermonia condesata* Beker (Asteraceae), *Bonamia ferruginea* (Convolvulaceae) e *Costus spicatus* (Costaceae), nas quais se identificou a prevalência dos seguintes gêneros de fungos: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Spadicoides*, *Trichoderma* e *Penicilium*. Além da caracterização da estrutura foliar e seus apêndices verificou-se a incidência dos fungos isolados. Todo material produzido nos experimentos como: cepas, cultivos em placas de petri, lâminas citológicas e demais materiais foram disponibilizados no laboratório de Micologia da Instituição para serem utilizados nas aulas das disciplinas da área de Biologia.

Palavras-chave: microbiota fúngica; plantas medicinais; estrutura foliar.

1. INTRODUÇÃO

A Amazônia detém uma flora rica e de interesse mundial devido principalmente ao avanço da biotecnologia. Porém, apesar da imensa diversidade biológica as espécies que a compõem e sua filogenia ainda são pouco conhecidas. Na Amazônia é possível encontrar o povo praticando a medicina popular com conhecimento adquirido por força da necessidade de seus primeiros habitantes os índios ao se adaptarem a mata e dela retirarem a matéria-prima necessária a sua sobrevivência: alimentos, moradia e principalmente medicamento.

No Amazonas a medicina popular é algo arraigado na cultura, é perceptível em simples conversas entre os nativos e em feiras espalhadas pela cidade. A falta de acesso e/ou confiança na medicina convencional faz com que muitas pessoas se utilizem da medicina popular por acreditarem que medicamentos naturais possam ser menos danosos a saúde. Segundo Borrás (2003), o retorno ao tradicional é perigoso, pois muitas vezes é possível encontrar receitas mágicas desprovidas de ação terapêutica e muitas vezes extremamente tóxica. Daí a necessidade de maior estudo sobre suas estruturas e interações bióticas.

É sabido que uma parcela de microorganismos, principalmente bactérias e fungos, habitam o exterior e interior das plantas, entre eles destacam-se os fungos. Nesta pesquisa foi caracterizada a microbiota fúngica e sua relação com a epiderme de plantas utilizadas pela população amazônica como medicinal: *Kalanchoe brasiliensis*, *Bonamia ferrugineus*, *Vermonia condesata* Beker, *Jatropha curcas* L. e *Costus spicatus* (Jacq.), que tem representantes nas exsicatas do mini-herbário do CEFET-AM além de elaborar material didático para contribuir com o estudo das disciplinas: Microorganismos II e Vegetais Superiores do curso de formação de professores de Ciências Biológicas do CEFET-AM.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

As plantas podem servir de hospedeiras para inúmeros microorganismos, segundo Pascholati & Cia (1994). Dentre esses organismos existem aqueles que vivem como parasitas das plantas, representados na maioria das vezes por bactérias, vírus e fungos. As interações microrganismos-plantas são extremamente importantes para que o equilíbrio ecológico seja mantido (AZEVEDO, 1999).

Os fungos constituem um grupo de organismos em que não ocorre clorofila (são heterótrofos). São geralmente filamentosos e multicelulares. O crescimento é em geral apical, mas normalmente qualquer fragmento hifálico pode dar origem à outra formação micelial quando destacado e colocado em meio apropriado. As estruturas reprodutivas são diferenciadas das vegetativas, o que constitui a base sistemática dos fungos (PUTZKE & PUTZKE, 2002). Alguns podem ser microscópicos, enquanto outros são muito maiores, como os cogumelos que crescem em madeira úmida ou solo. Os fungos formam esporos, que são dispersos por correntes de ar (PELCZAR et al., 1996).

Os tipos de relação entre fungos e outros organismos são extremamente diversos, pelo menos 80% de todas as plantas vasculares formam associações mutualistas benéficas chamadas micorriza (RAVEN, 2001). Outras interações também são conhecidas, como endofíticas que ocorre quando o microrganismo vive no interior das plantas, habitando suas partes aéreas como caules e folhas, sem causar, aparentemente, qualquer dano aos seus hospedeiros. Eles distinguem-se dos patogênicos, que causam doenças nas plantas, e dos epifíticos que vivem na superfície dos vegetais (AZEVEDO, 1999).

