

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

DIVERSIDADE DA COMUNIDADE ENDOFÍTICA DE
***Myrcia puniceifolia* D.C. Myrtaceae**

Bolsista: André Gouveia Belota, CNPq

MANAUS - AM
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO PARCIAL

PIB – B / 0062/2012

Bolsista: André Gouveia Belota, CNPq

Orientadora: Prof^a Dr^a Rozana de Medeiros Sousa Galvão

Colaboradores: Prof. Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto

Prof. MSc. Italo Thiago Silveira Rocha Matos

MANAUS - AM

2013

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	4
1. INTRODUÇÃO	5
2. JUSTIFICATIVA	8
3. OBJETIVOS	9
3.1. Objetivo Geral	9
3.2. Objetivos Específicos	9
4. MATERIAL E MÉTODOS	10
4.1. Material Biológico	10
4.2. Meios de Cultura	10
4.3. Obtenção de fungos endofíticos	10
4.4. Amplificação de região do gene rDNA.....	11
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Quantificação do DNA após a PCR	12
--	----

1. INTRODUÇÃO

A Amazônia é um dos mais complexos ecossistemas da Terra em equilíbrio, onde participam fatores como umidade, alta precipitação e reciclagem da matéria orgânica. Entretanto, por sua fragilidade, o desmatamento vem quebrando este equilíbrio de modo acelerado (DI STASI, 1989), com o risco de desaparecimento de riquíssimo número de espécies da flora ainda não convenientemente estudadas.

Diversos projetos vem sendo desenvolvidos com a implantação de bancos de germoplasma de plantas medicinais e aromáticas, com o objetivo de sua conservação *ex-situ* para uso futuro no melhoramento genético das espécies.

Pedra ume caá, *Myrcia puniceifolia*, D. C. da família Myrtaceae, possui efeitos hipoglicemiantes pronunciados, de tal modo que chegou a ser chamada de insulina vegetal. É uma árvore de porte arbustivo, bastante ramificada, de caule e ramos tortuosos, ocorrendo em terrenos arenosos à beira de rios, podendo ocorrer sob sombra, chegando a atingir até 5 metros de altura. Normalmente, a população usa o decocto (chá quente) de suas folhas ou até mesmo suas raízes para diabetes, enterite, hemorragia, como agente cicatrizante e anti-inflamatório. No século passado cerca de 50 toneladas de folhas de pedra-ume-caá foram exportadas para a Alemanha e hoje para o Japão (KALIL FILHO, 1998).

Após a descoberta da insulina em 1922 por Banting e Best, vários pesquisadores começaram a estudar a natureza dos princípios hipoglicemiantes existentes em algumas plantas, utilizadas, desde longa data, no tratamento do diabetes melitus, procurando estabelecer sua analogia com o hormônio existente nas ilhotas de Langherans. Sendo os vegetais anti-diabéticos, em geral, adstringentes, os taninos devem inativar os fermentos que atuam nos carboidratos impedindo-lhes a atividade diastática (COSTA, 1975).

Certos vegetais produzem fármacos e devido a isso são considerados como plantas de uso medicinal. Na realidade, estes vegetais podem possuir microrganismos endofíticos que também produzem estes compostos de uso

medicinal o que pode ser explicado por transferência horizontal dos genes durante a longa convivência entre endófito e planta hospedeira. Em outros casos efeitos sinérgicos entre plantas e microrganismos endofíticos acentuam o poder medicinal dessas plantas.

Endófitos são aqueles microrganismos que podem ser isolados do interior de tecidos vegetais desinfectados superficialmente, e que não causam dano ao seu hospedeiro. Estes microrganismos colonizam um nicho ecológico semelhante àquele ocupado por fitopatógenos e, portanto, podem ser importantes candidatos para o controle destes. Diversos trabalhos têm mostrado o potencial dos endófitos para o controle biológico de doenças e pragas, e na promoção de crescimento da planta hospedeira. Entretanto, sabe-se que a interação entre os endófitos e outros microrganismos que estão associados à planta hospedeira, pode inviabilizar a utilização prática de fungos e bactérias endofíticas. Desta forma, o amplo conhecimento da comunidade microbiana e das interações que ocorrem na planta permitem a utilização destes microrganismos na agricultura, promovendo o crescimento vegetal e/ou controlando patógenos de interesse, consequentemente reduzindo a utilização de agroquímicos e os custos de produção. Os microrganismos endofíticos tem também importância em outras áreas do conhecimento além da agricultura. Muitos deles já foram descritos como produtores de compostos antimicrobianos e anti-cancerígenos que vem sendo utilizados na área de saúde. Outros endófitos tem mostrado alta produção de substâncias de interesse biotecnológico, especialmente enzimas. Na conservação do ambiente, endófitos vêm sendo usados como degradadores de produtos tóxicos, na biorremediação, enfim, reduzindo o efeito de poluentes (ARAÚJO et. al., 2010)

