



IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *Piper hispidum*

Raiani Nascimento Alberto¹, Ravelly Cassaroti², Tiago Tognolli de Almeida³, João Alencar Pamphile⁴

RESUMO: Endófitos, geralmente fungos e bactérias, vivem sistematicamente no interior das plantas, sem causar aparentemente dano a seus hospedeiros. A variedade de endófitos que pode ser encontrada depende da planta hospedeira e a sua idade, distribuição geográfica, clima, entre outros fatores. O objetivo desse trabalho foi identificar molecularmente alguns fungos endofíticos isolados da planta medicinal *Piper hispidum*. Foi amplificado o rDNA de 9 isolados endofíticos empregando os primers ITS1 e ITS4. Estes amplificados foram utilizados no seqüenciamento com o primer ITS1 e analisados no MEGABACE. As seqüências foram editadas no BioEdit e empregadas no Blast do NCBI. As seqüências dos endófitos e outras do NCBI foram usadas na análise filogenética. Dos nove isolados de *P. hispidum*, dois foram seqüenciados com sucesso: os endófitos Isol.1 e Isol.2. Estes apresentaram maior identidade com *Alternaria* e *Guignardia*.

PALAVRAS-CHAVE: Filogenética; Endofíticos; *Piper hispidum*.

INTRODUÇÃO

Endófitos são geralmente fungos e bactérias que vivem no interior de tecidos e órgãos vegetais, interagindo sistematicamente com seus hospedeiros sem causar-lhes aparente dano. Esses microrganismos podem ser isolados do interior de tecidos vegetais previamente desinfetados, para que não sejam isolados juntamente os microrganismos epifíticos. A variedade de endófitos que pode ser encontrada depende da planta hospedeira e a sua idade, distribuição geográfica, clima, altitude, precipitação, entre outros fatores. Os microrganismos endofíticos penetram nas plantas hospedeiras pelas aberturas naturais como estômatos, lenticelas, área de emergência de raízes laterais, hidatódios, ferimentos, aberturas causadas por insetos e pela produção de enzimas (Azevedo, 2002).

A planta medicinal *Piper hispidum*, conhecida como jaborandi ou falso-jaborandi, possui amidas de ação antifúngica e é utilizada popularmente no combate a afecções da pele e cabelos (NAVICKIENE *et al*, 2000).

Devido às propriedades medicinais apresentadas por *P. hispidum* e a ausência de pesquisas sobre fungos endofíticos desta planta, é necessária a caracterização e

¹ Mestranda do Programa de Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá, Maringá – PR, Bolsista da CAPES, raiani_na@hotmail.com

² Doutoranda do Programa de Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá, Maringá – PR, Bolsista da CAPES

³ Graduando da Universidade Estadual de Maringá, Maringá – PR

⁴ Docente da Universidade Estadual de Maringá, Maringá – PR

identificação de endófitos isolados da mesma. Para isto, são empregadas técnicas de biologia molecular, que diferenciam as espécies com uma sensibilidade e especificidade maior, já que, a identificação baseada na taxonomia clássica é utilizada apenas por marcadores morfológicos e análises bioquímicas, dificultando algumas vezes a correta classificação (MAGNANI *et al.*, 2005).

Uma alternativa para a identificação e diferenciação de espécies de fungos com o uso de PCR, é a utilização de *primers* específicos para determinadas regiões. As regiões ITS (Internal Transcribed Spacer) do RNA ribossomal são regiões conservadas do DNA capazes de auxiliar no estabelecimento de relações filogenéticas e distinção de espécies (CHEN *et al.*, 2004). A identificação de fungos endofíticos tem sido realizada por meio de regiões ITS que fornecem a possibilidade da identificação de gêneros de fungos isolados de plantas, pela amplificação e sequenciamento desses isolados confrontados com banco de dados (AZEVEDO *et al.*, 2002), possibilitando sua utilização futura em processos biotecnológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram identificados molecularmente fungos endofíticos já isolados da planta *Piper hispidum*. Para a extração do DNA genômico foi utilizada a metodologia descrita por Bernardi-Wenzel (2010).