Muitas pesquisas vêm sendo realizadas sobre a presença de microrganismos em plantas, abrindo novas perspectivas para o estudo dessas interações. Antes disso, é interessante se conhecer a diversidade desses organismos, sua presença, frequência e funções nas plantas utilizadas como medicinais.

O Brasil detém 20% da biodiversidade do planeta e entre os organismos que compõem essa riqueza os fungos contribuem com cerca de 1,5 milhão (MENDES-COSTA, 2005).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, estima-se que 25.000 espécies de plantas sejam usadas nas preparações da medicina tradicional (BDT, 2002). Hoje em dia, devido a vários fenômenos climáticos, vários ecossistemas estão em perigo e um enorme número de plantas e de microrganismos com propriedades biotecnológicas correm risco de desaparecer antes que suas características sejam identificadas. Um dos passos iniciais para se conhecer os organismos vegetais é estudando suas estruturas internas, pois podem auxiliar na compreensão de vários fenômenos, inclusive na investigação de suas interações.

De acordo com Goodman (1982), os fungos possuem estruturas ativas que permitem a penetração nos tecidos vegetais, possuindo uma capacidade de exercer força mecânica ou física para vencer, por exemplo, a

parede celular e a pressão e turgor da planta e por consequência penetrar em células epidérmicas intactas, na maioria das vezes essa penetração ocorre por injúria e ferida na superfície da planta.

A epiderme das plantas é o tecido mais externo dos órgãos vegetais, são muitos variáveis e de origem diversa segundo Apezato & Carmello (2004). Para Reis e Olivares (2006) nas superfícies da maioria das plantas encontramos os tricomas constituindo seu indumento que são apêndices de origem celular. Podendo ser estruturas unicelulares ou formadas por células em série, ou ainda estruturas totalmente complexas com células especializadas, simples ou ramificadas, que pode ter origem no mesófilo ou nas epidermes. De maneira geral são vistos como “pêlos” ou pequenas escamas na superfície das folhas, pecíolos e caules.

A presença de tricomas também está relacionada com a absorção e a eliminação de água, a percepção de estímulo, a proteção da planta através da redução da transpiração, da incidência da luz solar no aparato fotossintético e redução de calor. Muitas dessas estruturas são extremamente frágeis colapsando facilmente sob ligeira pressão (HABERLANDT, 1990).

A frequência de tricomas na superfície foliar varia com a espécie e idade da planta, sendo maior em folhas mais jovens e na face abaxial, isto é, fora da linha do eixo do corpo ou um órgão (REIS & OLIVARES, 2006).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras de plantas medicinais

As amostras botânicas utilizadas neste trabalho, conforme a Tabela 1, tendo como referencia algumas espécies com exsiccatas disponíveis no Mini-herbário do CEFET-AM, coletadas de ambiente natural, no período de janeiro a março de 2008, na cidade de Manaus, foram acondicionadas em sacos plásticos esterilizados e levadas ao laboratório de microbiologia do Centro Federal de Educação Tecnológica do Amazonas.

Tabela 1 – Espécies de plantas medicinais usadas na pesquisa

Nome científico	Nome Popular	Família	Descrição Botânica
<i>Kalanchoe brasiliensis</i>	Coirama	Crassulaceae	Arbusto
<i>Bonania ferrugineus</i>	Cipó - Tuíra	Convolvulaceae	Trepadeira
<i>Vernonia condessata Beker</i>	Falso-Boldo	Asteraceae	Arbusto
<i>Jatropha curcas L.</i>	Pião-Branco	Euphorbiceae	Árvore
<i>Costus spicatus</i>	Pobre-velho	Costaceae	Arbusto

Fonte: BORRÁS, 2003 & REVILLA, 2002.

