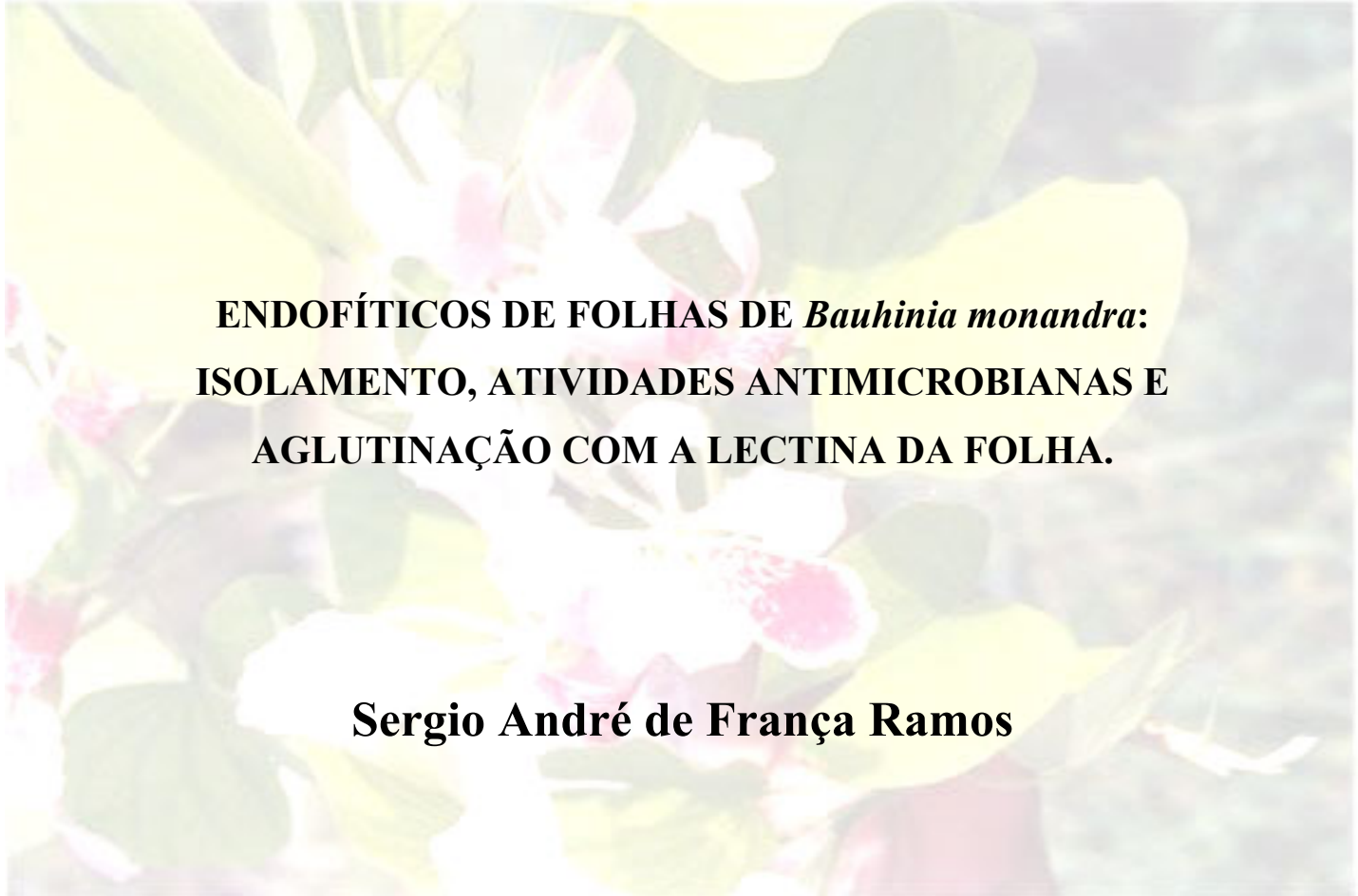


UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA



**ENDOFÍTICOS DE FOLHAS DE *Bauhinia monandra*:
ISOLAMENTO, ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS E
AGLUTINAÇÃO COM A LECTINA DA FOLHA.**


Sergio André de França Ramos

ORIENTADORA: LUANA C. B. B. COELHO

ORIENTADORA EXTERNA: JANETE MAGALI DE ARAÚJO

RECIFE, 2003

SERGIO ANDRÉ DE FRANÇA RAMOS



**ENDOFÍTICOS DE FOLHAS DE *Bauhinia monandra*:
ISOLAMENTO, ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS E
AGLUTINAÇÃO COM A LECTINA DA FOLHA.**

**Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das
exigências para obtenção do
título de Mestre em Bioquímica
pela Universidade Federal de
Pernambuco.**

Aprovado por: _____

FEVEREIRO, 2003.

**A Deus por ser a luz que me guia,
em cada etapa de minha vida.**

**As minhas pequenas e amadas
Sophya, minha filha, e Vanessa,
minha esposa, por me ensinarem
o significado do amor, da vida e
da felicidade.**

AGRADECIMENTOS

A Deus por minha existência, e poder de alguma forma, dar minha contribuição ao mundo.

Aos meus pais e demais familiares pelo apóio constante

A profa. Dra. Luana Cassandra B. B. Coelho, pela orientação, amizade e incentivos, dedicados a minha pessoa.

A profa. Dra. Janete Magali de Araújo, pela orientação, dedicação e valiosa contribuição para o êxito desse trabalho.

Ao Departamento de Antibiótico da Universidade Federal de Pernambuco na pessoa da profa. Dra. Janete Magali de Araújo, pela utilização do Laboratório de Coleção Microbiana, para realização desse trabalho.

A todos os professores do Departamento de Bioquímica, pelos valiosos conhecimentos transmitidos e pelo exemplo profissional.

Aos colegas do Mestrado em Bioquímicas, pela amizade e companheirismo demonstrados ao decorrer do curso.

Aos amigos do Laboratório de Coleção Microbiana do Departamento de Antibióticos, por todas as horas agradáveis que passamos juntos.

As amigas do laboratório de glicoproteínas, pela ajuda e grande amizade.

A Maria, técnica do laboratório de glicoproteína, pela constante ajuda, orientação, dedicação e amizade.

Aos técnicos, auxiliares e amigos do setor de microbiologia do Departamento de Antibiótico, pela ajuda e demonstração de amizade no decorrer do trabalho.

Aos funcionários da Secretaria do Mestrado, Mirom e Djalma, pela constante ajuda e amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelos recursos liberados para a realização desse trabalho.

