

Fungos endofíticos associados à pimenta murupi (*Capsicum chinense*): Isolamento, caracterização morfológica e atividade antimicrobiana

Nogueira J.C¹, Maki C.S.², Martins, M.K¹.

¹ Universidade do Estado do Amazonas-UEA, PPG em Biotecnologia e Recursos Naturais, ²
Universidade Federal do Amazonas-UFAM, Manaus, AM.
E-mail cris.maki@gmail.com, jana-nogueira@hotmail.com

Resumo

Fungos endofíticos habitam tecidos vegetais de forma assintomática e estabelecem uma relação considerada mutualística com seus hospedeiros. Este grupo microbiano é reconhecido como uma valiosa fonte de metabólitos secundários com diferentes atividades biológicas que podem ter aplicações na medicina, agricultura, biotecnologia e indústria. Conhecendo o potencial desses micro-organismos, sugeriu-se neste trabalho, a caracterização da comunidade de fungos endofíticos associados ao fruto da pimenta murupi (*Capsicum chinense*) e a avaliação de sua capacidade em produzir metabólitos com atividade antimicrobiana. O número total de endófitos obtidos do endocarpo foi de 133 isolados fúngicos, com frequência total de 33,25%, sendo esses predominantes no isolamento a partir do endocarpo. Cerca de 70% dos isolados fúngicos não produziram estruturas reprodutivas nas condições testadas neste trabalho e, portanto, não puderam ser caracterizados em relação às suas estruturas reprodutivas, totalizando 74 grupos morfológicos. Para outros três grupos, foi possível analisar as características macro e micromorfológicas das colônias e sugerir a sua identificação ao nível de gênero. Pôde-se perceber a predominância de *Fusarium* entre os fungos isolados da pimenta murupi, o qual apresenta micélio cotonoso, de coloração branca a rósea e características micromorfológicas peculiares, tais como a presença de macro e microconídios. Foram selecionados 77 isolados fúngicos para testes de antibiose contra micro-organismos teste: *Staphylococcus aureus* MRSA, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *C. albicans* (ATCC10231), *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*. Apenas um endófito apresentou halo de inibição contra *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA). A partir do DNA genômico, extraído do fungo endofítico com potencial antimicrobiano, foi possível amplificar a região ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA, a qual apresentou

aproximadamente 600 pb. De acordo com o banco genômico, o isolado promissor apresenta 92% de identidade com *Nemania* sp. Por se tratar de um índice considerado baixo, não foi possível inferir sobre sua identificação.

Palavras-chave: *Capsicum chinense*, micro-organismos endofíticos, composto antimicrobiano.

Introdução

Os micro-organismos estão presentes nos mais variados ambientes, interagindo com diversas formas de vida. São organismos extremamente versáteis e habitam ambientes diversificados, incluindo aqueles considerados inóspitos. Micro-organismos associados a plantas são estudados há tempos e em diferentes níveis, formando assim um micro ecossistema complexo, onde diferentes nichos são explorados por uma extensa variedade de micro-organismos. Dentre esses, podemos destacar os endófitos, que são organismos conhecidos por passar parte ou todo o ciclo de vida colonizando os tecidos vivos de uma planta hospedeira sem, entretanto, causar sintomas aparentes de doenças (Schulz et al., 2005).

É estimado que cerca de 80% das plantas são hospedeiras de micro-organismos (Zhang et al., 1997). A natureza dessa interação tem despertado o interesse de bioquímicos, químicos e biólogos na tentativa de entender essas associações, que é um fascinante e amplo campo de pesquisa, devido ao potencial que esses micro-organismos endofíticos têm em proporcionar benefícios aos seus hospedeiros e também, devido às suas aplicações biotecnológicas (Araújo et al., 2002). Até então, acreditava-se que os endófitos não mantinham qualquer relação com as propriedades de interesse apresentadas pelas plantas que os hospedavam (Radwan et al., 2004). Atualmente, mantém-se a hipótese de que genes responsáveis pela expressão de proteínas de interesse nos micro-organismos podem ser transferidos (via transferência horizontal) desses para seu hospedeiro, sendo que esse último expressa as mesmas moléculas de interesse originalmente expressas pelos seus micro-organismos associados (Araújo et al., 2010). Micro-organismos endofíticos já foram isolados a partir de uma grande variedade de plantas (Arnold *et al.*, 2000; Martins 2005; Rubini *et al.*, 2005, Wang e Dai, 2010; Siqueira *et al.*, 2011; Bezerra *et al.*, 2015; Freire *et al.*, 2015). Estima-se a ocorrência de cerca de 1,5 milhões de espécies endofíticas, sendo que deste total, 10% foram descobertas e apenas 1% examinada quanto ao seu espectro de produção de