3.2 Preparo e isolamento das amostras

As amostras foram preparadas individualmente, após assepsia, pequenos fragmentos da borda, base, ápice (folhas), caule e pecíolo de plantas (Tabela 2) medindo aproximadamente 1 cm x 1 cm foram cortados. Os fragmentos foram transferidos para placas de petri devidamente esterilizada contendo meio de cultivo Agar Batata Dextrose - BDA com clorafenicol (1000 mL; 300 mg) como inibidor bacteriano e todo o material foi incubado à temperatura ambiente de 28 ± 2 °C durante 15 dias.

Tabela 2 – Fragmentos de tecidos vegetais das plantas medicinais incubadas

Planta coletada	Tipo de microrganismo isolado	Quantidade de amostras referentes aos tipos de tecido vegetal		
		Folhas (borda, base, ápice)	Caule	Pecíolo
Coirama	Fungo	15	5	5
Cipó-tuíra				
Pião-branco				
Falso-boldo				
Pobre-velho				

3.3 Isolamento das colônias e identificação dos fungos

Após 15 dias de incubação, o isolamento foi realizado pela transferência dos micélios ou conídios em tubos de ensaio inclinados com meio BDA + clorafenicol e foram mantidos a 22 °C por mais 15 dias. A identificação dos fungos isolados foi realizada utilizando o método de cultura em lâmina ou técnica do microcultivo (KERN & BLEVINS, 1999), que estimula a produção de macro e microconídios que na maioria das vezes identificam permitem a identificação do fungo. As lâminas foram levadas e observadas ao microscópio ótico, para a identificação dos fungos isolados.

3.4 Caracterização dos apêndices das plantas estudadas

Para a caracterização dos apêndices foliares, seções laminares da planta foram retiradas com auxílio de lâminas de aço em cortes transversais, à mão livre, utilizando espuma de poliestireno expandido (isopor) como suporte. Os cortes foram submetidos a uma prévia clarificação em hipoclorito de sódio e depois de aderidos às lâminas posteriormente coradas com fucsina básica e fixadas com glicerina, segundo Johansen (1940) e Kraus & Arduin (1997). Os materiais botânicos foram observados e fotografados com auxílio da câmera digital Sony Cyber Shot acoplada a um microscópio óptico triocular.

4. ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS DADOS

4.1 Caracterização da microbiota fungica epifíticos: isolamento e identificação

Foram obtidos 84 isolados de 5 gêneros diferenciados de fungos conforme Tabela 3. De um modo geral observou-se maior variedades de fungos epifíticos nas folhas dos hospedeiros que nos caules, reduzindo ainda mais no pecíolo. De acordo com Souza (2004) este fato sugere que após a entrada dos microrganismos, principalmente através da folha, acaba ocorrendo uma migração para as diferentes partes das plantas.

Tabela 3: Colônias de fungos epifíticos isolados de folhas, caules e raízes das plantas hospedeiras

Planta Hospedeira	Folha		Caule		Pecíolo	
	UFC/Gêneros de fungos		UFC/Gêneros de fungos		UFC/Gêneros de fungos	
<i>Kalanchoe brasiliensis</i> (Coirama)	8	2	4	2	6	2
<i>Bonamia ferrugineus</i> (Cipó – tuíra)	8	4	5	3	6	2
<i>Jatropha curcas</i> L.(Pião-Branco)	4	4	4	2	6	2
<i>Vermonia condesata</i> Beker (Falso-boldo)	5	4	5	3	8	2
<i>Costus spicatus</i> (Pobre-velho)	5	5	5	3	5	2
	30	19	23	13	31	10
Total de isolados	84 UFC/ 05 Gêneros de fungos					

Os fungos isolados apresentaram estruturas reprodutivas e foram classificados após observação dos aspectos macro e micromorfológicos. Comparando dados da literatura foi possível identificar os gêneros representados na Figura 1. *Aspergillus*, *Fusarium*, *Spaidicoides*, *Penicillium* e *Trichoderma* segundo Barnett & Hunter (1972), Koneman et. al, (1983). Os resultados deste trabalho corroboram com os resultados alcançados por Stamford et. al. que isolaram microrganismos epifíticos de tubérculos de plantas tendo encontrado os gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Trichoderma*.