Após a extração, para se estimar a concentração do DNA, esse foi analisado por espectrofotometria pelo espectrofotômetro Genesys 10UV. A região ITS1- 5,8S - ITS2 do DNA ribossomal foi amplificada utilizando os primers ITS1 e ITS4 (WHITE *et al.*, 1990). O volume final de cada reação foi de 25 µL, contendo 2,5 µL de tampão (200 mM Tris-HCl, pH 8,4 - 500 mM KCl, 1x concentrado), 2,5 µL de dNTPs (2,5 mM), 1,5 µL de cada um dos primers ITS1 e ITS4 (Invitrogen – 10 pmol µL⁻¹), 1,0 µL MgCl₂ (50 mM), 0,2 µL Taq DNA polimerase (5 U µL⁻¹), 1 µL DNA (10 ng µL⁻¹) e 14,8 µL de água destilada autoclavada. A mistura da reação foi colocada em um termociclador (MJ Research, Inc.TTC-100) programado para realizar 35 ciclos depois de uma desnaturação inicial a 92°C por 4 minutos. Cada ciclo de amplificação consistiu em três estágios: desnaturação (92°C, 40 s), anelamento (55°C, 1 min e 30 s) e extensão (72°C, 2 min). Foi realizada extensão final a 72°C por 5 min. Os fragmentos amplificados foram analisados em eletroforese em gel de agarose a 1% por cerca de uma hora, corado com brometo de etídio. O DNA evidenciado foi fotografado sob luz UV em transiluminador. Foi utilizado DNA Ladder de 1 Kb como marcador molecular de bandas. Os tamanhos dos fragmentos obtidos foram comparados com o do marcador para determinar se correspondiam ao esperado.

Os produtos de amplificação das regiões ITS 1- 5,8S rDNA dos fungos endofíticos isolados foram purificados utilizando-se o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham Biosciences).

Passada essa etapa, as amostras foram seqüenciadas utilizando os DNAs correspondentes à região ITS1- 5,8S rDNA de acordo com Magnani (2005). O seqüenciamento foi realizado em seqüenciador MegaBACE TM 1000 sequencer (Amersham Biosciences). As condições de injeção e eletroforese foram de 2 Kv/60 s e 6 Kv/230min, respectivamente. Após o seqüenciamento, as amostras foram analisadas e editadas. Para a identificação dos isolados, as seqüências nucleotídicas encontradas foram comparadas com aquelas depositadas no banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information website), utilizando o programa BLAST para pesquisa das espécies (MAGNANI *et al.* 2005). A identificação das espécies foi determinada baseada no melhor valor de resultado obtido quanto à similaridade.

Feito isso, as seqüências determinadas foram alinhadas usando o programa MEGA versão 3.1 (KUMAR *et al.*, 2004) com o agrupamento pelo método “neighbor-joining”

(SAITOU e NEI, 1987), usando-se “p-distance” para nucleotídeos com a opção “the pairwise gap deletion” e usando bootstrap com 10.000 repetições e usando bootstrap com 1000 repetições para determinar a distância genética dos fungos isolados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os fungos endofíticos isolados de *Piper hispidum* para identificação por meio de técnicas da biologia molecular foram G12-19, G02-02, G47-47, G60-70, G14-86, G08-08, G11-11, G46-46 e G36-112. A concentração do DNA extraído foi medida utilizando a quantificação por espectrofotometria. Os resultados da quantificação foram os seguintes:

Tabela 1: QUANTIFICAÇÃO DNA – ESPECTROFOTOMETRIA (Espectrofotômetro Genesys 10 UV).

Fungo	260	280	µg/ µL	OD260/OD 280
G12-19	0.031	0.033	0.155	0.939
G02-02	0.026	0.035	0.13	0.742
G47-47	0.010	0.010	0.05	1
G60-70	0.022	0.012	0.11	1.83
G14-86	0.133	0.097	0.665	1.371
G08-08	0.022	0.028	0.11	0.785
G11-11	0.021	0.012	0.105	1.75
G46-46	0.023	0.015	0.115	1.53
G36-112	0.009	0.009	0.045	1

Dos nove fungos, apenas o G02-02 e o G14-86 tiveram sucesso no sequenciamento. Para a identificação dos isolados, as seqüências nucleotídicas encontradas foram comparadas com aquelas depositadas no banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information website), utilizando o programa BLAST para pesquisa das espécies.