metabólitos secundários (Guo *et al.*, 2008). Assim, o estudo de bioprospecção de micro-organismos endofíticos que produzam compostos de interesse abre perspectivas para várias frentes de investigação, incluindo a descoberta de novos compostos antimicrobianos. Assim como os hospedeiros estudados até hoje, as pimentas do gênero *Capsicum* apresentam sua diversidade de micro-organismos endofíticos associados. Amaresan *et al.* (2012) isolaram de *C. annuum* cerca de 87 bactérias endofíticas e dentre os isolados, foi possível identificar gêneros como *Bacillus* sp., *Antrobacter* sp. e ainda *B. subtilis*. Devari *et al.* (2013) isolaram da mesma espécie, um fungo endofítico identificado como *Alternaria alternata*, produtor da substância capsaicina, substância responsável pela ardência das pimentas.

O gênero *Capsicum* compreende mais de 200 variedades, dentre as quais as espécies mais conhecidas são *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. pubescens*, *C. chinense* e *C. frutescens* (Menichini *et al.*, 2009; Zimmer *et al.*, 2012). A região norte do Brasil apresenta-se como a área de maior diversidade da pimenta murupi (*Capsicum chinense*), variedade largamente utilizada como complemento a pratos típicos da região, porém além do uso culinário, esse gênero tem reconhecidas propriedades farmacológicas, devido à presença de capsaicinóides (Reyes-Escogido *et al.*, 2011), um grupo de alcalóides exclusivo do gênero *Capsicum*. Existem vários relatos na literatura científica que tratam da atividade antimicrobiana das pimentas, como os trabalhos de Carvalho *et al.* (2010), Oliveira (2011), Kapell (2007), entre outros. Apesar da diversidade de trabalhos com pimentas *Capsicum*, os estudos envolvendo a comunidade endofítica dessas pimentas são escassos, aliado ao pouco conhecimento existente sobre a microbiota endofítica associada à pimenta murupi, uma variedade exclusivamente brasileira, e às características benéficas que esses micro-organismos podem apresentar. Diante dos relatos apresentados e considerando o histórico de *Capsicum* associado a atividades antimicrobianas, a proposta do presente trabalho foi estudar a microbiota endofítica associada à pimenta murupi, no que se refere ao seu potencial na produção de compostos antimicrobianos e à sua diversidade biológica.

Material e Métodos

Foram coletadas 20 pimentas (10 maduras e 10 imaturas) no período de novembro de 2012 a abril de 2013, em cada um dos dois pontos da cidade de Manaus (AM): Tarumã (3°01'15,5"S - 60°04'36,4"W) e Zona Leste (3°04'50"S - 59°56'00,2"W). Somente os frutos e as sementes de pimentas murupi foram utilizados no isolamento de fungos endofíticos. As amostras foram transportadas ao Laboratório de Genética de Micro-organismos da Universidade Federal do

Amazonas, onde foram realizados os procedimentos de assepsia superficial, segundo Araújo et al. (2010): as amostras vegetais foram lavadas em água corrente com detergente neutro e, em seguida imersas em álcool 70% (1 min), hipoclorito de sódio (2,5-3% de cloro ativo) (1 min), álcool 70% (1 min) e duas vezes em água destilada esterilizada. Após a desinfestação superficial, foram transferidos 5 fragmentos de aproximadamente 3 mm² para placas de Petri, contendo ágar batata dextrose (BDA) suplementado com antibiótico tetraciclina na concentração de 50µg/mL. As placas foram incubadas à temperatura de 28°C por 10 dias. Para avaliar a eficácia da desinfestação, alíquotas de 50µL da última água de lavagem foram semeadas em placa de Petri contendo o mesmo meio de cultura e incubadas sob as mesmas condições. A purificação dos isolados foi realizada por meio da obtenção de culturas monospóricas a partir das colônias obtidas no isolamento. Após a obtenção dos isolados purificados, a macromorfologia foi analisada para condições de desenvolvimento micelial específicas: incubação em meio BDA, a 24 °C e no escuro. Análises micromorfológicas foram realizadas após a incubação dos isolados fúngicos em ágar água e nessas, priorizou-se a observação de estruturas vegetativas e reprodutivas em microscópio óptico, em aumento de 400X.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos filtrados dos micro-organismos endofíticos, foi empregado o método de difusão em ágar descrito por Huang et al. (2001). Foram utilizados *Candida albicans* (ATCC 10231), *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* (MRSA) nos ensaios antimicrobianos.