A todos aqueles amigos e parentes que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

ÍNDICE ANALÍTICO

	Páginas
Lista de Figuras	1
Resumo	2
Abstract	3
Introdução	4
Objetivos	11
Geral	11
Específicos	11
Referências Bibliográficas	12
Trabalho a ser submetido no periódico: Canadian Journal of Microbiology	16
Conclusões	24

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1 Bactérias e fungos endofíticos isolados de folhas de <i>Bauhinia monandra</i>	4
Figura 2 Representação esquemática de aglutinação por lectinas	6
Figura 3 Espécime de <i>Bauhinia monandra</i> (Pata-de-Vaca).	9
Figura 4 Folhas de <i>B. monandra</i> .	9

RESUMO

Endofíticos são microrganismos que vivem no interior das plantas, sem causar sintomas de doenças; vários deles já demonstraram ter uma função benéfica, como defesa contra patógenos. Lectinas são glicoproteínas ligantes de carboidratos que participam de vários processos na célula, um deles sendo a ligação entre bactérias fixadoras de nitrogênio e raízes. No presente trabalho foram isolados bactérias e fungos endofíticos de folhas de *Bauhinia monandra* (Pata-de-Vaca). Os endofíticos foram utilizados para avaliar atividades antimicrobianas. A disponibilidade de uma lectina de folha de *Bauhinia monandra* (BmoLL), altamente purificada, permitiu avaliar potencial atividade aglutinante entre a lectina e bactérias endofíticas. Em três coletas consecutivas foram selecionadas folhas de um mesmo espécime de *B. monandra*. Após desinfestação e fragmentação da folha foi efetuado posterior plaqueamento nos meios SAB (Ágar Saboureaud) e BDA (Batata Dextrose Ágar) acrescidos de tetraciclina, visando o isolamento de fungos. Para o isolamento de bactérias foram usados os meios AN (Ágar Nutritivo), AN 50%, CZ (Czapek) e CAA (Caseína Amido Ágar) acrescidos de ciclohexamida. Foram isolados 69 endofíticos, dentre eles fungos (54%) e bactérias (46%). Um total de 9% dos isolados foi obtido na primeira coleta, 38% na segunda e 54% na terceira e última coleta. Entre os fungos, 30% foram obtidos em meio SAB, 33% em BDA, 14% em CAA, 6% em CZ, 11% em AN e 9% em AN 50%; entre as bactérias, 38% foram obtidos em AN, 29% em AN 50%, 25% em CAA e 10% em CZ. Um total de 32 linhagens bacterianas foram isoladas: 24 foram caracterizadas como gram-positivas e 6 como gram-negativas. A atividade antimicrobiana em bloco de gelose foi realizada nos meios SAB e BDA para os fungos, e nos meios TSA, CAA, AN, para as bactérias. Os testes com fungos não mostraram resultados significativos, enquanto que 62% das bactérias endofíticas apresentaram atividade antimicrobiana, sendo o meio AN o mais eficiente. O ensaio fermentativo mostrou que apenas duas bactérias endofíticas apresentaram atividade. Uma bactéria foi ativa contra os fungos *Aspergillus niger*, *Fusarium moniliform* e *F. oxysporum*, e também contra as bactérias *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*; a outra bactéria apresentou atividade contra *Candida sp.* linhagens 2224, 4224 e 4249, isoladas de imunodeprimidos, *Sarcina lutea* e *Staphylococcus aureus*. Dados preliminares indicaram que na atividade aglutinante da BmoLL contra as bactérias endofíticas, das quatro estirpes testadas, uma bactéria gram-negativa, com atividade antimicrobiana, resultou em aglutinação.

ABSTRACT

Endophytes are microorganisms that live inside the plants, without causing symptoms of diseases; several of them already demonstrated to have a beneficial function, as defense against pathogens. Lectins are glycoproteins which bind carbohydrates and participate of several processes in the cell, one of them being the connection between bacteria fixation of nitrogen and rootses. In the present work bacteria and fungi endophytics of leaves were isolated from *Bauhinia monandra* Pata-de-Vaca). The endophytics were used to evaluate antimicrobial activities. The availability of a lectin from leaves of *B. monandra* (BmoLL), highly purified, allowed to evaluate a potential agglutinating activity between the lectin and endophytes bacteria. In three serial collections leaves of a same specimen of *B. monandra* were selected (Paw-of-cow). After disinfection, fragmentation of the leaf and posterior distribution in the broths SAB (Ágar Saboureaud) and BDA (Potato Dextrose Ágar) added of tetracycline, seeking for the isolation of fungi. For the isolation of bacteria the broths were used AN (Nutritious Agar); AN 50%, CZ (Czapek) and CSA (Casein Starch Agar) added of ciclohexamide. A total of 69 endophytics were isolated, between them fungi (54%) and bacteria (46%). Among the fungi, 30% were obtained in medium SAB, 33% in BDA, 14% in CAA, 6% in CZ, 11% in AN and 9% in AN 50%; among bacteria, 38% were obtained in AN, 29% in AN 50%, 25% in CAA and 10% in CZ. Of the 32 isolated bacterial strains 24 were characterized as gram-positive; 6 as gram-negatives. The antimicrobial activity in gelose block was accomplished in the media SAB and BDA for fungi, and the media TSA, CAA, AN, for bacteria. The tests with fungi did not show significant results, while 62% of the endophytic bacteria presented antimicrobial activity, being the broth AN the most efficient and CAA the less. The antimicrobial activity of the fermentation showed that two endophytic bacteria just presented activity: a bacteria was active against the fungi *Aspergillus niger*, *Fusarium moniliform* and *F. oxysporum*, and also against the bacterial *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*; while the other bacteria presented activity against *Candida sp.* strains 2224, 4224 and 4249, isolated of imunodepressives, *Sarcina lutea* and *Staphylococcus aureus*. Preliminary data indicated that in the agglutinating activity of BmoLL against the endophytic bacteria, of four strains tested, a gram-negative bacteria, with antimicrobial activity, resulted in agglutination.

INTRODUÇÃO

Microrganismos que vivem no interior das plantas, principalmente dentro das folhas, na parede celular e, ou nos espaços vazios entre as células, são conhecidos como endofíticos, podendo ser bactérias ou fungos (Figura 1), que durante o seu ciclo de vida invadem o tecido vegetal vivo e causam infecção inaparente ou assintomática dentro dos tecidos, mas não causam sintomas de doenças (Sprent & James, 1995; Clay & Holah, 1999; Parniske, 2000; Omacini *et al.*, 2001; Redman *et al.*, 2002).

Em uma mesma planta vários endofíticos podem ser encontrados, sejam eles bactérias ou fungos (Figura 1) (Wilson, 1995; Bacilio-Jiménez *et al.*, 2001; Vandenkoornhuyse, 2002).

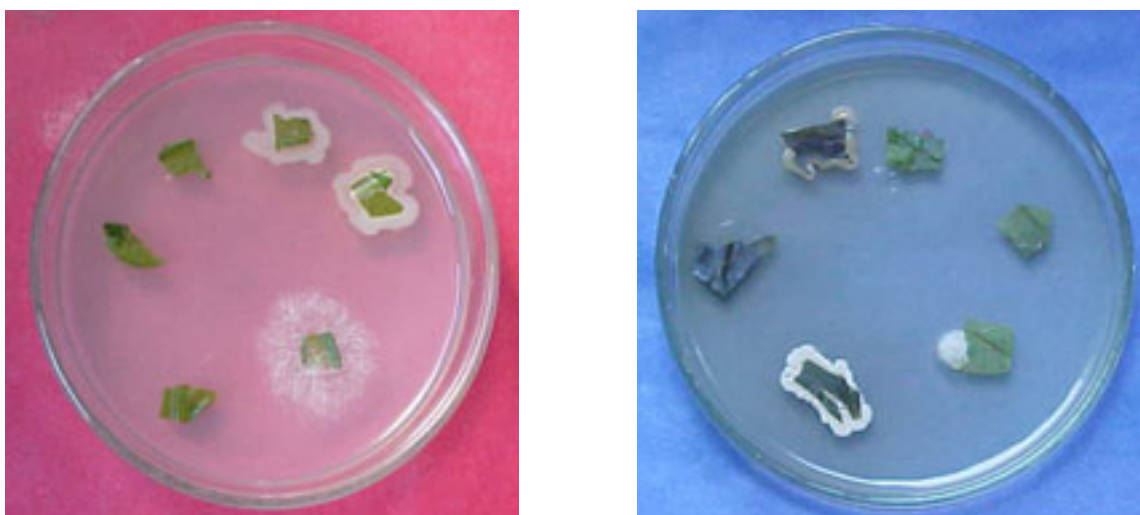


Figura 1. Bactérias e fungos endofíticos isolados de folhas de *Bauhinia monandra*.

