



AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ASSOCIADOS AOS FRUTOS DO BABAÇU (*Attalea speciosa* Mart ex Spreng).

Deisiane de Souza Silva¹-Unifesspa

e-mail: deisiane@unifesspa.edu.br

Marilene Nunes Oliveira²- Unifesspa

e-mail: mno@unifesspa.edu.br

Agência Financiadora: FAPESPA

Eixo Temático/Área de Conhecimento: Indicar eixo temático conforme aprovação do projeto

1. INTRODUÇÃO

Attalea speciosa Mart ex Spreng, conhecida popularmente como babaçu, é uma palmeira que se destaca por sua importância social e econômica¹. A cadeia produtiva da palmeira é uma das mais significantes do extrativismo vegetal no país. No tocante ao uso da referida espécie, inúmeras são as aplicações, tais como alimentação humana e animal, produção de artesanatos e aplicação na indústria de cosméticos e farmacêutica². A partir da comprovada importância do babaçu e dos escassos estudos voltados à exploração da microbiota desta espécie, o presente trabalho visa o estudo sobre fungos endofíticos associados a *Attalea speciosa*.

Fungos endofíticos são fungos que vivem no interior de tecidos vegetais sem causar-lhes por um certo período de suas vidas danos aparentes à espécie³. Nas últimas três décadas, os micro-organismos endofíticos têm sido estudados e considerados como uma fonte importantíssima para a obtenção de metabólitos secundários (compostos bioativos), com amplas possibilidades de utilização na indústria farmacêutica e na agricultura⁴.

O aumento do número de casos de resistência microbiana aos agentes de controle, bem como, o surgimento de novas doenças e a retirada de produtos agrícolas sintéticos do mercado, tem criado cada vez mais a necessidade pela procura de métodos alternativos no controle de pragas e doenças⁴. Os produtos naturais de fungos endofíticos apresentam um amplo espectro de atividades biológicas, tais como antimicrobiana, antiparasitária, neuroprotetiva, antioxidante, antiviral, citotóxica, imunossupressora, entre outras, encontrando, portanto, aplicação nos diversos setores da indústria⁵.

¹ Graduanda em Química – Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará

² Doutora em Química – Professora Titular Associada da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (FAQUIM/ICE/UNIFESSPA). Membro do Programa de Pós-Graduação em Química da Unifesspa.

Muitos pesquisadores demonstraram que esses metabólitos podem atuar como poderosas drogas contra patógenos humanos e de plantas, o que motiva a realização do presente trabalho. Assim, na perspectiva de avaliar o potencial biotecnológico de isolados fúngicos, o presente trabalho visa à prospecção de fungos endofíticos a partir do coco babaçu.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Isolamento dos fungos:

O coco babaçu foi coletado no Campus II da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará-UNIFESSPA, utilizando-o em três estágios de desenvolvimento: coco novo, médio e maduro, além das folhas da planta, sendo que, de cada fase foram usados fragmentos das partes da fibra, da casca, do fruto, além de pedaços da folha. Cada fragmento foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura batata dextrose agar (BDA).

Preservação dos isolados

Após 21 dias de desenvolvimento com os respectivos isolamentos realizou-se a preservação dos fungos em tubos de ensaio com meio BDA e em frascos de penicilina preenchidos com água estéril.

Produção da manta micelial e extração de DNA

Para a produção das mantas miceliais, os isolados fúngicos foram cultivados em Erlenmeyer com meio líquido (BD- batata e dextrose) e após dez dias de cultivo, as mantas foram transferidas para placas de Petri estéreis e submetidas à secagem sob ventilação em capela de fluxo laminar. Em seguida, preservadas a -20°C.

Extração de DNA

Para a obtenção de amostras de DNA de acordo com os protocolos para amplificação, o laboratório de biologia foi devidamente limpo e os materiais que seriam utilizados esterilizados. As mantas miceliais de 10 isolados fúngicos foram pesadas (0,150 mg/cada) e maceradas em almofariz com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino, e a este adicionado uma solução de CTAB. A dispersão obtida de cada fungo, já em tubos Eppendorf passaram por processos de lavagem com álcool 70% e álcool absoluto com consequente agitação em vortex, centrifugação refrigerada, precipitação com isopropanol e separação de fases. O DNA precipitado foi secado em capela de fluxo laminar. Uma vez extraído o DNA, o armazenamento foi feito em freezer a -20°C. Optou-se em extrair 4 amostras por vez.

A qualidade da extração foi avaliada via eletroforese em gel de agarose a partir das amostras de DNA obtidas. A concentração e a pureza de DNA foram avaliadas por meio da absorbância medida em espectrofotômetro¹⁸ UV-VIS Biodrop Duo nas faixas de 230 nm, 260 nm e 280 nm. As análises de quantificação foram realizadas em parceria com a Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), campus Belém.

Teste de pareamento

Para avaliar o potencial fungicida dos fungos endofíticos da *A. speciosa*, fez-se o pareamento de culturas utilizando nove fungos endofíticos isolados do babaçu (em fase de identificação) frente a dois fitopatógenos, sendo um pertencente ao gênero *Colletotrichum* (C2) e o outro ao *Lasiodiplodia* (L18), obtidos do Instituto Federal de Castanhal e da Embrapa Agroindústria Tropical- Fortaleza/CE, respectivamente. Discos miceliais dos micro-organismos foram colocados pareados em placas de Petri em meio BDA. A competição

entre os microrganismos foi avaliada por meio de medidas e por análise microscópica com aproximações de 10 e 25 X.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir de amostras vegetais de *A. speciosa* Mart ex Spreng, foram obtidos 13 isolados fúngicos (figura 1), diferenciados por suas características morfológicas (pigmentação micelial, tempo de crescimento), os quais são repicados com uma variação de 07 a 10 dias entre os repiques. A partir dos isolados foram produzidas as mantas miceliais para a extração de DNA e feita a preservação para garantir a integridade das características morfológicas dos microrganismos, além de possibilitar a realização de estudos posteriores⁶.