A diversidade dos microrganismos endofíticos é bastante alta em plantas e, neste particular, o Brasil é privilegiado, pois além de possuir uma das maiores floras do mundo, localiza-se em grande parte na região tropical que ao que tudo indica é também a que possui a maior diversidade endofítica tanto em bactérias como fungos. Cerca de 100 espécies microbianas foram descritas além de muitas outras desconhecidas ou ainda não classificadas evidenciando a enorme diversidade encontrada. Tudo isso indica que endófitos provenientes

de plantas tropicais e sub-tropicais cultivadas ou não, são uma fonte de novas estruturas moleculares e compostos biologicamente ativos. Mecanismos para detectar a variabilidade inter e intra-específica nos microrganismos ficou facilitada pelo uso de marcadores moleculares.

A ferramenta mais utilizada tem sido o gene do DNA ribossomal pois possibilita observar região ortógola e com variabilidade como as regiões ITS1 e ITS2. Existem várias seqüências ITS depositadas no GenBank para espécies de *Colletotrichum* e *Glomerella* as quais tem sido utilizadas para a identificação de espécies desses gêneros (MORIWAKI et al., 2002; LOBUGLIO e PFISTER, 2008; CROUCH et al., 2009).

A amplificação desse gene tem sido realizada por meio da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction), que consiste na amplificação de uma região específica de DNA sendo flanqueada por oligonucleotídeos. O perfil da amplificação é conseguido pela desnaturação, anelamento e extensão do gene alvo. Tem sido largamente utilizada na identificação de espécies (BROWN et al., 1996; AFANADOR-KAFURI et al., 2003; ANDRADE et al., 2007).

Propriedades medicinais de algumas plantas podem estar relacionadas com metabolismo que são produzidos por microrganismos endofíticos. Devido á grande diversidade vegetal em território brasileiro, seria importante o isolamento e a caracterização desses microrganismos em plantas ainda não exploradas, como são aquelas utilizadas medicinalmente por culturas indígenas das regiões da Amazônia e da mata Atlântica, dentre outros

Microrganismos isolados diretamente de tecidos de plantas quer sejam na condição de endófitos ou diretamente de tecidos necrosados, necessitam de uma correta identificação. Tradicionalmente têm-se realizado a identificação com base nos descritores morfológicos, os quais têm sido largamente criticados pelo fato da grande influência ambiental. Tal fato levou vários pesquisadores à ao isolarem um microrganismo que não se enquadrava nos manuais de taxonomia adotados, o identificarem como nova espécie e adotarem geralmente o nome do hospedeiro.

Atualmente com a revolução das técnicas moleculares que são ofertadas para esse objetivo, ou seja, a identificação taxonômica, com o diferencial de

que acessam diretamente a informação genética contida na molécula de DNA, sem a forte influência ambiental exercida na expressão da forma e tamanho das estruturas usualmente utilizadas para a identificação, é possível uma informação mais acurada a cerca da identificação da espécie em análise.

Essa técnica vem sendo executada como rotina no Laboratório de Genética de Microrganismos (LAGEM) o que tem contribuído para uma rápida identificação dos endófitos isolados de plantas. Nesse sentido, justificamos a execução desse projeto ora submetido, para a identificação da comunidade endofítica de *Myrcia puniceifolia*, D. C. a nível morfológico e molecular.

Este trabalho tem como objetivos estudar a diversidade da comunidade de *Myrcia puniceifolia*, D. C (Myrtaceae), além de caracterizar a nível morfológico os endófitos de *Myrcia puniceifolia*, D. C (Myrtaceae) e identificar com ferramenta molecular por meio da técnica de PCR utilizando a amplificação de parte do gene DNA ribossomal dos endófitos de *Myrcia sphaerocarpa*, D. C (Myrtaceae).