Plantas em geral possuem endofíticos, como o endossimbiótico *Rhizobium* comumente encontrado em leguminosas, além de fungos micorrízicos arbusculares encontrados em associação obrigatória ou facultativa em muitos tipos vegetais (Parniske, 2000).

Devido à íntima associação entre os endofíticos e espécies vegetais, tem sido proposto que estes microrganismos co-evoluíram com os seus hospedeiros, podendo ser descendentes de patógenos de plantas (Parniske, 2000).

Segundo Sprent & James (1995) os endofíticos podem ser disseminados por vários caminhos, o mais comum sendo através de feridas e aberturas naturais da raiz, também podem penetrar por fungos (Paula *et al.*, 1991) ou estômatos (Döbereiner *et al.*, 1993), atingindo dessa forma os diversos órgãos e tecidos das plantas. Alguns microrganismos endofíticos são transmitidos via semente, em plantas com propagação vegetativa; eles passam de uma para outra, através de estruturas utilizadas nessas propagações.

Em muitos casos endofíticos de plantas não causam danos em um hospedeiro, e são patógenos para outros (Azevedo, 1998; Sprent & James 1995).

Vários endofíticos já demonstraram ter uma função nas plantas que os abrigam, como defesa, auxílio na fixação de nitrogênio, produzindo fitohormônios bem como armazenando nutrientes e água no interior da planta, desta forma aumentando a sua tolerância à ambientes inóspitos (Sprent & James, 1995; Azevedo, 1998; Clay & Holah, 1999; Shishido *et al.*, 1999; Parniske, 2000; Omacini *et al.*, 2001; Redman *et al.*, 2002).

Muitos endofíticos são fontes potenciais de resistência contra microrganismos patógenos, tornando a planta mais resistente a ataques de fungos ou bactérias (Benhamou *et al.*, 1996), podendo atuar como agentes no controle biológico de inúmeras doenças e pragas (Hallmann *et al.*, 1997; Nejad & Johnson, 2000; Bacon & Hinton, 2002) ou como promotores de crescimento vegetal (Hallmann *et al.*, 1997; Bacilio-Jiménez *et al.*, 2001).

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas que participam de vários processos na célula através de uma estrutura característica e princípios de

interações comuns reconhecendo carboidratos (Figura 2) (Sharon, 1993; Elgavish & Shaanan, 1997; Syed *et al.*, 1999).

Elas têm sido previamente classificadas na base de sua especificidade a grupos sanguíneos e subseqüentemente no potencial com o qual um monossacarídeo inibe sua aglutinação e atividade precipitante de glicoconjugados. As lectinas dentro de cada grupo diferem significativamente em sua afinidade por um específico monossacarídeo ou seus derivados. Contudo muitas lectinas com especificidades monossacarídicas idênticas diferenciam marcadamente com respeito ao ligamento de oligossacarídeos; indicando que suas interações com glicanos são muito mais complexas (Sharma & Surolia, 1997).

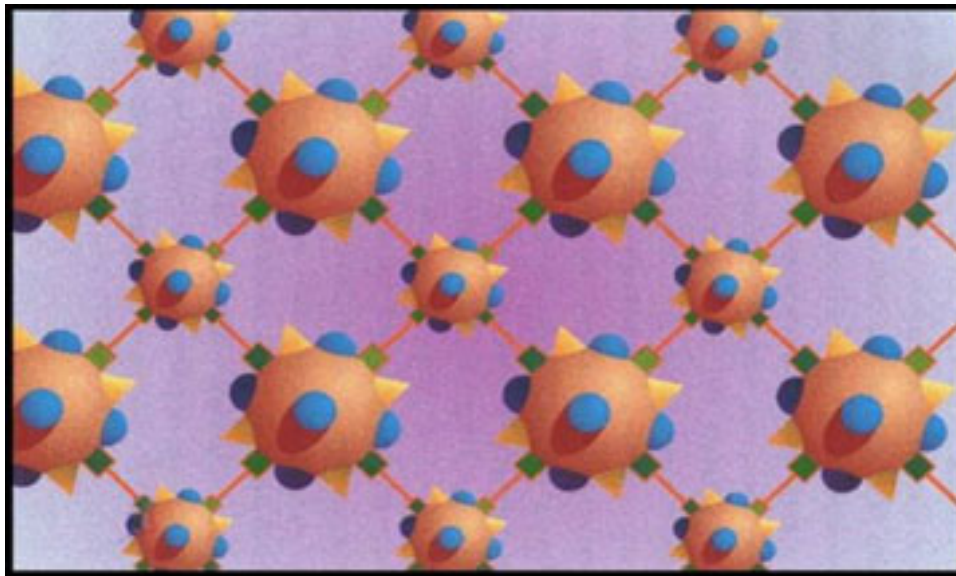


Figura 2. Representação esquemática de aglutinação por lectinas; ▲, ●, ■, carboidratos de superfície, |—|, lectina.

As lectinas são de significativo uso na revelação de processos biológicos, em sistemas de diagnósticos clínicos e na elucidação de estruturas de proteínas e carboidratos (Kennedy *et al.*, 1995); por causa de suas atividades biológicas muito exploradas têm sido isoladas de uma diversidade de microorganismos,

animais e plantas(Wang *et al.*, 2000; Coelho & Silva, 2001; Ye & Ng, 2001; Kilpatrick, 2002).

Entre os processos biológicos especulados para as lectinas está a participação na proteção da planta contra fitopatógenos (Chrispeels & Raiknel, 1991), dentre esses sua atividade antimicrobiana (Verheyden *et al.*, 1995; Xu *et al.*, 1998; Ciopraga *et al.*, 1999).

Proteínas isoladas de sementes de *Amaranthus* (*Amaranthus caudatus*) com potentes propriedades antimicrobiais e antifúngicas foram identificadas através de espectroscopia de Ressonância magnética nuclear em H¹ como pertencentes ao grupo das lectinas (Verheyden *et al.*, 1995).

Xu *et al.* (1998) purificou e caracterizou como sendo lectina uma proteína antifúngica de *Gastrodia elata*, que inibiu o crescimento de hifas de alguns fungos fitopatógenos.

Ciopraga *et al.* (1999) trabalhando com espécies de fusários observou o efeito da aglutinina de germe de trigo (WGA) um tipo de lectina na inibição da germinação e infectibilidade de conídias.

Assim como raiz e sementes, folhas apresentam concentrações consideráveis de lectinas (Koike *et al.*, 1995; Kamemura *et al.*, 1996; Coelho & Silva, 2000). Acredita-se que nesses órgãos essas moléculas apresentam uma função que favoreça a simbiose com organismos endofíticos, como observado em raízes (Hirsch, 1999).

Kijne *et al.* (1997) propuseram que lectinas estão envolvidas em estabilizar o citoesqueleto da célula por interações transmembrana.