De acordo com Kruppa & Russomanno (2005) os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Trichoderma* são considerados capazes de produzir metabólicos tóxicos, denominados de micotoxinas, sendo, portanto, de interesse econômico e médico. A atuação do *Fusarium sp.* é bem estudada em plantas de campo, pois este é um fungo agressivo, responsável pela síndrome da queda dos frutos, assim como outras espécies, tais como: *Aspergillus sp* e *Penicillium sp* segundo Mota & Gasparotto (1998). O gênero *Trichoderma sp.* é um promissor agente de biocontrole. Segundo Melo (2001) o *Trichoderma sp.* é um fungo natural do solo encontrado especialmente em solos orgânicos, que pode viver saprofiticamente ou parasitando outros fungos. Já o gênero *Spaidicoides* não foi encontrado nenhum registro sobre sua atuação e aplicações.

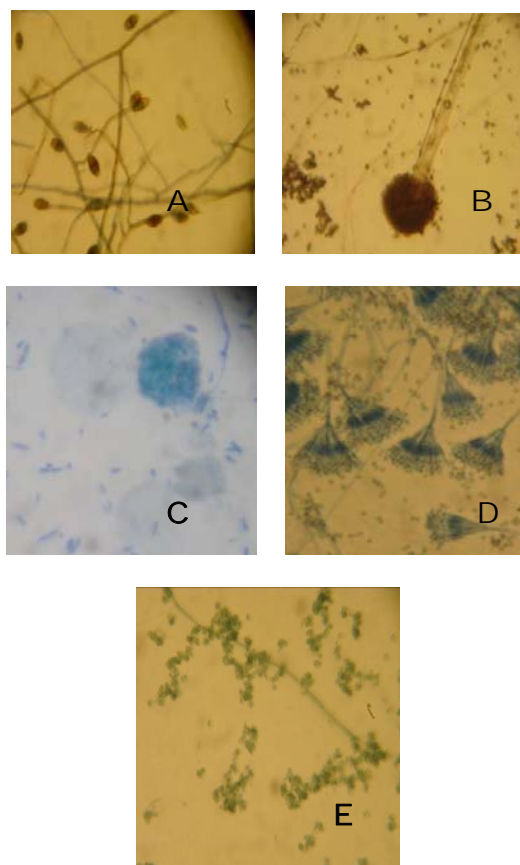


Figura 1 - Fungos identificados das plantas medicinais:
A – *Spaidicoides* B – *Aspergillus* C – *Fusarium* D – *Penicillium* e E – *Trichoderma*

4.2. Caracterização das epidermes quanto aos apêndices (Tricomas) presentes nas plantas medicinais estudadas

Para colonizar plantas, os fungos utilizam estratégias que vão desde a invasão do tecido até a sua variedade de formas de reprodução (esporos, etc.). Vírus e bactérias, bem como alguns fungos parasitas, freqüentemente dependem de aberturas naturais ou ferimentos para invasão, Knogge (1996). Entretanto, um grande número de fungos desenvolve mecanismos para, ativamente, ultrapassar barreiras estruturais externas das plantas. Segundo Correa et. al., (2008) os tricomas são adaptações vantajosas para plantas de ambientes secos, com muita luz ou vento, podendo reduzir a perda de água por transpiração. Afetam a oviposição, liberando substâncias ácidas ou apresentam formas celulares que dificultam a locomoção sobre a superfície foliar; funcionam como obstáculo, considerando a densidade, forma e tamanho. Algumas plantas exibem uma correlação negativa entre a densidade de tricomas e as respostas alimentares, indicando uma barreira física. Podem ser repelentes pelo odor ou sabor por apresentarem terpenos, fenóis ou alcalóides, Melo et. al. (2002). De acordo com Reis e Olivares (2006) os tricomas são estruturas extremamente frágeis podendo colapsar com facilidade sob ligeira pressão, devido a isso há grande dificuldade em mantê-los íntegros, porém é possível classificá-los pela observação dos cortes transversais, nas plantas estudadas, em relação à quantificação em **bastante**, **médio** e **pouco freqüente**.