2. JUSTIFICATIVA

Propriedades medicinais de algumas plantas podem estar relacionadas com metabolismo que são produzidos por microrganismos endofíticos. Devido á grande diversidade vegetal em território brasileiro, seria importante o isolamento e a caracterização desses microrganismos em plantas ainda não exploradas, como são aquelas utilizadas medicinalmente por culturas indígenas das regiões da Amazônia e da mata Atlântica, dentre outros

Microrganismos isolados diretamente de tecidos de plantas quer sejam na condição de endófitos ou diretamente de tecidos necrosados, necessitam de uma correta identificação. Tradicionalmente têm-se realizado a identificação com base nos descritores morfológicos, os quais têm sido largamente criticados pelo fato da grande influência ambiental. Tal fato levou vários pesquisadores à ao isolarem um microrganismo que não se enquadrava nos manuais de taxonomia adotados, o identificarem como nova espécie e adotarem geralmente o nome do hospedeiro.

Atualmente com a revolução das técnicas moleculares que são ofertadas para esse objetivo, ou seja, a identificação taxonômica, com o diferencial de que acessam diretamente a informação genética contida na molécula de DNA, sem a forte influência ambiental exercida na expressão da forma e tamanho das estruturas usualmente utilizadas para a identificação, é possível uma informação mais acurada a cerca da identificação da espécie em análise.

Essa técnica vem sendo executada como rotina no Laboratório de Genética de Microrganismos (LAGEM) o que tem contribuído para uma rápida identificação dos endófitos isolados de plantas. Nesse sentido, justificamos a execução desse projeto ora submetido, para a identificação da comunidade endofítica de *Myrcia sphaerocarpa*, D. C. a nível morfológico e molecular.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Estudar a diversidade da comunidade endofítica de *Myrcia sphaerocarpa*, D. C (Myrtaceae).

3.2. Objetivos Específicos

Caracterizar a nível morfológico os endófitos de *Myrcia sphaerocarpa*, D. C (Myrtaceae).

Identificar com ferramenta molecular por meio da técnica de PCR utilizando a amplificação de parte do gene DNA ribossomal dos endófitos de *Myrcia sphaerocarpa*, D. C (Myrtaceae).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material Biológico

Foram utilizadas folhas da planta *Myrcia puniceifolia*. D. C (Myrtaceae) coletadas no setor sul do campus da Universidade Federal do Amazonas, no município de Manaus (3°06'05.20" S, 59°58'23.14"W), sendo amostradas 10 plantas. As coletas foram feitas a partir de tecidos saudáveis de plantas isentas de manchas ou lesões. As amostras acondicionadas em sacos de papel, protegidas do calor e encaminhadas ao Laboratório, onde foram processadas com menos de 12 horas após a coleta.

4.2. Meios de Cultura

O meio de cultura utilizado foi Agar Batata Dextrose (BDA), composto de infusão de batatas (200 g/L), dextrose (15 g/L) e ágar (15 g/L). O pH foi ajustado para 6,8.

4.3. Obtenção de fungos endofíticos

A metodologia utilizada foi a descrita por Pereira et al. (1993), com modificações. Folhas do hospedeiro foram lavadas em água corrente com detergente. A desinfestação superficial foi feita por meio de imersão em: 1) etanol 70% por um minuto; 2) em hipoclorito de sódio (NaClO) 3% por três minutos; 3) em etanol 70% por 30 segundos; 4) em água destilada estéril por 1 minuto.

Seis fragmentos de 5-7 mm obtidos de modo asséptico de folha foram dispostos de modo seriado em placas de Petri contendo o meio BDA, acrescido de ampicilina (50 µg/mL) para inibir o crescimento de bactérias. Todas as placas foram incubadas a 28 °C, em ausência de luz. Para comprovar a desinfestação, 100 µL da água destilada estéril, foi plaqueada em meio BDA e

incubado nas mesmas condições. O repique dos fungos isolados após o crescimento micelial foi feito para tubos de ensaio contendo meio BDA inclinado, à temperatura ambiente.

4.4. Amplificação de região do gene *rDNA*

A PCR (Polimerase Chain Reaction) foi realizada para um volume final de 25 μL , sendo composta por: 1 μL de DNA genômico (10 ng/ μL), 2,5 μL Tampão de amplificação (10X), 3 μL de MgCl_2 (25 mM), 2,5 μL de dNTPs (2,5 mM), 1 μL do iniciador **ITS1 5' – TCC GTA GGT GAA CCT GCG G - 3'** (iniciador anverso) (20 mM), 1 μL do iniciador **ITS4 5' – TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC - 3'** (iniciador reverso) (20 mM), 0,3 μL de Taq DNA polimerase (5 U/ μL) e 13,7 μL de água Milli-Q.