O DNA do isolado com potencial antimicrobiano foi extraído e submetido à amplificação das regiões ITS do rDNA (ITS1-5.8S-ITS2), utilizando-se os *primers* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), descritos por White et al. (1990). As sequências de DNA foram comparadas com as sequências de culturas depositadas no *GenBank*, utilizando o programa *BLASTn* (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponível no portal do *National Center for Biotechnological Information* – NCBI.

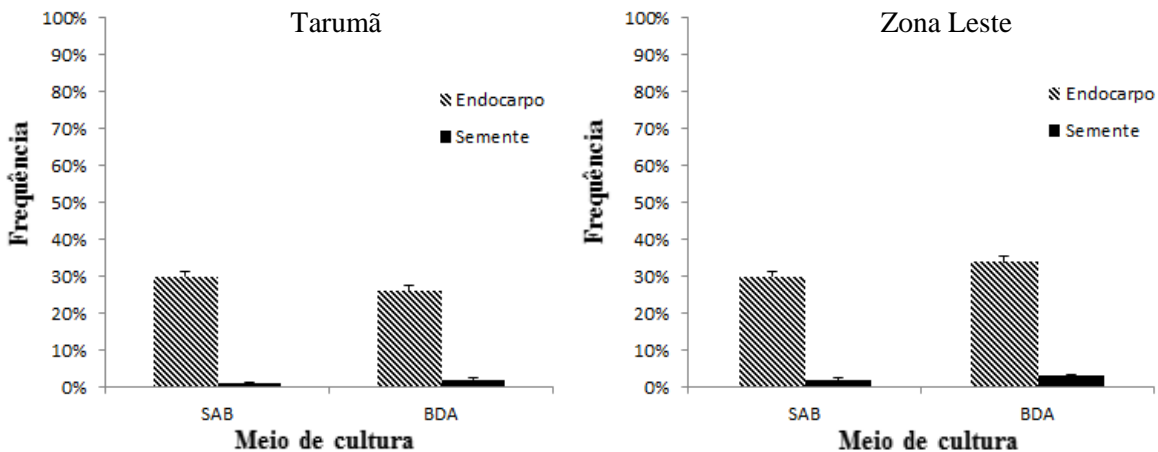
Resultados e Discussão

Um total de 133 isolados de fungos filamentosos foi isolado e todos associados ao endocarpo da pimenta murupi, com predominância em meio Sabouraud. Considerando especificamente os hospedeiros *Capsicum*, ressalta-se ainda a retenção da capsaicina à

placenta do fruto, visto que nenhum fungos endofíticos foi isolado das sementes, o que leva à hipótese de que a própria placenta do fruto pode constituir em uma barreira física e química eficiente para inibir o desenvolvimento dos fungos endofíticos, os quais foram isolados apenas do endocarpo.

A frequência geral de isolamento foi de 33,25% para o total de fragmentos vegetais, sendo as plantas da zona Leste de Manaus as maiores detentoras de fungos endofíticos passíveis de isolamento, quando comparadas às plantas do Bairro Tarumã (Figura 1). Também foi observado que no segundo isolamento, realizado em época chuvosa, houve maior isolamento de endófitos dos tecidos vegetais analisados, especialmente os coletados na zona Leste.

1º Isolamento (Período de seca)



2º Isolamento (Período de chuva)