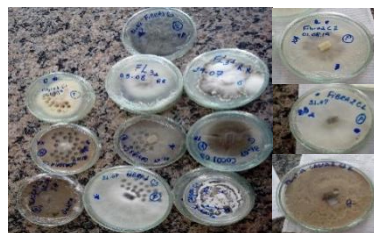


Figura 1: Fungos isolados do babaçu

Por meio do teste de pareamento, observou-se que alguns fungos endofíticos tem potencial em inibir o desenvolvimento dos fitopatógenos (05 endofíticos inibiram o crescimento do *Lasiodiplodia*-L18 e 06 microrganismos inibiram o desenvolvimento do *Colletotrichum*-C2) (figura 2), potencial este, constatado por meio de medidas milimétricas feitas em um paquímetro, a olho nu e por análise microscópica.

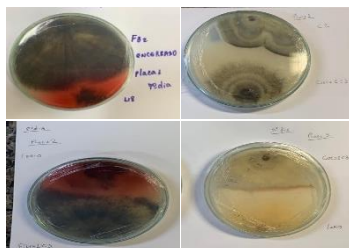


Figura 2: Pareamento de alguns fungos.

Em relação a extração do DNA, foi possível obter o DNA de todas as amostras analisadas, o que pode ser constatado por meio das bandas de DNA veladas em gel de agarose (figura 3).

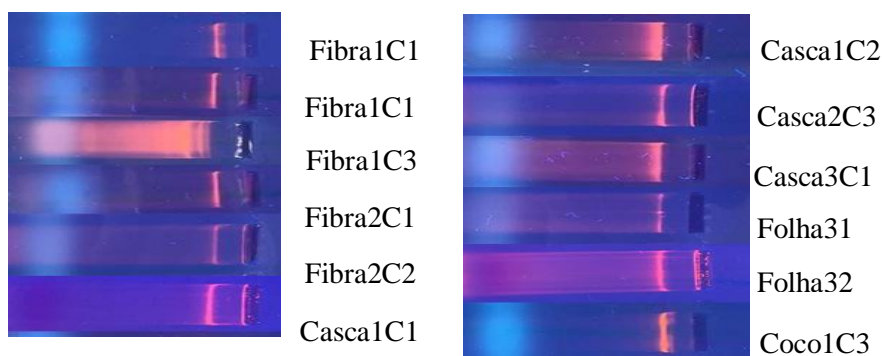


Figura 3: Amostras de DNA reveladas em gel de agarose.

Os dados de quantificação das amostras de DNA ainda serão avaliados para definir os próximos passos da pesquisa, a necessidade de uma nova extração de DNA ou prosseguimento com a padronização de soluções para a realização da PCR.

CONCLUSÃO

A partir dos frutos e folhas do babaçu foram isolados 13 fungos endofíticos que foram preservados e submetidos à extração de DNA. O potencial biotecnológico desses isolados foi avaliado por meio de teste de pareamento. Por meio do teste de pareamento foram observados alguns endofíticos com potencial para o controle dos isolados de *Colletotrichum* e *Lasiodiplodia*. Atualmente, está em andamento, a análise das amostras de DNA a partir da quantificação realizada visando à amplificação do material gênico extraído por PCR e consequente sequenciamento e identificação dos isolados.

REFERÊNCIAS

- 1- CAVALLARI, M. M.; TOLEDO, M. M. **What is the name of the babassu? A note on the confusing use of scientific names for this important palm tree.** Rodriguésia. 67(2), 533-538, 2016.
- 2- CAMPOS, J. L. A. et al. **Knowledge, Use, and Management of the Babassu Palm (*Attalea speciosa* Mart. ex Spreng) in the Araripe Region (Northeastern Brazil).** Economic Botany. 69(3), 240–250, 2015..
- 3- PETRINI, O. 1991. **Fungal endophyte of tree leaves.** In: Andrews, J.; Hirano, S.S. (eds). **Microbia ecology of leaves.** Spring Verlag, New York, USA. pp.179-197.
- 4- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. (2000) **The influence of natural products upon drug discovery.** Natural Product Reports, 17: 215-234.
- 5- Chapla, V. M.; Biasetto, C. R.; Araujo, A. R. **Fungos Endofíticos: Uma Fonte Inexplorada e Sustentável de Novos e Bioativos Produtos Naturais.** Rev. Virtual Quim., 2013,5 (3), 421-437.
- 6- NAKASONE, K. K.; PETERSON, A. W.; JONG, S. **Preservation and distribution of fungal cultures.** In: MUELLER, G. M.; BILLS, G. F.; FOSTER, M. S. **Biodiversity of fungi, inventory and monitoring methods.** San Diego: Elsevier Academic Press, 2004. p. 37-47.
- 7- COSTA, M.R.; MOURA, E.F. **Manual de extração de DNA.** Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2001. 24p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 89).