O perfil de amplificação para os conjuntos de iniciadores consistiu de uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por dois minutos e 35 ciclos, sendo 94°C por um minuto – desnaturação, 50°C por um minuto – anelamento, 72°C por dois minutos – extensão, e uma extensão final a 72°C por cinco minutos. A reação foi realizada em termociclador Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9.600.

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8%, por 60 minutos e corados com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). O DNA amplificado foi observado em fotodocumentador de imagem (Biotech Image Master VDS modelo FTI-500, da Amersham Pharmacia Biotech) com luz ultravioleta. Foi utilizado DNA Ladder de 1 Kb (Invitrogen Life Technologies) como marcador molecular de pares de bases.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O número total de fungos endofíticos isolados de folhas de *Myrcia puniceifolia* coletadas no município de Manaus/AM, após três dias de incubação

foi de 100 isolados obtidos de seis fragmentos inoculados isolados de dez plantas, representando 83,3 %.

A completa identificação dos microrganismos endofíticos não é tarefa fácil devido à deficiência de especialistas em taxonomia das diferentes espécies.

Foram identificados até o nível de gênero: *Colletotrichum*, *Guignardia*, e *Xylaria* (Figura 3).

Os isolados estão sendo identificados em nível de Gênero por microscopia óptica, os quais foram observados a nível macroscópico alguns Gêneros como *Guignardia* sp, *Botryosphaeria* sp, *Colletotrichum* sp.

Os endófitos apresentam certa dificuldade de esporulação dificultando a identificação microscópica, devido a este fato não podemos no momento identificar os isolados a nível de gêneros. Os isolados que não conseguirmos identificar por meio da microscopia óptica serão identificados por técnicas moleculares em etapas posteriores ao trabalho.

O fungo de gênero *Guignardia* foi o que apareceu com maior frequência no isolamento, sendo assim, foram selecionados 16 indivíduos puros para identificação molecular. Foi feita a PCR do DNA extraído e posteriormente colocados em eletroforese no gel de agarose 0,8%.

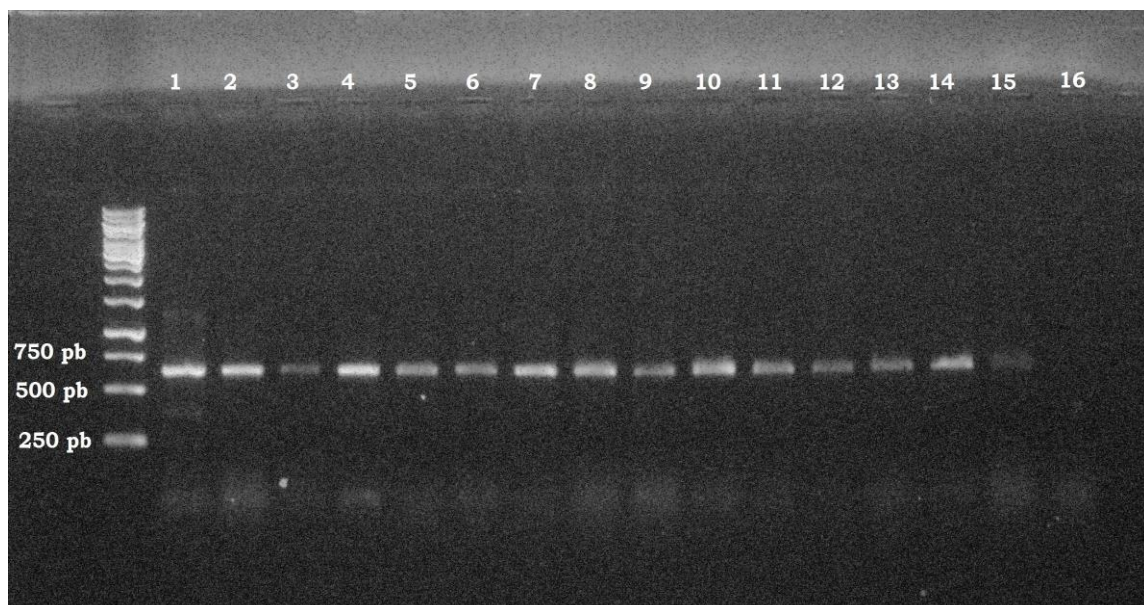


Figura 1: Quantificação do DNA após a PCR.