As plantas medicinais *Vermonia condesata* (Falso-boldo) e *Bonamia ferrugineus* (Cipó-tuíra) foram classificadas de acordo com a quantidade de tricomas em plantas que tem bastante tricomas (Figura 2 A, B, C, N, O e P). Na planta medicinal *Costus spicatus* (Pobre - velho) houve uma grande dificuldade devido as folhas serem alternas, longas e com tricomas visíveis, porém, quando cortadas colapsavam com facilidade, as vezes até com simples toque, depois de dezenas de tentativas foi possível classificá-la pela sua quantidade moderada de tricomas como médio (Figura 2. J, L, M). Nas plantas *Kalanchoe pinnata* (Coirama) e *Jatropha curcas* (Pinhão - branco) (Figura 1 D, E, F, G, H e I) não foi evidenciado a presença de tricomas na epiderme destas. Podemos salientar ainda que os tricomas analisados foram simples e unicelulares .

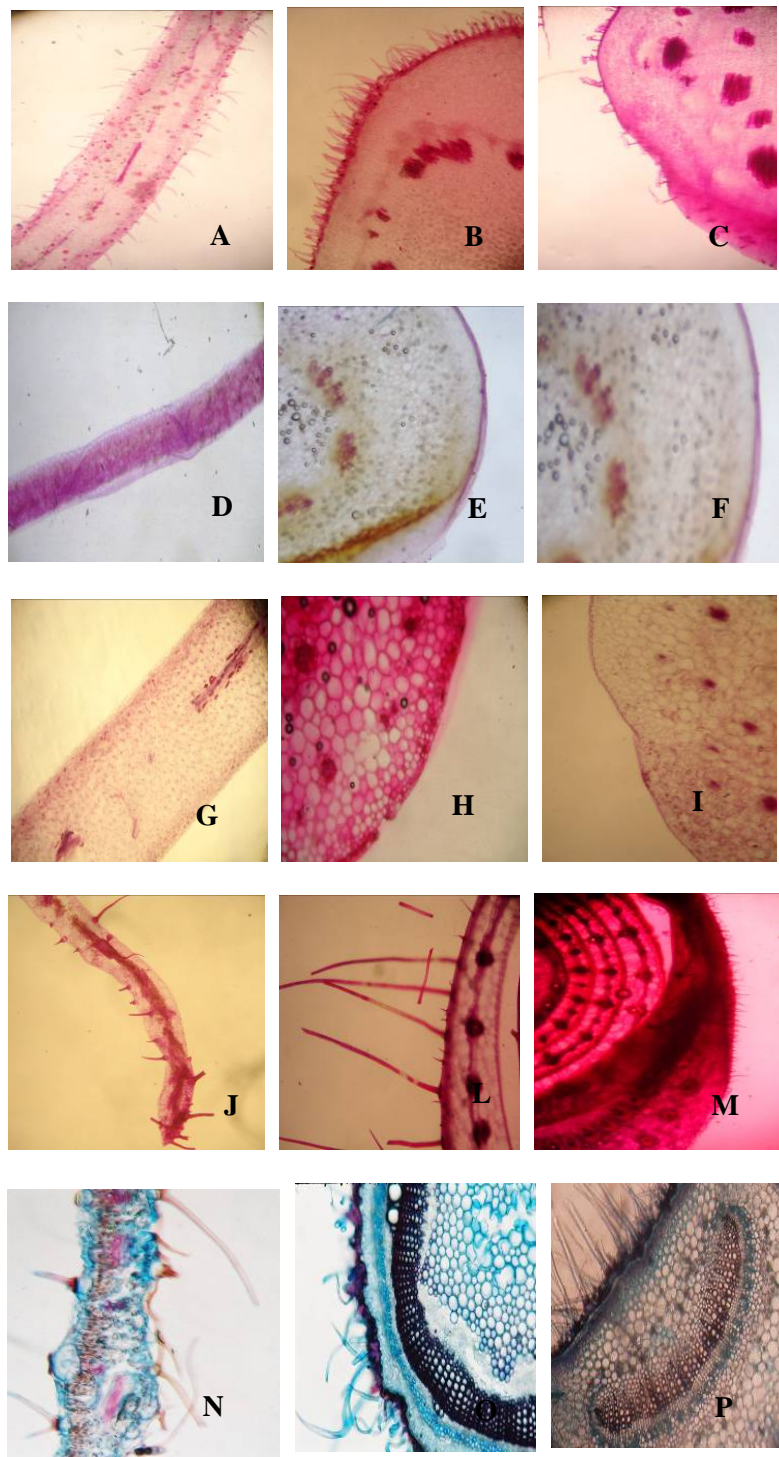


Figura 2. Cortes transversais da plantas medicinais.

A (folha), B(pecíolo), C(caule), da planta *Vernonia condensata*,
D (folha), E (pecíolo) e F (caule) da planta *Jatropha Curcas L.*
G(folha), H(pecíolo), I(caule) da planta *Kalanchoe pinnata*.
J(folha), L(pecíolo), M(caule) da planta *Costus spicatus*.