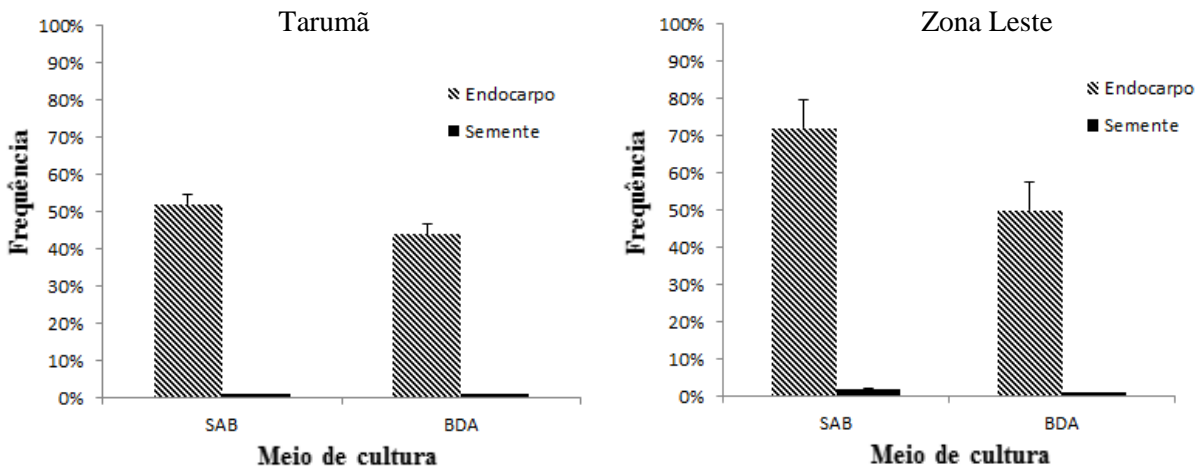


Figura 1. Frequência de isolamento de fungos endofíticos em função da sua localização na planta, do local de coleta e do meio de cultura empregados no isolamento.

Os dados obtidos corroboram com aqueles descritos por Rodrigues (1994) e Suryanarayanan *et al.*, (1998), que obtiveram maior quantidade de micro-organismos endofíticos no período chuvoso, quando comparado ao período de seca. Uma hipótese a ser considerada é a de que os micro-organismos, especialmente aqueles associados à rizosfera e ao rizoplane, encontram mais facilidade de fixação, penetração e colonização da planta através de suas raízes em épocas de solo umedecido, característica predominante do solo à época da realização da segunda coleta.

Cerca de 70% dos isolados fúngicos não produziram estruturas reprodutivas o que dificultou a caracterização, mesmo assim 74 grupos morfológicos foram classificados conforme a macromorfologia apresentada em condições específicas e padronizadas. Para aqueles fungos passíveis de identificação por meio da correlação de dados de macro e micromorfologia, houve a predominância de *Fusarium*, o qual apresenta micélio cotonoso, de coloração branca a rósea e características micromorfológicas peculiares, como a produção de micro e macroconídios, apresentando esses últimos, a forma típica de foice septada.

Dos isolados testados para detecção de atividade antimicrobiana, apenas um apresentou halo de inibição contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (Figura 2).

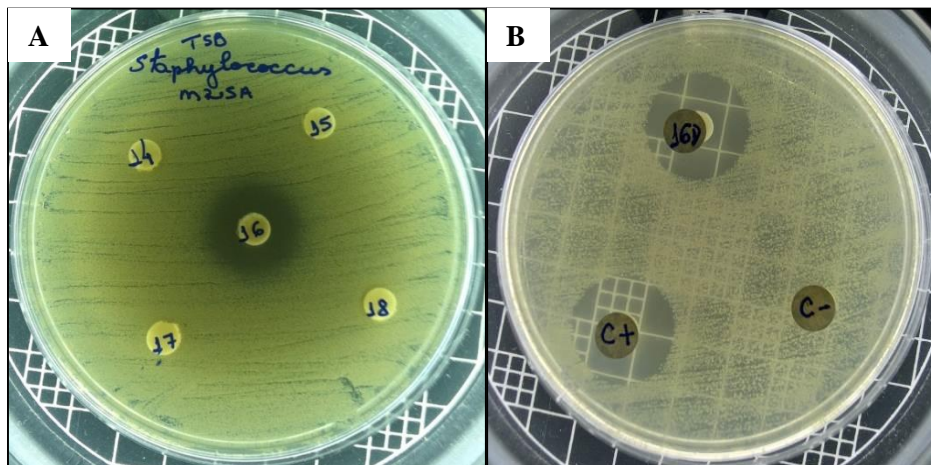


Figura 2. Teste de detecção de atividade antimicrobiana pelo método da difusão em disco. Legenda: (16 e 16D) disco de papel filtro embebido no filtrado do caldo de fermentação do isolado 16, um fungo endofítico de pimenta murupi; (14, 15, 17 e 18) isolados endofíticos que não apresentaram atividade (A) (C+) controle positivo, representado pelo antibiótico ampicilina e (C-) controle negativo, representando apenas o meio de cultura líquido (B).

