

Diversidade e distribuição de fungos endofíticos em *Olea europaea* L.

Fátima Martins, José Alberto Pereira, Albino Bento & Paula Baptista

Centro de Investigação de Montanha (CIMO) / Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança,
Campus de Santa Apolónia, Apartado 1172, 5301-855. E-mail: pbaptista@ipb.pt

Resumo

Os fungos endofíticos são organismos que colonizam os tecidos internos das plantas, sem aparentemente causarem quaisquer danos no hospedeiro. Nas duas últimas décadas, estes fungos têm recebido considerável atenção pela ação protetora que conferem às plantas contra stresses bióticos e abióticos, incluindo fitopatogénicos. Em plantas vasculares, a distribuição e composição de fungos endofíticos têm sido intensamente investigada, no entanto, tanto quanto sabemos a sua presença em oliveira (*Olea europaea*) ainda não foi descrita. Neste trabalho pretendeu-se avaliar a diversidade e distribuição de fungos endofíticos em raízes, ramos e folhas de 70 oliveiras saudáveis localizadas na região de Trás-os-Montes (Nordeste de Portugal). Foram obtidas culturas puras para cada fungo e identificadas por sequenciação da região espaçadora transcrita interna do rDNA. De 5250 segmentos analisados, foram isolados 976 fungos endofíticos pertencentes a 38 espécies e 27 géneros. O género *Penicillium* foi o que apresentou maior diversidade de espécies. Entre as espécies, *Phomopsis columnaris*, *Fusarium oxysporum* e *Trichoderma gamsii* foram as mais frequentemente isoladas. A diversidade e a frequência de colonização por fungos endofíticos foi significativamente superior na parte radicular face à parte aérea (ramos e folhas) da oliveira. A população endofítica das raízes foi dominada por *P. columnaris* (23,7%) e por *F. oxysporum* (9,8%), enquanto que nos ramos foi por *T. gamsii* (0,3%), *P. columnaris* e *Hipocrea lixii* (0,2% cada). Nas folhas as espécies mais frequentemente isoladas foram *P. columnaris* (0,6%), *Alternaria alternata* (0,3%) e *Alternaria arborescens* (0,2%). As raízes foram os órgãos que apresentaram um maior número de espécies exclusivas (25 espécies). Por sua vez, nas folhas foi apenas identificada uma única espécie exclusiva (*A. arborescens*) e nos ramos não foram encontradas espécies exclusivas. Apenas uma única espécie, *P. columnaris*, foi encontrada em todos os órgãos da planta em estudo. Em geral, os resultados mostraram que a oliveira apresenta uma grande diversidade de fungos endofíticos, em especial nas raízes.

Palavras-chave: Fungos endofíticos, oliveira, órgão.

Diversity and distribution pattern of fungal endophytes in *Olea europaea* L.

Abstract

Endophytes are organisms that inhabit plant tissues at some stage in their life cycle without causing apparent harm to their host. During the last two decades, endophytic fungi have received considerable attention due to their ability to protect their host against abiotic and biotic stress, including phytopathogens. The distribution and composition of endophytic fungi in vascular plants have been widely investigated, however, as far as we know their presence in olive tree (*Olea europaea*) has not been yet reported.

The main objective of this work was to assess the diversity and distribution pattern of endophytic fungal in roots, branches and leaves in 70 healthy olive trees located in the Trás-os-Montes region (Northeast of Portugal). Pure cultures of each fungus were obtained and identified by sequencing the amplified internal transcribed spacer region of rDNA. A total of 976 endophyte isolates belonging to 38 fungal species and 27 genera were isolated from the 5250 segments examined. The genera *Penicillium* had the greatest species diversity. Among the species isolated, *Phomopsis columnaris*, *Fusarium oxysporum* and *Trichoderma gamsii* were the most frequently isolated. The diversity and the colonization frequency of endophytic fungi were significantly greater on roots in comparison to the aerial part of olive tree (leaves and branches). The endophyte community of the roots was dominated by *P. columnaris* (23.7%) and *F. oxysporum* (9.8%) while in the branches was dominated by *T. gamsii* (0.3%), *P. columnaris* and *Hipocrea lixii* (0.2% each). In the leaves the species most frequently isolated were *P. columnaris* (0.6%), *Alternaria alternata* (0.3%) and *Alternaria arborescens* (0.2%). The roots were the organs with the greatest number of exclusively species (25). In the leaves were only found one exclusively species (*A. arborescens*) and in the branches no exclusively species were founded. *P. columnaris*, was the only

species with occurrence in all the three plant organs. In general the results showed a high diversity of endophytic fungi in olive tree, especially at root level.

