

IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS PRODUTORES DE BIOATIVOS PARA *Mycobacterium tuberculosis*

Karla Simone Rodrigues FERREIRA¹; João Vicente Braga de SOUZA²; Júlia Iñez SALEM³

¹Bolsista PAIC/FAPEAM/INPA; ²Orientador CPCS/INPA; ³Colaboradora CPCS/INPA

1. Introdução

Pesquisas realizadas com fungos endofíticos, microrganismos que vivem dentro das plantas sem lhes causar danos, revelam ampla variedade de seus metabólitos secundários que podem ser utilizados como: antifúngico, antiviral, antitumoral, antimicobacteriano, antibacteriano, antiprotzoário, entre outros (Strobel *et al.* 2001; Isaka *et al.* 2001; Castillo *et al.* 2002; Chinworrungsee *et al.* 2004; Atmosukarto *et al.* 2005; Pongcharoen 2008).

Recentes pesquisas realizadas por Lima, (2007), Oliveira (2008) e Lima (Projeto de Princípios Bioativos - Financiado pelo CNPQ - 2009), apresentaram caldos metabólitos produzidos por fungos endofíticos de *Piper aduncum* L., *Caesalpinia ferrea* Martius e *Himathantus succuba*, com atividade sobre o crescimento do *Mycobacterium tuberculosis*.

Embora os fungos endofíticos testados por Lima (2007 e 2009) e Oliveira (2008) apresentem atividade de interesse biotecnológico, não foram realizadas pesquisas quanto à etiologia desses microrganismos.

Neste sentido, o presente trabalho visa identificar 34 fungos bioativos para a tuberculose, de Lima (2007), Oliveira (2008) e Lima (Projeto de Bioativos - Financiado pelo CNPQ - 2009), pertencentes ao acervo de microrganismos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA.

2. Material e Métodos

Foram utilizados 34 fungos endofíticos pertencentes ao acervo de microrganismos do INPA. Todas as 34 amostras fúngicas foram reativadas em meio de cultivo BDA (Agar batata-dextrose). A identificação dos fungos foi realizada por duas metodologias.

Primeira: Identificação fenotípica – Onde se realizou uma avaliação macroscópica dos fungos (crescimento micelial, tamanho da colônia, característica das bordas, textura, relevo e pigmentação do meio) e avaliação microscópica (de acordo com as chaves taxonômicas – Lacaz (1998)).

Segunda: Identificação genotípica – para tanto foi realizada a extração do DNA fúngico utilizando o kit Qiagen, procedimentos conforme manual do fabricante. Em seguida, visando a amplificação do material extraído, o mesmo foi submetido a uma reação em cadeia da polimerase. Logo o produto amplificado foi submetido a um aparelho de seqüenciamento que forneceu a seqüência de nucleotídeos de cada amostra fúngica. As seqüências genômica foram analisadas pelo BLAST contra a base de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information website (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)).

3. Resultados e Discussão

De 34 fungos endofíticos isolados dos vegetais *P. aduncum*, *C. férrea* e *H. succuba*, foram identificados 12 isolados. Na tabela 1 estão apresentados os gêneros dos fungos de acordo com a técnica de identificação empregada.

Tabela 1 - Fungos endofíticos identificados por técnicas clássicas e moleculares.

Isolado	Planta de onde foi isolado	Identificação por técnicas clássicas (Macrocultivo e Microcultivo) Gênero	Identificação por técnica molecular (seqüenciamento do DNA fungico)	
			Seqüência	Gênero
K03	<i>P. aduncum</i>	<i>Fusarium</i> sp.	NR*	NI*
KP05	<i>P. aduncum</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	NR*	NI*
KP09	<i>P. aduncum</i>	<i>Penicillium</i> sp.	NR*	NI*
KP10	<i>P. aduncum</i>	<i>Penicillium</i> sp.	NR*	NI*
KP11	<i>P. aduncum</i>	<i>Penicillium</i> sp.	NR*	NI*
KP15	<i>P. aduncum</i>	<i>Aspergillus</i> sp.	NR*	NI*
KP21	<i>P. aduncum</i>	<i>Penicillium</i> sp.	NR*	NI*
KC22	<i>C. ferrea</i>	<i>Fusarium</i> sp.	ACTTACCTATACGTTGCTTCGG...	<i>Fusarium</i> sp.
KC25	<i>C. ferrea</i>	<i>Xylaria</i> sp.	AACCCCTGTGA-CATACCTATC...	<i>Xylaria</i> sp.
KC28	<i>C. ferrea</i>	NI*	GCTTTAAGACCGTACCTCCTAT...	<i>Phanerochaete</i> sp.
KC29	<i>C. ferrea</i>	NI*	CTCGGGGCATGTGCACGCCTG...	<i>Diaphorte</i> sp.
KC30	<i>C. ferrea</i>	NI*	TTGTAGCTTGGCCTTACGGGC...	<i>Tinctoporellus</i> sp.

NR* = Não realizada

NI* = Não identificado

Conforme tabela 1, dois fungos endofíticos (KC22 e KC25) foram identificados por ambas as técnicas, permitindo observarmos a concordância na identificação dos gêneros entre as técnicas empregadas.