Análises moleculares desse isolado permitiram sua comparação com nível de identidade de 92% a um isolado de *Nemania* sp. (JQ846087 1 e DQ641634 1) (Figura 3). Baseado nos resultados moleculares, Sánchez-Ballesteros *et al.* (2000) especularam que o gênero *Nemania* pode representar um complexo de espécies com variantes genéticas e fenotípicas indistinguíveis por meio de ferramentas moleculares, ou seja, mesmo isolados de espécies diferentes dentro do gênero *Nemania* podem apresentar homologias completas de regiões conservadas, o que dificulta sua identificação, mesmo com a utilização de métodos moleculares.

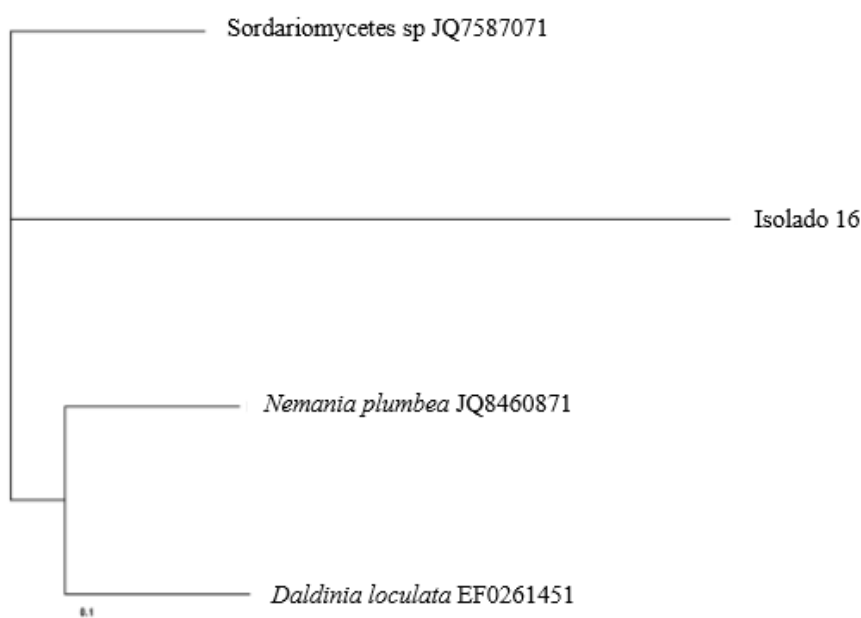


Figura 3. Análise de similaridade genética baseada no alinhamento de sequências ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA do isolado 16 com acessos de maior homologia depositados no banco de dados do NCBI

Conclusão

Fungos endofíticos associados à variedade murupi de *C. chinense* apresentam potencial para o controle biológico de agentes microbianos, sugerindo futuros estudos, especialmente por se tratar de um hospedeiro adaptado ao clima amazônico e provavelmente, constituir uma rica e promissora fonte de micro-organismos associados.