Keywords: Endophytic fungi, olive tree, organ.

Introdução

Endófitos são microrganismos, geralmente fungos e bactérias, que colonizam o interior dos tecidos vegetais, sem lhes causar qualquer dano e sem produzirem estruturas externas, como acontece com as bactérias noduladoras e as micorrizas (Hyde e Soyong, 2008). Este tipo de associação, de carácter mutualista, caracteriza-se pelo endófito aumentar o crescimento, reprodução e resistência/tolerância a stresses bióticos e abióticos, da planta hospedeira (Saikkonen et al., 2004). Por sua vez, a planta hospedeira serve de refúgio ao endófito protegendo-o, fornece-lhe os nutrientes necessários para o seu desenvolvimento e possui ainda um papel importante na sua transmissão (Saikkonen et al., 2004). Especificamente, os endofíticos podem aumentar a resistência/tolerância da planta hospedeira contra doenças e pragas (Ownley et al., 2010), herbívoros (ovinos e bovinos), seca, deficiência de nutrientes, entre outros (Hyde e Soyong, 2008). Os microrganismos endofíticos, em especial os fungos, possuem outras propriedades importantes tais como a produção de compostos com interesse farmacêutico e biotecnológico (enzimas, antibióticos e outros metabolitos secundários) (Schul et al., 2002).

A presença de endofíticos foi verificada em todas as espécies vegetais avaliadas, incluindo árvores e gramíneas (Hyde e Soyong, 2008). Na oliveira, tanto quanto se sabe, nunca foi estudada a comunidade endofítica, nem o seu impacto no crescimento, desenvolvimento e resistência da planta hospedeira a stresses bióticos e abióticos. A oliveira é uma cultura de elevada importância nos países da bacia do Mediterrâneo, incluindo Portugal. Contudo, um grande número de inimigos e doenças causam estragos na cultura da oliveira originando prejuízos avultados. De uma forma generalizada, as principais pragas desta cultura são a mosca da azeitona e a traça da oliveira. Relativamente às doenças do olival as mais importantes são a gafa e o olho de pavão. Neste contexto, o presente trabalho pretende contribuir para o conhecimento da relação funcional que se estabelece entre a oliveira e comunidade fúngica endofítica que nela habita, por forma a elucidar o potencial destes fungos na luta biológica contra as principais doenças e pragas da oliveira. Para tal, procedeu-se numa primeira fase à avaliação da diversidade e distribuição de fungos endofíticos em raízes, ramos e folhas de oliveiras localizadas na região de Trás-os-Montes (Nordeste de Portugal). Neste trabalho são apresentados e discutidos os resultados deste estudo.

Material e Métodos

Seleção dos olivais e recolha do material vegetal: Selecionaram-se aleatoriamente 7 árvores da cv. Cobrançosa em 10 olivais localizados na região de Trás-os-Montes (Nordeste de Portugal). Em cada árvore, recolheram-se cinco amostras de raízes, ramos e folhas que foram utilizadas para isolar fungos endofíticos.

Isolamento de fungos endófitos. O material vegetal colhido foi lavado em água destilada e, após o corte das raízes e dos raminhos em secções de 4 cm de comprimento, procedeu-se à sua esterilização superficial. O processo de desinfeção consistiu na imersão sequencial do material vegetal em etanol 70% (v/v) durante 2 min, lixívia (3-5% cloro ativo) durante 3 min (folhas e ramos) ou 5 min (raízes), etanol 70% (v/v) durante 1 min, e três vezes em água destilada estéril (1 min em cada imersão). Após remoção do excesso de água, o material vegetal foi cortado em segmentos (ramos e raízes) ou quadrados (folhas) de 0,5 cm de comprimento e, em seguida, foram transferidos para Placas de Petri contendo meio de cultura de batata dextrose e agar (BDA), que foram postas a incubar no escuro a $25 \pm 2^\circ\text{C}$. A eficácia do processo de esterilização foi verificada pela deposição do material vegetal esterilizado na superfície de meio de cultura BDA em Placas de Petri, seguida da sua remoção. O

crescimento fúngico foi acompanhado diariamente e à medida que as colónias surgiam estas eram repicadas em meio BDA até obtenção de culturas puras.

Identificação molecular dos isolados fúngicos. As colónias fúngicas com características morfológicas similares foram agrupadas. Cada grupo foi identificado molecularmente através da amplificação e sequenciação da região espaçadora transcrita interna (ITS) do DNA nuclear ribossomal utilizando os *primers* universais ITS1 e ITS4 (White et al., 1990), seguindo a metodologia descrita por Oliveira et al. (2012).