Em raízes de legumes dois modelos são propostos para explicar o envolvimento de lectinas na formação da linha de infecção por espécies de *Rhizobium*: no primeiro, lectinas ligam glicoconjugados formados na superfície de organismos estranhos, podendo assim servir como um tipo de mecanismo protetor, facilitando a entrada de microorganismos patógenos. Já

no segundo modelo, lectinas poderiam atuar no caminho de tradução de sinais pelo ligamento em proteínas transmembrana (Hirsch, 1999).

A habilidade que lectinas de plantas têm em reagir com carboidratos expostos na superfície de micróbios vem tornando possível o emprego dessas biomoléculas como sondas-diagnóstico para identificação de bactérias patogênicas, que estão baseadas na reação de aglutinação seletiva entre lectina e bactéria (Pistole, 1981; Slifkin and Doyle, 1990; Calderon *et al.*, 1998; Munoz-Crego *et al.*, 1999). Ratanapo *et al* (2001) mostraram a interação de duas lectinas com especificidade para ácido N-glicosilneuramínico contra bactérias fitopatogênicas, propondo uma possível função na defesa de plantas.

Especulamos que a propriedade aglutinante de lectina ocorra também com bactérias endofíticas nos órgãos e tecidos vegetais, imobilizando essas bactérias sem prejudicá-las, de modo que elas liberem constantemente metabólitos antibióticos, inibindo o desenvolvimento de microrganismos fitopatogênicos e, a planta forneça-lhes abrigo e nutrição. Esperávamos que essa associação simbiótica pudesse ocorrer com endofíticos em folhas.

O gênero *Bauhinia* (Fabaceae) (Figura 3) contém numerosas espécies ornamentais, as quais estão bem distribuídas nas cidades brasileiras; as espécies nativas ou introduzidas têm sido usadas como forragem, na alimentação humana e na medicina popular para o tratamento de diabéticos e como um diurético. Dentro do gênero, além da extração de lectinas de folhas, sementes e raízes, têm sido detectadas atividades hemaglutinantes, isolados e seqüenciados genes desse grupo, para o preparo de lectinas quiméricas usadas em pesquisas (Yamamoto *et al.*, 1992).

Em decorrência das propriedades medicinais da espécie *Bauhinia monandra* Kurt. e do grande potencial médico e biotecnológico das lectinas, se fez necessário explorar as aplicações da lectina de folhas de *Bauhinia monandra* (BmoLL), bem como obter endofíticos de suas folhas, com o

objetivo de descobrir novos compostos, que pudessem ser utilizados no tratamento de enfermidades ou como recursos biotecnológicos.



Figura 3. Espécime de *Bauhinia monandra* (Pata-de-Vaca).

As folhas de *Bauhinia monandra* (Figura 4) podem produzir uma considerável quantidade em miligramas de lectinas (Coelho & Silva, 2000) despertando dessa forma um grande interesse em sua aplicabilidade.



Figura 4. Folhas de *B. monandra*.

O presente trabalho pode contribuir para a verificação da potencial interação entre lectinas e endofíticos de folhas, favorecendo um melhor entendimento do processo endossimbiótico, visando também encontrar correlação entre o metabólito bioativo da planta e de outros microorganismos.

A exploração de endofíticos em folhas representa uma alternativa para averiguação da ocorrência de microorganismos biologicamente ativos. Esta pesquisa, além da sua importância econômica e biotecnológica, diminui a depredação do meio ambiente na busca por fitoterápicos.

Há, muito pouco na literatura sobre lectinas de folhas, nenhum registro foi encontrado relacionando lectina de folha com endofíticos, despertando assim um grande interesse nesse tema.

OBJETIVOS

Objetivo geral

- Testar a atividade antimicrobiana de BmoLL, isolar e caracterizar endofíticos de folhas de *Bauhinia monandra* (pata de vaca), testar atividade aglutinante entre lectina e endofíticos.

Objetivos específicos

- Isolar bactérias e fungos endofíticos de folhas de *Bauhinia monandra* (pata de vaca)
- Testar atividade da lectina de folhas de *Bauhinia monandra* (pata de vaca) na inibição de microrganismos patógenos e endofíticos.
- Determinar a atividade antimicrobiana dos microrganismos isolados.
- Verificar aglutinação da BmoLL perante bactérias patógenas e endofíticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, J. L. Microorganismos endofíticos. In: I. S. MELO e J. L. AZEVEDO. **Ecologia Microbiana**. EMBRAPA, Jaguariúna, SP. pp. 117-137, 1998.

BACILIO-JIMÉNEZ, M. ; AGUILAR-FLORES, S.; DEL VALLE, M. V.; PÉREZ, A.; ZEPEDA, A.; ZENTENO, E. Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense*. **Soil Biology & Biochemistry**, 33, 167-172, 2001.

BACON, C. W.; HINTON, D. M. Endophytic and Biological Control Potential of *Bacillus mojavensis* and Related Species. **Biological Control**, 23, 274-284, 2002.

BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J. W.; QUADT-HALLMAN, A.; TURZUN S. Induction of defense-related ultrastructural modification in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. **Plant Physiology**, 112, 919-929, 1996.

CHRISPEELS, M. J. & RAIKHEL, N. V. Lectins, Lectin Genes, and Their Role in Plant Defense. **Plant Cell**, 3, 1-9, 1991.

CIOPRAGA, J.; GOZIA, O.; BENTIA, T.; LUNGA, M.; ZAMFIRESCU, I.; TUDOR, R.; ROSEAU, A.; and NITU, F. Antifungal properties of lectin and new chitinases from potato tubers. **FEBS Letters**, 370, 245-249, 1993.

CLAY, K.; HOLAH, J. Fungal Endophyte Symbiosis and plant diversity in sucescional fields. **Science**, 285: 1742-1744, 1999.

COELHO, L. C. B. B. & SILVA, B. R. Simple Method to Purify Milligram Quantities of the Galactose-Specific Lectin from the Leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis**, 11: 295-300, 2000.

- DÖBEREINER, J. ; REIS, V. M. ; PAULA, M^a; OLIVARES, F. Endophytic diazotrophic in sugar cane, cereals and tuber plants. In: PALACIOS, R. ; MORA, J.; NEWTON, W. F. ; **Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.** New horizons in nitrogen fixation, 671-676, 1993.
- ELGAVISH, S.; SHAANAN, B. Lectin-carbohydrate interaction: different folds, common recognition principles. **Trends Biochemistry (Science)**, 22: 462-467, 1997.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F. & KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, 43: 895-914, 1997.
- HIRSCH, A. M. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. **Current Opinion in Plant Biology**, 2: 320-326, 1999.
- KAMEMURA, K.; FURUICHI, Y.; UMEKAWA, H.; TAKAHASHI, T. Characterisation of a lectin from the leaves of Great Northern bean, *Phaseolus vulgaris* L. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, 60: 608-611, 1996.
- KENNEDY, J. F.; PAIVA, P. M. G.; COREILA, M. T. S.; CAVALCANTI, M. S. M. & COELHO, L. C. B. B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, 26: 219-230, 1995.
- KIJNE, J.W.; BAUCHROWITZ, M. A.; DIAZ, C. L. Root lectins and rhizobia. **Plant Physiology**, 115: 869-873, 1997.
- KILPATRICK, D. C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1562, 187-197, 2002.
- KOIKE, T.; BEPPU, H.; KUZUYA, H.; MARUTA, K.; SHIMPO, K.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; FUJITA, K. A 37 kDa mannose-binding lectin with hemagglutinating and mitogenic activities from "Kidachi Aloe" (*Aloe arborescens* Miller var. *Natalensis* Berger), **Journal of Biochemistry**, 118: 1205-1210, 1995.