Referências

- Amaresan N, Jayakumar V, Kumar K, Thajuddin N (2012) Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria and their effect on tomato (*Lycopersicon esculentum*) and chilli (*Capsicum annuum*) seedling growth. *Annual Microbiology* 62:805–810.
- Araújo WL, Lima, AOS, Azevedo JL, Marcon J, Sobral JK, Lacava PT, Pizzirani-Kleiner AA (2010) Guia Prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos. Piracicaba: Editora CALQ, 167p.
- Araujo WL, Marcon J, Macheroni W, Van Elsas JD, Van Vuurde JWL, Azevedo JL (2002) Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 4906-4916.
- Arnold AE, Maynard Z, Gilbert GS, Coley PD, Kursar TA (2000) Are Tropical Endophytes Fungi Hyperdiverse? *Ecology Letters* 3: 267-274.
- Bezerra JDP, Nascimento CCF, Barbosa RN, Silva DCV, Svedese VM, Silva Nogueira EB, Gomes BS, Paiva LM, Souza-Motta, CM (2015) Endophytic fungi from medicinal plant *Bauhinia forficata*: Diversity and biotechnological potential. *Brazilian Journal of Microbiology* 46(1): 49-57.
- Carvalho HH, Wiest JM, Cruz FT (2010) Atividade antibacteriana *in vitro* de pimentas e pimentões (*Capsicum* sp.) sobre quatro bactérias toxigenas alimentares. *Revista Brasileira Plantas Mediciniais* 12(1): 8-12.
- Devari S, Jaglan S, Kumar M, Deshidi R, Guru S, Bhushan S, Kushwaha M, Gupta AP, Gandhi SG, Sharma JP, Taneja SC, Vishwakarma RA, Ali Shah B (2013) Capsaicin production by *Alternaria alternata*, an endophytic fungus from *Capsicum annum*; LC–ESI–MS/MS analysis. *Phytochemistry*.
- Freire KTLS, Araújo GR, Bezerra JDP, Barbosa RN, Silva DCV, Svedese VM, Paiva LM, Souza-Motta C M (2015) Fungos endofíticos de *Opuntia ficus-indica* (L.) mill. (Cactaceae) sadia e infestada por *Dactylopius opuntiae* (Cockerell, 1896) (Hemiptera: Dactylopiidae). *Gaia Scientia Edição Especial Cactaceae* 9(2): 104-110.
- Guo B, Wang Y, Sun X, Tang K (2008) Bioactive natural products from endophytes: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44: 136-142.
- Huang Y, Wang J, Li G, Zheng Z, Su W (2001) Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortune* and *Torreya grandis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 31:163-167.
- Kappel VD (2007) Avaliação das propriedades antioxidante e antimicrobiana de extrato de *Capsicum baccatum* L. var. *pendulum*. Porto Alegre, Brasil, 74p. (Dissertação), Mestrado em Ciências em Tecnologia de Alimento. Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS).

- Martins MK (2005) Variabilidade genética de isolados de *Fusarium* spp. e estudo da interação com a planta hospedeira. Piracicaba, Brasil, 124p. (Tese), Doutorado em Fitopatologia. Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz' Universidade de São Paulo – USP)
- Menichini F, Tundis R, Bonesi M, Loizzo MR, Conforti F, Statti G, Cindio B, Houghton PJ, Menichini F (2009) The influence of fruit ripening on the phytochemical content and biological activity of *Capsicum chinense* Jacq. cv Habanero. *Food Chemistry* 114: 553–560.
- Oliveira AMC (2011) Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e atividade antifúngica de pimentas do gênero *Capsicum* spp. Teresina, Brasil, 82p. (Dissertação) Mestrado em alimento e nutrição. Universidade Federal do Piauí – UFPI.
- Radwan T, Mohamed Z, Reis VM (2004) Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* em plântulas de milho e arroz. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília 39(10): 987-994.
- Reyes-Escogido ML, Gonzalez-Mondragon EG, Vazquez-Tzompantzi E (2011) Chemical and Pharmacological Aspects of Capsaicin: *Review Molecules* 16:1253–1270.
- Rodrigues KF (1994) The foliar fungal endophytes of the amazonian palm *Euterpe oleracea*. *Mycologia* 3:376-385.
- Rubini MR, Silva-Ribeiro RT, Pomella AWV, Maki CS, Araújo WL, Santos DR, Azevedo JL (2005) Diversity of endophytic community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Brom Disease. *International Journal of Biological Sciences*, 1:24-33.
- Sánchez-Ballesteros J, González V, Salazar O, Acero J, Portal MA, Julián M, Rubio V, Bills GF, Polishook J, Platas G, Mochales S, Peláez F (2000) Phylogenetic study of *Hypoxylon* and related genera based on ribosomal ITS sequences. *Mycologia*. 92:964–977.
- Schulz B, Boyle C (2005) The endophytic continuum. *Mycological Research* 109(06): 661-686.
- Siqueira VM, Conti R, Araújo JM, Souza-Motta CM (2011) Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. *Symbiosis* 53: 89-95.
- Suryanarayanan TS, Kumaresan V, Johnson JA (1998) Foliar fungal endophytes from two species of the mangrove *Rhizophora*. *Canadian Journal of Microbiology* 44:1003-1006.
- Wang Y, Dai CC (2011) Endophytes: a potencial resource for biosynthesis, biotransformation, and biodegradation. *Annals of Microbiology*, 61: 207215.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, (eds). Academic Press, New York, USA: 315–322.
- Zhang W, Wendel JF, Clark LG (1997) *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8:205-217.

Zimmer AR, Leonardi B, Miron D, Schapoval E, Oliveira JR, Gosmann G (2012) Antioxidant and anti-inflammatory properties of *Capsicum baccatum*: From traditional use to scientific approach. *Journal of Ethnopharmacology* 139: 228– 233.