Análise de dados. A diversidade de fungos endofíticos em cada órgão da oliveira (raízes, ramos e folhas) foi avaliada no nível da riqueza (número de taxa) e abundância (número de isolados por taxa). A frequência de colonização (expressa em percentagem) foi calculada através do número total de segmentos colonizados por fungos endofíticos dividido pelo número total de segmentos analisados. Foram ainda determinados índices de diversidade recorrendo ao programa *Species Diversity and Richness* (v. 3.0). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando o programa SPSS v.18 e as médias comparadas pelo teste de *Tukey* ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

Verificou-se que a oliveira da cv. Cobrançosa apresenta uma comunidade fúngica endofítica diversificada. Dos 5250 segmentos analisados, foram isolados 976 fungos endofíticos pertencentes a 38 espécies e 27 géneros. O género *Penicillium* foi o que apresentou maior diversidade de espécies. Apesar da grande diversidade de espécies endofíticas associada à cultura da oliveira, é previsível que esta possa ainda ser maior se se considerar a presença de fungos não cultiváveis. A análise da comunidade endofítica das espécies lenhosas *Betula platyphylla*, *Quercus liaotungensis* e *Ulmus macrocarpa* evidenciou valores de diversidade muito semelhantes ao observado na oliveira (Sun et al., 2012). De um total de 1955 isolados foram identificadas 39 espécies em *U. macrocarpa*, 20 em *Q. liaotungensis* e 20 em *B. platyphylla*. Os resultados obtidos mostraram ainda que cerca de 19% do total dos segmentos analisados (ramos, folhas e raízes de oliveira) encontravam-se colonizados por fungos endofíticos. Estudos anteriores de inventariação de fungos endofíticos noutras espécies lenhosas mostraram frequências de colonização superiores, a variar entre 48,5% em *U. macrocarpa* e 65,6% em *Q. liaotungensis* (Sun et al., 2012). De entre a comunidade fúngica endofítica da oliveira, as espécies *Phomopsis columnaris*, *Fusarium oxysporum* e *Trichoderma gamsii*, foram as mais frequentemente isoladas (Figura 1). A elevada predominância de espécies pertencentes ao género *Phomopsis* tinha sido anteriormente verificada em diversas plantas medicinais (Bernardi-Wenzel et al., 2010) e tropicais (Corrado e Rodrigues, 2004). Similarmente, o endofítico *F. oxysporum* foi uma das espécies mais frequentemente isoladas em estudos feitos em *Vitis vinifera* (González e Tello, 2011), enquanto que *T. gamsii* foi em *Hevea brasiliensis* (Gazis e Chaverri, 2010).

A diversidade de fungos endofíticos, avaliada ao nível da sua riqueza (número de taxa) e abundância (número de isolados), diferiu entre os diferentes tecidos da planta analisados. Foi nas raízes que se identificou um maior número de taxa (34) e de isolados (932), seguido pelos ramos (9 taxa e 18 isolados) e folhas (8 taxa e 26 isolados) (Tabela 1). A diversidade entre os três órgãos da planta foi ainda comparada mediante o cálculo dos índices de diversidade de *Simpson* (*D*) e de *Shannon-Wiener* (*Hs*) (Southwood e Henderson, 2000). O índice de *Simpson* traduz a abundância das espécies mais comuns, sendo, conseqüentemente, mais sensível a mudanças que ocorrem nestas espécies. O índice de *Shannon-Wiener*, fundamenta-se no postulado que, numa amostra aleatória retirada de uma população infinitamente grande, todas as espécies da comunidade se encontram representadas (Southwood e Henderson, 2000). Os valores destes índices de diversidade referentes a cada um dos órgãos estudados diferiram significativamente entre a parte radicular (raízes) e a parte aérea (os ramos e folhas) da oliveira, apresentando a raiz valores significativamente superiores (Tabela 1). Apesar de não estar esclarecida a causa destas variações pensa-se que, a colonização e distribuição de fungos endofitos nas plantas, possa ser influenciada pelo tipo e quantidade de nutrientes disponíveis nos diferentes tecidos da planta hospedeira (Rodrigues, 1994). Estudos prévios verificaram igualmente

diferenças de diversidade de fungos endofíticos entre diferentes órgãos da mesma planta hospedeira (Suryanarayanan e Vijaykrishna, 2001; Kumar e Hyde, 2004). Similarmente, foram as raízes de oliveira que apresentaram uma maior frequência de colonização por fungos endofíticos (53,3%). Nos ramos e nas folhas apenas se obteve uma frequência de colonização de 1,0% e 1,5%, respectivamente.