NEJAD, P.; JOHNSON, P. A. Endophytic Bacteria Induce Growth Promotion and wild Disease Suppression in Oilseed Rape and Tomato. **Biological Control**, 18, 208-215, 2000.

OMACINE, M.; CHANETON, E. J.; CHERSA, C. M.; MÜLLER, C. B. Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. **Nature**, 409: 78-81, 2001.

PARNISKE, M. Intracellular accommodation of microbes by plants: a common developmental program for symbiosis and disease. **Current Opinion in Plant Biology**, 3: 320-328, 2000.

PAULA, M. A.; REIS, V. M.; DÖBEREINER, J. Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infections of sweet potato (*Ipoema batata*), sugar cane (*Sccharum spp.*) and sweet sorghum (*Sorgum vulgare*). **Biology and Fertility of Soils**, 11: 111-115, 1991.

REDMAN, R. S.; SHEEHAN, K. B.; STOUT, R. G.; RODRIGUEZ, R. J.; HENSON, J. M. Thermotolerance Generated by plant/fungal symbiosis. **Science**, 298: 1581, 2002.

SHARMA, V.; SUROLIA, A. Analyses of Carbohydrate Recognition by Legume Lectins: Size of the Combining Site Loops and their Primary Specificity. **Journal of Molecular Biology**, 267: 433-445, 1997.

SHARON, N. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: na atomic view. **Trends in Biochemistry (Science)**, 18: 221-226, 1993.

SHISHIDO, M.; BREUIL, C.; Chanway, C. P. Endophytic Colonization of Spruce by Plant Growth-promoting Rhizobacteria. **Fems Microbiology Ecology**, 29, 191-196, 1999.

SPRENT, J. I.; JAMES, E. K. N-fixation by endophytic bacteria: questions of entry and operation. In: FENDRIK; M. DEL GALLO; J. VANDERLYDEN; M. DE ZAMAROCZY, **Springer- Verlag** ed. *Azospirillum VII* and related microorganisms. Berlin:, 37: 15-19, 1995.

SYED, F. B. F.; JOSHI, B. N.; SIVARAMAN, H.; KHIRE, J. M. ; KHAN, M. I. Purification and characterization of a cell-surface lectin (lectin II) from

Agrobacterium radiobacter NCIM 2443. **Biochemistry Molecular Biology int**, 47: 361-367, 1999.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHULAVATNATOL, M. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. Syringae pv mori*. **Plant Science**, 160: 739-744, 2001.

VANDENKOORNHUYSE, P.; BALDAUF, S. L.; LEYVAL, C.; STRACZEK, J.; YOUNG, J. P. W. Extensive fungal diversity in plant roots. **Science**, 295: 2051, 2002.

VERHEYDEN, P.; PLETINCKX, J.; MAES, D.; PEPEMANS, H. A. M.; WYNS, L.; WILLEM, R.; MARTINS, J. C. H NMR Study of the interaction of *N, N', N''*-triacetyl chitotriose with Ac-AMP2, a sugar binding antimicrobial protein isolated from *Amaranthus caudatus*. **FEBS Letters**, 370: 245-249, 1995.

WANG, H.; GAO, J.; & NG, T. B. A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the Oyster Mushroom *Pleurotus ostreatus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 275: 810-816, 2000.

WILSON, D. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. **Oikos**, 73: 274-276, 1995.

XU, Q.; LIU, Y.; WANG, X. GU, H.; CHEN, Z. Purification and characterization of a novel anti-fungal protein from *Gastrodia elata*. **Plant Physiology Biochemistry**, 36 (12): 899-905, 1998.

YAMAMOTO, K.; KONAMI, Y.; OSAWA, T.; IRIMURA, T. Alteration of carbohydrate-binding specificity of the *Bauhinia purpurea* lectin through the preparation of a chimeric lectin. **Journal of Biochemistry**, 111: 87-90, 1992.

YE, X.; NG, T. B. Isolation of lectin and albumin from *Pisum sativum* var. Macrocarpon ser. cv. Sugar snap. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 33: 95-102, 2001.

**TRABALHO A SER SUBMETIDO NO PERIÓDICO:
CANADIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY**

Endophytics of *Bauhinia monandra* leaves: Isolation, antimicrobial activities and agglutination with leaf lectin

S. A. F. Ramos,^{a,b} J. M. Araújo,^b and Luana C. B. B. Coelho^{a,*}

^aDepartamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco. Av. Moraes Rego S/N, Cidade Universitária, Recife-PE 50000, Brazil.

^bDepartamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco. Av. Moraes Rego S/N, Cidade Universitária, Recife-PE 50000, Brazil.

Abstract: Endophytics (bacteria and fungi) were isolated (total of 69) from *Bauhinia monandra* (pata-de-vaca, pulse) leaves. The microorganisms were used to evaluate antimicrobial activities; one bacterial strain agglutinated highly purified *B. monandra* leaf lectin (BmoLL). Leaves were serially collected from a unique specimen of pulse. After disinfection, leaves were fragmented and distributed in petri plates with distinct media. Fungi (37 strains) were isolated with Saboureaud Agar plate (SAB) and Potato Dextrose Agar plate (PDA) with tetracycline. Bacteria isolation (32 strains) were performed with Nutritious Agar (NA); NA 50%; Czarpek (CZ) and Casein Starch Agar (CSA) culture medium, added of cyclohexamide; 26 strains were gram-positive and 6 gram-negatives. Antimicrobial activity was not detected with fungi. A previous endophytic bacterial assay (plug agar) revealed antimicrobial activity (62% of strains). An accurate fermentation assay however showed that only 2 strains were active against screened fungi and bacteria. A strain was active against the fungi *Aspergillus niger*, *Fusarium moniliform* and *F. oxysporum*, as well as against the bacteria *Sarcinea lutea*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*; the other bacteria showed activity against *Candida sp.* strains 2224, 4224 and 4249, isolated from immunodepressed, *Sarcinea lutea* and *Staphylococcus aureus*. Preliminary data indicated that one endophytic bacteria showed antimicrobial activity and agglutined with BmoLL.

Key words: Endophytics; *Bauhinia monandra* leaves; antimicrobial activities; agglutination; lectin.

Introduction

Endophytes are fungi and bacteria that live in symbiosis with plants, in tissues such as roots, stems and leaves; they invade the vegetal in different stages of development, but they do not cause symptoms of diseases (Clay & Holah, 1999; Omacini *et al.*, 2001; Redman *et al.*, 2002); several endophytes can be found in a unique plant (Wilson, 1995; Vandenkoornhuysen *et al.*, 2002). Lectins are proteins or glycoproteins that participate of various processes in the cell through a characteristic structure (Sharon, 1993; Elgavish & Shaanam, 1997; Syed *et al.*, 1999; Kilpatrick, 2002). Plant lectin functions have been speculated, among them, the interaction between plants and microorganisms, as well as defense against attack from virus, bacteria, fungi and insects (Chrispeels *et al.*, 1991; Hirsch, 1999; Ciopraga *et al.*, 1999; Ratanapo *et al.*, 2001). In species of *Fusarium*, the lectin wheat germ agglutinin (WGA) inhibited germination and conidial infectibility (Ciopraga *et al.*, 1999). Seeds, roots, flowers as well as leaves may contain considerable concentrations of lectins (Koike *et al.*, 1995; Kamemura *et al.*, 1996; Coelho & Silva, 2000). It is believed that in these organs, lectins possess a function that favors the symbioses with endophytic organisms, as observed in roots (Hirsch, 1999). Although the interaction between lectins and phytopathogen microorganisms has been studied thoroughly (Chrispeels *et al.*, 1991; Ciopraga *et al.*, 1999; Ratanapo *et al.*, 2001) there is still, however, very little literature concerning the interaction with plant endophytics (Hirsch, 1999). The present study reports endophytics, bacteria and fungi, isolated from *B. monandra* leaves; some bacteria showed antimicrobial activities. Agglutination between BmoLL, a highly purified lectin from *B. monandra* leaves, and an endophytic bacterium was also detected; the latter strain inhibited pathogens.