A foto tirada do gel de agarose 0,8% demonstrou que os fragmentos de DNA amplificados possuem cerca de 500 a 750 pares de base quando comparados com o ladder. As regiões amplificadas foram a ITS1 e ITS4. O indivíduo de número 16 não amplificou.

Será feita a purificação das amostras e então serão encaminhadas para seqüenciamento e comparadas no GenBank.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFANADOR-KAFURI, L.; MINZ, D.; MAYMON, M.; FREEMAN, S. Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora, and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. *Phytopathology*, v. 93, p. 579-587, 2003.

ANDRADE, E.M.; UESUGI, C.H.; UENO, B.; FERREIRA, M.A.S.V. Caracterização morfo-cultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, v. 32, n. 1, p. 21-31, 2007.

ARAÚJO, W. L. ; de; Guia Prático: Isolamento e Caracterização de Microrganismos Endofíticos/ Coordenação de Araújo, W. L. [et. al.,] – Piracicaba: CALO, 167p. 2010.

ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O.S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; LACAVA, P.T. 2002. **Manual: Isolamento de Microrganismos Endofíticos**. Departamento de Genética. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo. Piracicaba, São Paulo, 86p.

ARX, J. A. von. 1974. **The genera of fungi spoculating?? in pure culture.** 2^o ed., J. Cramer, Vaduz, 351p

BARNETT, H.L. & HUNTER, B.B. 1972. **Illustrated genera of imperfect fungi.** 3^a ed., Burgess Publishing Co., Mineapolis, Minnesota, USA, 241p

BROWN, A.E.; SREENIVASAPRASAD, S.; TIMMER, L.W. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum*. *Phytopathology*, v. 86, n. 5, p. 523-527, 1996.

COSTA, O. de A. **Plantas hipoglicemiantes brasileiras.** *Leandra*, v. 5, n. 6, p. 95 – 103. 1975.

CROUCH, J.A.; CLARKE, B.B.; HILLMAN, B.I. What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematic and species diagnosis? A case study using the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* group. *Mycologia*, v. 101, n. 5, p. 648-656, 2009.

DI STASI, L. C. ; SANTOS, E. M. G. ; SANTOS, C. M. DOS ; HIRUMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia.** São Paulo: UNESP. 1989. Suplemento 193p. 365p.

ELLIS, B. M. 1971. **Dematiaceous hyphomycetes.** Surry, Commonwealth Mycological Institute, Kew, 608p.

GIBAS, C.; JAMBECK, P. **Desenvolvendo Bioinformática: ferramentas de software para aplicações em biologia.** Tradução: Cristina de Amorim Machado. Campus, Rio de Janeiro, 2001, 440 p.

KALIL FILHO, A. N. ; LUZ, A. I. R. ; SÁ SOBRINHO, A. F. DE; WOLTER, E. L. DE A. ; PEREIRA JUNIOR, O. L. **Conservação de germoplasma de**

sacaca (Croton cajucara Benth.), uma nova fonte de linalol para a Amazônia Ocidental. Manaus: Embrapa Amazônia, 1998. 3p. (EMBRAPA Amazônia Ocidental.

LOBUGLIO, K.F.; PFISTER, D.H. A *Glomerella* species phylogenetically related to *Colletotrichum acutatum* on Norway maple in Massachusetts. *Mycologia*, v. 100, p. 710-715, 2008.

MORIWAKI, J.; TSUKIBOSHI, T.; SATO, T. Grouping of *Colletotrichum* species in Japan based on rDNA sequences. *Journal of General Plant Pathology*, v. 68, p. 307-320, 2002.

ONIONS, A. H. S.; ALLSOPP, D. & EGGINS, H. O. W. 1981. **Smith's introduction to industrial mycology.** 7^o ed., Edward Arnold, London, 398p.

PEREIRA, J.O.; AZEVEDO, J.L.; PETRINI, O. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a preliminary study. *Mycologia*, Lancaster, v. 85, p. 362-364, 1993.

PETRINI, L. E. & MÜLLER, E. 1986. Haupt-und Nebenfruchtformen?? Europaishcher Hypoxylon-Arten (Xylariaceae, Sphaeriales) und verwandter Pilze. **Mycologia.**

ROSSMAN, A. Y.; PALM, M. E. & SPIELMAN, L. J. 1987. **A Literature guide for the identification of plant plant pathogenic fungi.** APS Press, St. Paul, 252 p.