Tabela 1. Diversidade de espécies endofíticas nos diferentes órgãos de *Olea europaea L.*

Comunidade fúngica	Ni	Np	Hs	D
Raiz	932	34	1,4 ± 0.1 ^a	3,7 ± 0.4 ^a
Ramos	18	9	0,2 ± 0.1 ^b	2,1 ± 0.2 ^b
Folhas	26	8	0,2 ± 0.1 ^b	1,8 ± 0.2 ^b
Total	976	38	1,5 ± 0.1 ^a	3,5 ± 0.3 ^a

Ni= n° de isolados; Np=n° de taxa; Hs= índice de *Shannon-Wiener*; D=índice de *Simpson*.

A população fúngica endofítica das raízes foi dominada por *P. columnaris* (23,7%), *F. oxysporum* (9,8%) e *T. gamsii* (3,7%), enquanto que nos ramos foi por *T. gamsii* (0,3%), *P. columnaris* e *Hipocrea lixii* (cada uma 0,2%) (Figura 1). Nas folhas as espécies mais frequentemente isoladas foram *P. columnaris* (0,6%), *Alternaria alternata* (0,3%) e *Alternaria arborescens* (0,2%) (Figura 1). Resultados semelhantes foram obtidos em *Phragmites australis* onde a comunidade de fungos endofíticos isolados das raízes foi dominada por espécies do género *Trichoderma* e *Fusarium* (Angelini et al., 2012). Similarmente, foi verificado que nos ramos de *Hevea brasiliensis* as espécies endofíticas mais abundantes pertenciam ao género *Trichoderma* (Gazis e Chaverri, 2010). As espécies mais comuns observadas nas folhas da oliveira foram também as mais frequentemente isoladas na parte aérea de outras espécies de plantas como a *Laurus nobilis* (Göre e Bucak, 2007).

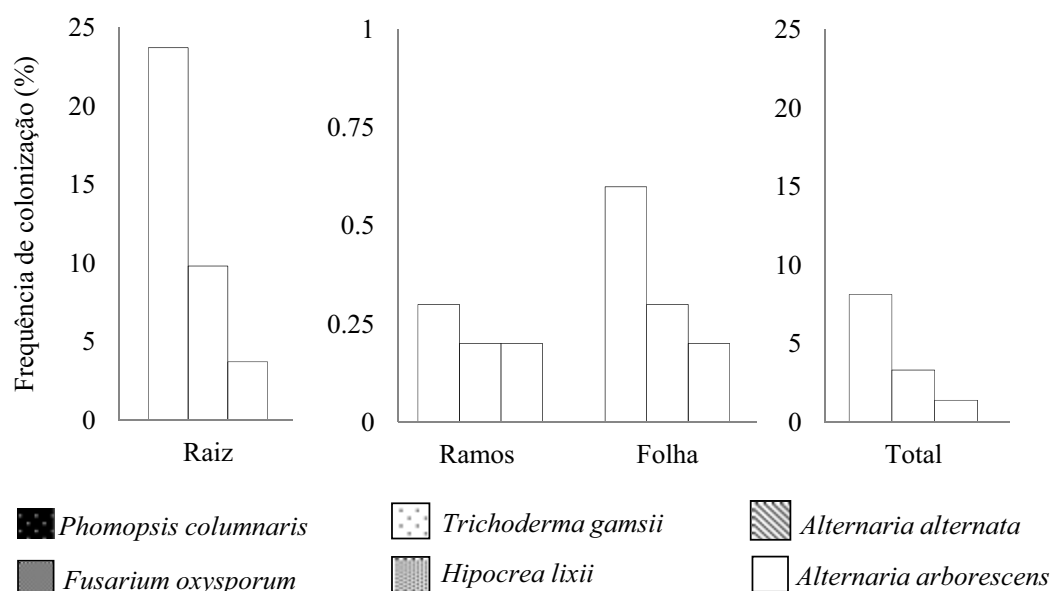


Figura 1. Distribuição das espécies endofíticas predominantes nos diferentes órgãos da oliveira (raiz, ramos e folhas) e no total.