Materials and Methods

Endophytes (bacteria and fungi) were isolated (total of 69) from *B. monandra* leaves. Three sample collections (two in January and one in July, 2001) were performed close to the Federal University of Pernambuco (Recife City, State of Pernambuco, Northeast of Brazil). Leaves were washed (10 min) and disinfected (70%, v/v ethanol, 1 min; 5%, v/v, sodium hypochloride, 5 min; 70%, v/v ethanol, 30 sec; twice washed in sterile distilled water, 1 min). A control consisted of the last wash. Fragments of tissue (5 mm) were distributed in petri plates with distinct culture medium. Bacterial isolation was performed with Nutrient Agar (NA); NA 50%; Czapek (CZ) and Casein Starch Agar (CSA) plate, added of cyclohexamide; Fungi strains were isolated with Saboureaud Agar plate (SAB) and Potato Dextrose Agar plate (PDA) with tetracycline. Samples were incubated at 28°C for 5 to 20 days. Bacteria grown around fragments were isolated in NA and TSA (Tryptic Soy Agar); fungi were isolated in SAB and BDA culture medium. The strains were stored at 4°C, for short-term, or mineral oil, for long-term.

2. Antimicrobial Activity

To evaluate antimicrobial activity two assays were accomplished, one in solid and another in liquid culture medium; in all assays 14 microorganisms were used (table 1).

Table 1. Microorganisms assayed with strain number and origin

Microorganism Assayed	Strain Number	Origin
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	A
<i>Sarcina lutea</i>	6	A
<i>Bacillus subtilis</i>	16	A
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39	A
<i>Escherichia coli</i>	224	A
<i>Candida krusei</i>	1002	A
<i>Candida albicans</i>	1007	A
<i>Aspergillus niger</i>	2003	A
<i>Candida sp.</i>	2224	M
<i>Colletotrichum gramminicola.</i>	2403	A
<i>Fusarium moniliforme</i>	2409	A
<i>Fusarium oxysporum</i>	2414	A
<i>Candida sp.</i>	4224	M
<i>Candida sp.</i>	4249	M

A,

Department of Antibiotics; M, Department of Mycology, Federal University of Pernambuco.

2.1. Agar Plug Assay

Agar plugs (5 mm) were made in TSA, NA, and CAA to inoculate bacteria; SAB and PDA were used to inoculate fungi. Each Agar plug was inoculated with 10 µL of each endophytic bacterium (density 3, Mac-Farland scale) or with a spore suspension of each endophytic fungus. Bacteria (28°C, 24 h) and fungi (30°C, 72 to 96 h) were cultured.

2.2. Assay with Fermentation Broth

The endophytic bacteria with highest spectrum activity in agar plug assay were cultured overnight (28°C, 180 rpm), 50 mL of TSB; 2.5 mL of each pre-inoculum was then cultured in a 250 mL Erlenmeyer flask containing 100 mL of M1 (Soybean meal 1 g, glucose 1 g, CaCO₃ 0.1 g, NaCl 5 g and 100 mL of distilled water, pH 7.0) and TSB (Tryptic Soy broth, DIFCO, 3 g in 100 mL of distilled water). The mixtures were incubated on a shaker (28°C, 180 rpm). The endophytic fungi were grown (48 h) in 50 mL of SAB as pre-inoculum and 100 mL of SAB, MPE and M1 as fermentation media, shaken at 180

rpm, 30°C. Aliquots of fermentation broth (30 µL) were placed to petri plate containing suspension of microorganisms (density 3, Mac-Farland scale) to be assayed in the respective culture media. All experiments were made in triplicate.

3 Agglutination Assays

3.1. Assay of antimicrobial activity to lectin

A previous assay of antimicrobial activity to lectin (YE *et al.*, 1999) was carried out in petri plates (100 x 15 mm) containing 10 mL of NA medium or 10 mL of SAB. Around a plug of bacterial or fungi (0.5 cm in diameter) grown previously in specific culture medium, at a distance of 1cm away from it, were placed sterile blank paper disks of the same size. Aliquots (10 µL) containing 30 to 300 µg of BmoLL (in the phosphate-citrate buffer, pH 6.5) was added to a disk. The plates were incubated at 30°C, 72 h for fungi, and at 28°C, 24 h to bacteria, to analyse the development of microorganisms on plates.

3.2. BmoLL agglutination assay

Two Gram-positive (strains 17 and 24) and two Gram-negative (strains 27 and 65) endophytes were used as test organisms; four pathogens, *S. lutea*, *P. aeruginosa*, *E. coli* and *S. aureus* were used as controls. The bacterial strains were cultured in TSB broth (50 mL) and incubated overnight under permanent shaking at 28°C. Aliquots (5mL) were transferred to Erlenmeyers containing 100 mL of medium, incubated at 28°C and 180 rpm. After 48 h, bacterial cells were centrifuged for 3000 rpm, 7 min in 4°C, washed three times in NaCl 0.15 M, two times in phosphate-citrate buffer 5% (v/v) pH 6.5 for 7 min at room temperature and resuspended in buffer. The turbid suspensions were adjusted to approximately 10⁸ cell per mL.

The agglutination assay was performed in microtitre plates (96 wells): 50 µL of 0.15 M NaCl, 50 µL of a bacterial suspension (10⁸ cell per mL) and a serial dilution of 50µL highly purified BmoLL (Coelho & Silva, 2000), preparation with 0.96 mg/mL. The control did not contain lectin. Agglutination activity was observed after 24 h, and photos were taken with an OLYMPUS BH-2 microscope.

Results and Discussion

B. monandra is an ornamental plant; the leaves are very healthy and contain in milligram quantities a galactose specific lectin (Coelho & Silva, 2000). Sometimes endophytes are even potential sources of resistance against pathogenic agents, such as fungi or bacteria (Benhamou *et al.*, 1996; Basham and Holguin, 1997; Clay & Holah, 1999; Bacilio-Jiménez, 2001). Infusions of *B. monandra* leaves are broadly used in popular medicine.

Bacterial (32) and fungi (37) strains were isolated from *B. monandra* leaves. The endophytes were assayed for antimicrobial activity. A screen in plug agar promotes a strain selection which could have antimicrobial activity.