N(folha),O(pecílo) e P(caule) da planta *Bonamia ferrugineus*
Choisy House.

5. CONCLUSÕES

Na plantas medicinais *Vermonia condesata* (falso-boldo), *Bonamia ferruginea* (cipó-tuíra), *Costus spicatus* (pobre - velho), *Kalanchoe pinnata* (coirama) e *Jatropha curcas* (pinhão – branco) foram isolados 05 gêneros de fungos epifíticos: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Spadicoides*, *Penicillium* e *Trichoderma*.

As plantas medicinais *Vermonia condesata* (falso-boldo) e *Bonamia ferruginea* (cipó-tuíra) apresentaram maior incidência de tricomas. A planta *Costus spicatus* (pobre - velho) apresentou uma quantidade moderada de tricomas. Em *Kalanchoe pinnata* (coirama) e *Jatropha curcas* (pinhão – branco) não foi detectado a presença de tricomas nas suas epidermes.

A espécie *Costus spicatus* destacou-se em relação às demais, pois apresentou uma variedade maior de gêneros de fungos epifíticos nas folhas.

O material anatômico vegetal desenvolvido no projeto foi disponibilizado para aulas de Vegetais Superiores no Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas e os isolados fungicos foram inseridos na mini micoteca do CEFET-AM para fins didáticos e científicos.

REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? **Revista brasileira de Botânica**. São Paulo, 22(2 - suplemento): 225-229 out. 1999.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. Viçosa: Editora UFV, 2003.
- BASTOS, D. Z. L. et al. FUNGOS ASSOCIADOS À CASCA DO CAULE DE *Platanus orientalis* L. **Revista Estudos de Biologia**, v. 26, n.54, p. 37-41, Jan./Mar. 2004.
- BDT (BASE DE DADOS TROPICAL) BDT, **Biodiversidade e oportunidades tecnológicas – Fitoterápicos**, Disponível em: <<http://www.bdt.fat.org.br/pub/licações/padct/bio/programa.html>> Acesso em 27/05/2008.
- BORRÁS, Maria Rosa Lozano. **Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas?** Manaus, AM: Valer/Governo do Estado do Amazonas, 2003.
- CORREA, Priscila Gomes; PIMENTEL, Rejane Magalhães de Mendonça; CORTEZ, Jarcilene Silva de Almeida and XAVIER, Haroudo Satiro. Herbivoria e anatomia foliar em plantas tropicais brasileiras. *Cienc. Cult.* [online]. 2008, v. 60, n. 3, pp. 54-57. ISSN 0009-6725.
- GOODMAN, R.N. **Plant Pathology International Soybean Program (INTSOY)**. Plant Disease, v.65, n.3, p.214-22, 1982.
- HABERLANDT, G. **Physiological Plant Anatomy**. New Delhi: Today & Tomorrow's, 1990. 777 p.
- KERN, M.E.; BLEVINS, K.S. **Micologia Médica**. São Paulo, SP: Premier, 1999.
- JOHANSEN, D. **Plant Microtechnique**. Nova Iorque: McGraw-Hill Book Company, 1940. 356p.
- KRUPPA, P.C & RUSSOMANNO, E.S. Mancha foliar em palmeira ornamental causada por *Bipolaris incurvata*. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 20., 2007, São Paulo, SP. *Resumos. Biológico*, v.69, n.2, p.159, 2005.
- KNOGGE, W. 1996. Fungal infection of plants. **The Plant Cell** 8: 1711-1722.
- KRAUS, J.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: Editora Universidade Rural, 1997. 195p.
- MENDES-COSTA, M. C. et al. **Isolamento de Fungos Endofíticos Associados à *Prestonia Tomentosa* R. Br. (APOCYNACEAE) NA RESERVA DO BOQUEIRÃO, INGAÍ - MG**. Fundação Educacional de Lavras – Unilavras, 2005.

- MELO, M.O.; Silva-Filho, M.C. "Plant-insect interaction: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms". *Brazilian Journal of Plant Physiology* 14: 71-81. 2002.
- MELO, I.S. de. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: ETHUR, L. Z., CEMBRANEL, C. Z., SILVA, A. C. F. SELEÇÃO DE *Trichoderma* spp. VISANDO AO CONTROLE DE *Sclerotinia sclerotiorum*, in vitro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.5, p.885-887, 2001.
- MOTA, A. M. da; GASPAROTTO, L. Fungos associados à "síndrome da queda de frutos" da pupunheira. **Revista da Universidade do Amazonas: Série Ciências Agrárias**, v.7, p.69-79. 1998.
- PASCHOLATI, S. F., CIA, P. Mecanismos bioquímicos na Resistência de Plantas às Doenças. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, V. 2, p. 1-51, 1994.
- PELCZAR, M. J., CHANG, E. C. S., KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**, Volume II, 2ª ed. São Paulo: Makron Books, 1996.
- PUTZKE, Jair; PUTZKE, Marisa Terezinha Lopes. **Os reinos dos fungos**. Volume II, Santa Cruz do Sul, RS: EDUNISC, 2002.
- RAVEN, P. H., et al. **Biologia Vegetal**. 6ª ed. Rio Janeiro: Editora Guanabara KOOGAN, 2001.
- REIS, V. M. OLIVARES, F. L. Vias de penetração e infecção de plantas por bactérias. **Embrapa Agrobiologia, Documento 216**, 34 p. 2006.
- STROBEL, G. **Endophytes as sources of bioactive products**. *Microbes and Infection*, v. 5, p. 535-544, 2003.
- SOUZA et al., Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Benth. **Acta Amazônica**. VOL. 34(2) 2004: 185 – 195.
- STAMFORD, N.P., MEDEIROS, R., MESQUITA, J.C.P. Avaliação de estirpes de rizóbio para Jacatupé em regime de temperatura elevada. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** v.19.p.49-54, 1995.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi desenvolvido no Programa de Iniciação Científica do CEFET-AM. Agradecemos a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas pela bolsa fornecida à aluna. Agradecemos ainda o contínuo apoio do CEFET-AM.