O Estudo realizado por Melfei *et al.* (2011), apresentou duas substâncias produzidas por metabólitos secundários do fungo endofítico, *Diaphorte* sp., com atividade antagônica ao crescimento do *M. tuberculosis*. Neste sentido, o presente trabalho corroborou com a identificação do isolado de *C. ferrea* (KC29) que de acordo com Oliveira (2008) apresentou atividade inibitória ao crescimento do *M. tuberculosis*. Contudo, podemos sugerir que fungos pertencentes ao gênero *Diaphorte* merecem estudos mais detalhados quanto seus metabólitos secundários visando novos fármacos.

Os fungos pertencentes aos gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* e *Xylaria* são frequentemente isolados, identificados e suas atividades metabólicas comprovadas (Azevedo *et al.*, 2000, Sette *et al.*, 2006, Pongcharoen, *et al.* 2008). Neste sentido, a identificação dos fungos endofíticos isolados dos espécimes vegetais *C. ferrea* e *P. aduncum* pelo presente estudo, corrobora com a literatura.

4. Conclusão

A técnica clássica apresentou eficácia na identificação de fungos endofíticos. No entanto, não podemos considerá-la como único recurso, isso devido ao fato de que para identificação dos fungos é necessária a observação das suas estruturas de reprodução, que frequentemente foram ausentes durante o microcultivo dos fungos endofíticos avaliados no presente estudo.

Foi possível observar a concordância entre a técnica clássica e molecular empregada no presente estudo. Apesar do custo necessário para realização das técnicas moleculares, o protocolo permitiu a identificação de todos os fungos quando esses foram submetidos.

5. Referências

Atmosukarto, I.; Castillo, U.; Hess, W. M.; Sears, J.; Strobel, G. 2005. Isolation and characterization of *Muscodor albus* I-41.3s, a volatile antibiotic producing fungus. *Plant Science*. 169: 854-861.

Azevedo, J. L. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Environmental Biotechnology*. São Paulo, 3(1): 40-65.

Castillo, U. F.; Strobel, G. A.; Eugene J. F.; Wilford, M. H.; Heidi, P.; James, B. J.; Heather, A.; Richard, R.; Condrón, M. A. M.; Teplow, D. B.; Stevens; Yaver, D. 2002. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by streptomycetes NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. *Microbiology*, 148: 2675-2685.

Chinworrungsee, M.; Kittakoop, P.; Isaka, M.; Maithip, P.; Supothina, S.; Thebtaranonth, Y. 2004. Isolation and Structure Elucidation of a Novel Antimalarial Macrocyclic Poly lactone, Menisporospsin A, from the fungus *Menisporopsis theobromae*. *Journal of Natural Products*, 67(4): 689-692.

Isaka, M.; Jaturapat, A.; Rukseeree, K.; Danwisetkanjana, K.; Tanticharoen, M.; Thebtaranonth, Y. 2001. Phomoxanthonones A and B, novel xanthone dimmers from the endophytic fungus *Phomopsis* species. *Journal of Natural Products*, 64 (8): 1015-1018.

Lacaz, C. S.; Porto, E.; Heins-Vaccari, E. M.; Melo, N. T. 1998. Identificação dos fungos: dermatófitos. In: *Guia para identificação: fungos, actinomicetos, algas de interesse médico*. São Paulo, Sarvier. 55-85.

Lima, A. M. 2007. *Estudo da atividade de fungos endofíticos e extratos de Piper aduncum L. (Piperaceae) sobre o Mycobacterium tuberculosis*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas.

Melfei, E.; Bungihan; Mario Tan A.; Mariko Kitajima; Noriyuki Kogure; Scott G. Franzblau; Thomas Edison E. de la Cruz; Hiromitsu Takayama; Maribel G. Nonato. 2001. Bioactive metabolites of *Diaporthe* sp. 133, an endophytic fungus isolated from *Pandanus amaryllifolius*. *The Japanese Society of Pharmacognosy and Springer*.

Oliveira, J. S. R. L. 2008. *Estudo da Caesalpinia ferrea Martius na obtenção de bioativos antagônicos aos agentes da tuberculose e candidíase*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas.

Pongcharoen, W.; Rukachaisirikul, V.; Phongpaichit, S.; Kuhn, T.; Pelzing, M.; Sarayaroj, J.; Taylor, W. C. 2008. Metabolites from the endophytic fungus *Xylaria* sp. PSU-D14. *Phytochemistry*, 69: 1900-1902.

Sette, L. D.; Passarini, M. R. Z.; Delarmelina C.; Salati F.; Duarte, M. C. T. 2006. Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. *World Journal of Microbiology e Biotechnology*, 22: 1185-1195.

Strobel, G.; Hess, W.M.; Baird, G.; Ford, E.; Li, J.Y.; Sidhu, R.S. 2001. *Segolerium Kukenani* gen. et sp. nov. na endophytic taxol producing from the Roraima and kukenan tepuis of Venezuela. *Mycotaxon*, 78: 353-361.