In the assays performed in plug agar the endophytic fungi were negative to tested microorganisms, in contrast to Huang *et al.*, (2001). However, from isolated endophytic bacteria 13 showed antimicrobial activity against 2 tested pathogens and 6 showed activity against more than two. Table 2 reveals the activity of 6 best strains. From the endophytic bacteria strains 24 and 27 showed the highest inhibition spectrum; NA and TSA were the most efficient media. Endophyte 27 had the highest activity; 10 of 14 tested microorganisms were inhibited. Inhibition zone higher than 25 mm (*Colletotrichum gramminicola*) and between 15-25 mm (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea*, *Aspergillus niger* and *Candida strain 4224*) were obtained. Strain 24 was antagonistic against 6 tested microorganisms; better halo were observed against *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis* and the fungus *Colletotrichum gramminicola*. Table 1 and 2 shows inhibition zones of 6 endophytes against tested microorganisms.

Table 2. The antimicrobial activity in NA medium is expressed by the diameter of inhibition zone against pathogenic microorganism assayed.

Microorganisms Assayed	Endophytics in NA medium					
	23	24	27	53	54	57
<i>Staphylococcus aureus</i> (01)	--	+++	+++++	--	+	+++
<i>Sarcina lutea</i> (06)	+++	++++	++++	--	+	--
<i>Bacillus subtilis</i> (16)	--	--	++++	--	--	--
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (39)	--	--	--	--	--	--
<i>Escherichia coli</i> (224)	--	--	--	--	--	--
<i>Candida krusei</i> (1002)	--	--	--	--	--	---
<i>Candida albicans</i> (1007)	--	--	++	--	--	--
<i>Aspergillus niger</i> (2003)	--	--	+++	--	--	--
<i>Candida sp.</i> (2224)	++	+	--	--	+	--
<i>Colletotrichum gramminicola</i> (2403)	--	+++	+++++	+++	--	--
<i>Fusarium moniliforme</i> (2409)	--	--	+	++	--	+
<i>Fusarium oxysporum</i> (2414)	--	--	++	+	+	+++
<i>Candida sp.</i> (4224)	+	+	++++	--	+	--
<i>Candida sp.</i> (4249)	--	+++	+++	--	--	--

Inhibition zone: --, 0-5 mm; +, 5-10 mm; ++, 10-15 mm; +++, 15-20 mm; +++++, 20-25 mm; ++++++, above 25 mm.

Table 3. The antimicrobial activity in TSA medium is expressed by the diameter of inhibition zone against pathogenic microorganism assayed.

Microorganisms Assayed	Endophytics in TSA medium					
	23	24	27	53	54	57
<i>Staphylococcus aureus</i> (01)	--	++++	++++	--	+	++
<i>Sarcina lutea</i> (06)	++++	++++	++++	--	+	++
<i>Bacillus subtilis</i> (16)	--	--	+++++	--	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (39)	--	--	--	--	--	--
<i>Escherichia coli</i> (224)	--	--	--	--	--	--
<i>Candida krusei</i> (1002)	--	--	--	--	--	---
<i>Candida albicans</i> (1007)	--	--	++	--	--	--
<i>Aspergillus niger</i> (2003)	--	--	+++	--	--	--
<i>Candida sp.</i> (2224)	++	++	--	--	++	--
<i>Colletotrichum gramminicola</i> (2403)	--	++++	+++++	+++	--	--
<i>Fusarium moniliforme</i> (2409)	--	--	++	++	--	++
<i>Fusarium oxysporum</i> (2414)	--	--	+++	+	+	+
<i>Candida sp.</i> (4224)	--	+	+++	--	++	--
<i>Candida sp.</i> (4249)	++	+	++++	--	--	--

Please refer to the footnote of table 2.

Fermentation in medium M1 (Figure 1) revealed that only strain 24 was bioactive. The best performance was obtained with 48 h to *Staphylococcus aureus* (14 mm) and with 72 h to *Sarcina lutea* (24 mm), *Bacillus subtilis* (16 mm), *Colletotrichum gramminicola* (11 mm), *Aspergillus niger* (11 mm) and *F. oxysporum* (17 mm). TSB (Figure 2) was the best medium to the fermentation assay of 2 endophytes and a good performance was obtained against all tested microorganisms. The bioactivity with 48 h (strain 24) and with 24 h (strain 27) showed higher antagonism, with inhibition zones between 10 and 27 mm. Endophyte 27, in fermentation, did not show the same result as the anterior assay; maybe the metabolite, an specific antibiotic, is not released in medium; it could be intracellularly stored (Pleban *et al.*, 1997; Sturz *et al.*, 1998). The good performance of both strains revealed the potential medical and biotechnological applicability of the endophytes (Van Buren *et al.*, 1993; Benhamou *et al.*, 1996; Basham and Holguin, 1997; Huang *et al.*, 2001; Bacilio-Jiménez *et al.*, 2001; Bacon & Hinton, 2002). As showed by Bacon & Hinton (2002) the strains can be of use in fungi biological control. Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense* (Bacilio-Jiménez *et al.*, 2001).

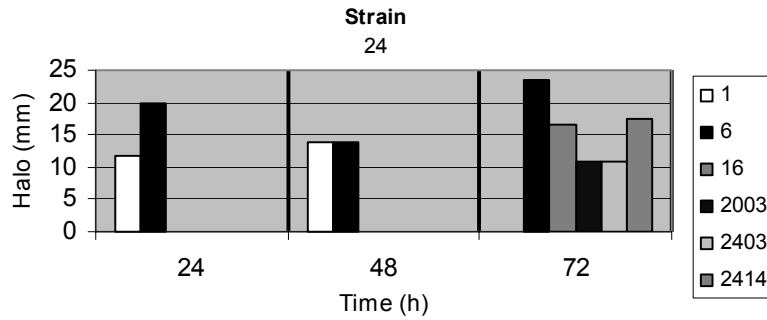


Figure 1. Time of fermentation and inhibition halo in medium M1.

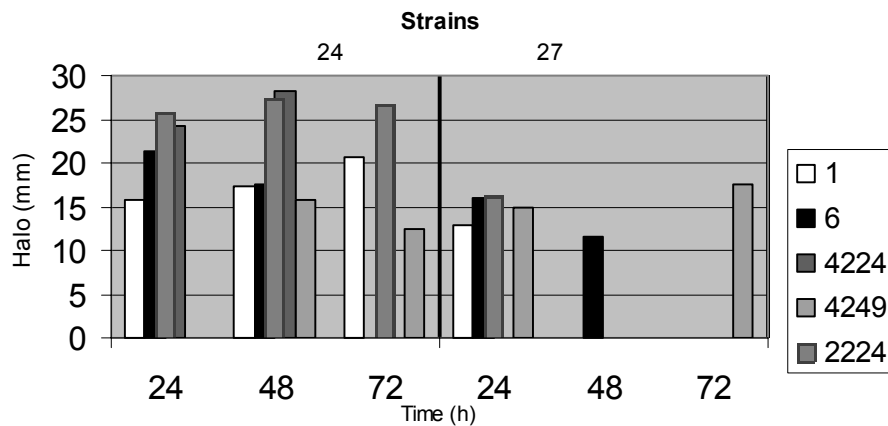


Figure 2. Time of fermentation and inhibition halo in medium TSB.