Verificou-se igualmente que a maioria das espécies inventariadas (66% do total das espécies) ocorreu somente num dos órgãos da planta, apresentado as raízes o maior número de espécies exclusivas (25 espécies). Por sua vez, nas folhas foi apenas identificada uma única espécie exclusiva (*A. arborescens*) e nos ramos não foram encontradas espécies exclusivas. Este resultado indica que alguns fungos

parecem mostrar uma certa especificidade para determinado órgão da planta, tal como verificado anteriormente por vários investigadores (Rodrigues, 1994; Clay e Schardl, 2002). No entanto apenas uma única espécie, *P. columnaris*, foi encontrada em todos os órgãos da oliveira. Desta forma, a especificidade pelo hospedeiro pode existir, mas apenas até um certo nível.

Conclusões

Este trabalho constitui a primeiro estudo sobre a comunidade de fungos endofíticos na oliveira (*Olea europaea* L.) na região de Trás-os-Montes (Nordeste de Portugal). O número de espécies e a frequência de colonização de fungos foi significativamente superior nas raízes quando comparado com a parte aérea (ramos e folhas) da oliveira, sugerindo uma distribuição específica para o órgão. *P. columnaris*, *F. oxysporum* e *T. gamsii* foram as espécies dominantes. Pretende-se que os resultados obtidos neste estudo possam ser um contributo na elucidação do papel dos fungos endofíticos na oliveira. Os isolados obtidos serão muito úteis na seleção de espécies que poderão ser usadas como agentes de luta biológica contra diversas pragas e doenças do olival.

Agradecimentos

Projeto PTDC/AGR-AAM/102600/2008 “Fungos entomopatogénicos em pragas da oliveira: isolamento, caracterização e seleção para controlo biológico”.

Bibliografia

- Angelini, P., Rubini, A., Gigante, D., Reale, L., Pagiotti, R., and Venanzoni, R. (2012). The endophytic fungal communities associated with the leaves and roots of the common reed (*Phragmites australis*) in Lake Trasimeno (Perugia, Italy) in declining and healthy stands. *Fungal Ecology* **5**, 683-693.
- Bernardi-Wenzel, J., Garcia, A., Filho, C. J., Prioli, A. J., and Pamphile, J. A. (2010). Evaluation of foliar fungal endophyte diversity and colonization of medicinal plant *Luehea divaricata* (Martius et Zuccarini). *Biological Research* **43**, 375-384.
- Clay, K., and Schardl, C. (2002). Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist* **160**, 99-127.
- Corrado, M., and Rodrigues, K. (2004). Evaluation of fungal extracts produced by endophytic strains of *Phomopsis* sp. *Journal of Basic Microbiology* **44**, 157-160.
- Gazis, R., and Chaverri, P. (2010). Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of wild rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Peru. *Fungal Ecology* **3**, 240-254
- González, V., and Tello, M. L. (2011). The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. *Fungal Diversity* **47**, 29-42
- Göre, M. E., and Bucak, C. (2007). Geographical and seasonal influences on the distribution of fungal endophytes in *Laurus nobilis*. *Forest Pathology* **37**, 281-288.
- Hyde, D., and Soyong, K. (2008). The fungal endophyte dilemma. *Fungal Diversity* **33**, 163-173
- Kumar, D. S. S., and Hyde, K. D. (2004). Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. *Fungal Diversity* **17**, 69-90.
- Oliveira, I., Pereira, A., Lino-Neto, T., Bento, A., and Baptista, P. (2012). Fungal diversity associated to the olive moth, *Prays oleae* Bernard: a survey for potential entomopathogenic fungi. *Microbial Ecology* **63**, 964-974.
- Ownley, H., Gwinn, D., and Vega, E. (2010). Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl* **55**, 113-128
- Rodrigues, K.F. (1994). The foliar fungal endophytes of the Amazonian palm *Euterpe oleracea*. *Mycologia* **86**, 376-385.
- Saikkonen, K., Wali, P., Helander, M., and Faeth, S. H. (2004). Evolution of endophyte-plant Symbioses. *TRENDS in Plant Science* **9**, 275-280.



- Southwood, T., and Henderson, A. (2000) *Ecological Methods*. Blackwell Science, London.
- Sun, X., Ding, Q., Hyde, D., and Guo, D. (2012). Community structure and preference of endophytic fungi of three woody plants in a mixed forest. *Fungal Ecology* **5**, 624-632.
- Suryanarayanan, S., and Vijaykrishna, D. (2001). Fungal endophytes of aerial roots of *Ficus benghalensis*. *Fungal Diversity* **8**, 155-161.
- White, J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M., Gelfand, D., Shinsky, J., White, T. J. (ed) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, San Diego, pp. 315-322.