Com uma homologia de semelhança de 97%, o fungo G02-02 foi identificado como *Guignardia mangiferae*. O fungo endofítico G14-86, com 99% de similaridade, foi identificado como *Alternaria tenuissima*.

Guignardia mangiferae é um simbiote muito bem sucedido de um grande número de espécies de plantas lenhosas com distribuição em todo o mundo. Pouco se sabe sobre a biologia e ecologia dessa espécie, mas sabe-se que alguns isolados produzem metabólitos secundários de interesse farmacêutico (RODRIGUES, 2004). Dessa forma, é importante determinar a taxonomia e diversidade dos endófitos *Guignardia mangiferae* para que seu potencial biológico seja plenamente explorado.

Alternaria tenuissima é um fungo patogênico capaz de infectar várias partes de plantas de diferentes famílias por todo o mundo. Pode infectar uma alta porcentagem de cereais, produzindo certas toxinas que são perigosas para a planta e para a saúde humana. Essas toxinas foram detectadas em elevadas concentrações em grãos de trigo na Europa, Austrália e América do Norte (GANNIBAL, 2007). Além disso, pode causar a queima de pistache no E.U.A e o apodrecimento de maçãs na África do Sul. Apesar do fato de que *A. tenuissima* é um importante patógeno onipresente, a sua diversidade genética intra-específica, estrutura populacional e especialização por hospedeiro permanecem desconhecidos. Este conhecimento é necessário na fitopatologia para entender a distribuição de fungos e seu potencial evolutivo, além do melhor conhecimento de seus metabólitos secundários (GANNIBAL, 2007).

Ambos os fungos são de espécies patogênicas, mas foram encontrados como endofíticos. Em certas condições e fases dos ciclos vitais, um patógeno pode viver em harmonia com o hospedeiro, bem como um endófito, após um desequilíbrio ambiental, pode causar danos a planta. Em outras palavras, há, como observado nas diferentes interações biológicas, um gradiente e não distinções abruptas entre endófitos, epífitos e patógenos (AZEVEDO, 2002).

CONCLUSÃO

Existem endofíticos de *Piper hispidum* com grande identidade a *Guinardia* e *Alternaria*.

REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JR., W.; ARAÚJO, W. L.; PEREIRA, J. O. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: Serafini, L. A.; Barros, N. M.; Azevedo, J. L. *Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria*. Caxias do Sul: EDUSC, 2002. cap. 8, 235-268.
- BERNARDI-WENZEL, J.; GARCIA, A.; RUBIN-FILHO, C.J.; PRIOLI, A.J.; PAMPHILE, J.A. Evaluation of foliar fungal endophyte diversity and colonization of medicinal plant *Luehea divaricata* (Martius et Zuccarini). *Biological Research*. 2010, 43,375-384.
- CHEN, C.A., *et al.* Secondary structure and phylogenetic utility of the Ribosomal Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2) in Scleractinian corals. *Zoological Studies*. 2004, 43, 759-771.
- GANNIBAL, P.B.; KLEMSDAL S.S.; LEVITIN, M.M. AFLP analysis of Russian *Alternaria tenuissima* populations from wheat kernels and other hosts. *European Journal of Plant Pathology*. 2007, v. 119, n. 2, 175-182.
- KUMAR, S., *et al.* MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*. 2004, 5, 150-163.
- MAGNANI, M., *et al.* Molecular identification of *Aspergillus* spp. isolated from coffee beans. *Sci. Agric*. 2005, 62(1), 45-49.
- NAVICKIENE, H. M. D.; ALÉCIO, A. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; CAVALHEIRO, A.J.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*. 2000, v. 55, n. 6, p. 621-626.
- RODRIGUES, K.F.; SIEBER, T.N.; GRÜNIG, C.; HOLDENRIDER, O. Characterization of *Guinardia magiferae* isolated from tropical plants based in morphology, ISSR-PCR amplifications and ITS1-5.8SITS2 sequences. *Mycological Research*, 2004, v. 108, 42-52.
- SAITOU, N.; NEI, M. *The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees*. *Mol. Biol. Evol.* 1987, 4, 406-425.
- WHITE, T.J., *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J. & White, T.J. (Eds.). 1990. PCR Protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, 1990, 315-322.