BmoLL did not show an inhibitory effect against six tested bacterial endophytes and negative results were also obtained with all tested microorganisms. Positive results have already been mentioned to other lectins, which agglutinated pathogen microorganisms (Verheyden *et al.*, 1995; Ciopraga *et al.*, 1999; Ratanapo *et al.*, 2001; Gaidamashvili & Van Staden, 2002) or symbiotic root endophytes (Hirsch, 1999). BmoLL did agglutinate only an endophytic bacterium, strain 27 (Figure 3), with a tittle of 16^{-1} . Besides BmoLL concentration used (0.96 mg/mL) a low inhibition was detected, in comparison to available literature (Ciopraga *et al.*, 1999; Ratanapo *et al.*, 2001; Gaidamashvili & Van Staden, 2002). However, the agglutination activity revealed in Figure 3 was important to speculate a possible relationship between BmoLL and endophytics from *B. monandra* leaves; also, BmoLL versus endophytes could function in plant defense against phytopathogens. Strain 27 is gram-negative; BmoLL, as already mentioned, is galactose specific (Coelho & Silva, 2000). In this work a simple mechanism, evolutionally plausible, can be proposed. Instead of producing several proteins with antimicrobial activity (Chrispeels *et al.*, 1991; Verheyden *et al.*, 1995; Ciopraga *et al.*, 1999; Ye *et al.*, 1999; Ratanapo *et al.*, 2001; Gaidamashvili & Van Staden, 2002) the plant could produce a lectin(s) with affinity to endophytes which would generate bioactive compounds inducing a mild agglutination in strategic regions of the leaf, protecting the plant against a broad diversity of pathogen microorganisms. Many plant lectins have already interacted with several pathogens (Chrispeels *et al.*, 1991; Verheyden *et al.*, 1995; Ciopraga *et al.*, 1999; Ratanapo *et al.*, 2001; Gaidamashvili & Van Staden, 2002); also, the symbiotic relationships between plants and root endophytic bacteria have been explored (Hirsch, 1999). To our knowledge, nothing has been suggested about lectins and leaf endophytics.

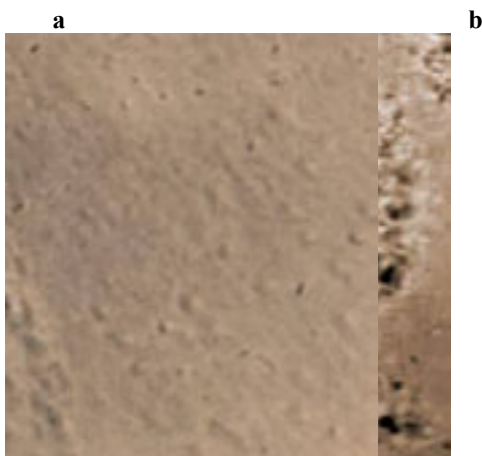


Figura 3. Agglutination of bacteria (strain 27) by BmoLL (a) and control (b) without the lectin.

Acknowledgements

The authors thank the Brazilian National Research Council (CNPq) for financial support.

References

- BACILIO-JIMÉNEZ, M.; AGUILAR-FLORES, S.; DEL VALLE, M. V.; PÉREZ, A.; ZEPEDA, A.; ZENTENO, E. Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense*. **Soil Biology & Biochemistry**, 33, 167-172, 2001.
- BACON, C. W.; HINTON, D. M. Endophytic and Biological Control Potential of *Bacillus mojavensis* and Related Species. **Biological Control**, 23, 274-284, 2002.
- BASHAM, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances. **Canadian Journal of Microbiology**, 43: 103-121, 1997.
- BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J. W.; QUADT-HALLMAN, A.; TURZUN S. Induction of defense-related ultrastructural modification in pea root tissues inoculated with endophytic bacteria. **Plant Physiology**, 112, 919-929, 1996.
- CIOPRAGA, J.; GOZIA, O.; BENTIA, T.; LUNGA, M.; ZAMFIRESCU, I.; TUDOR, R.; ROSEAU, A.; and NITU, F. Antifungal properties of lectin and new chitinases from potato tubers. **FEBS Letters**, 370, 245-249, 1993.
- CHRISPEELS, M. J. & RAIKHEL, N. V. Lectins, Lectin Genes, and Their Role in Plant Defense. **Plant Cell**, 3, 1-9, 1991.
- CLAY, K.; HOLAH, J. Fungal Endophyte Symbiosis and plant diversity in successional fields. **Science**, 285: 1742-1744, 1999.
- COELHO, L. C. B. B. & SILVA, B. R. Simple Method to Purify Milligram Quantities of the Galactose-Specific Lectin from the Leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis**, 11: 295-300, 2000.
- DÖBEREINER, J. ; REIS, V. M. ; PAULA, M^a; OLIVARES, F. Endophytic diazotrophic in sugar cane, cereals and tuber plants. In: PALACIOS, R. ; MORA, J.; NEWTON, W. F. ; **Dordrecht: Kluwer Academic Publishers**. New horizons in nitrogen fixation, 671-676, 1993.
- ELGAVISH, S.; SHAANAN, B. Lectin-carbohydrate interaction: different folds, common recognition principles. **Trends Biochemistry (Science)**, 22: 462-467, 1997.
- GAIDAMASHVILI, M.; VAN STADEN, J. Interaction of lectin-like proteins of South African medicinal plants with *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. **Journal of Ethnopharmacology**, 80: 131-135, 2002.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F. & KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, 43: 895-914, 1997.
- HIRSCH, A. M. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. **Current Opinion in Plant Biology**, 2: 320-326, 1999.
- HUANG, Y.; WANG, J.; LI, G.; ZHENG, Z.; SU, W. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 31: 163-167, 2001.

KAMEMURA, K.; FURUICHI, Y.; UMEKAWA, H.; TAKAHASHI, T. Characterisation of a lectin from the leaves of Great Northern bean, *Phaseolus vulgaris* L. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, 60: 608-611, 1996.

KENNEDY, J. F.; PAIVA, P. M. G.; COREILA, M. T. S.; CAVALCANTI, M. S. M. & COELHO, L. C. B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, 26: 219-230, 1995.

KIJNE, J.W.; BAUCHROWITZ, M. A.; DIAZ, C. L. Root lectins and rhizobia. **Plant Physiology**, 115: 869-873, 1997.

KILPATRICK, D. C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1562, 187-197, 2002.

KOIKE, T.; BEPPU, H.; KUZUYA, H.; MARUTA, K.; SHIMPO, K.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; FUJITA, K. A 37 kDa mannose-binding lectin with hemagglutinating and mitogenic activities from "Kidachi Aloe" (*Aloe arborescens* Miller var. *Natalensis* Berger), **Journal Biochemistry**, 118: 1205-1210, 1995.

NEJAD, P.; JOHNSON, P. A. Endophytic Bacteria Induce Growth Promotion and wild Disease Suppression in Oilseed Rape and Tomato. **Biological Control**, 18, 208-215, 2000.

OMACINE, M.; CHANETON, E. J.; CHERSA, C. M.; MÜLLER, C. B. Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. **Nature**, 409: 78-81, 2001.

PARNISKE, M. Intracellular accommodation of microbes by plants: a common developmental program for symbiosis and disease. **Current Opinion in Plant Biology**, 3: 320-328, 2000.

PAULA, M. A.; REIS, V. M.; DÖBEREINER, J. Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infections of sweet potato (*Ipoema batata*), sugar cane (*Sccharum spp.*) and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). **Biology and Fertility of Soils**, 11: 111-115, 1991.

PLEBAN, S.; CHERNIN, L.; CHET, I. Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. **Letters in Applied Microbiology**, 25: 284-289, 1997.

REDMAN, R. S.; SHEEHAN, K. B.; STOUT, R. G.; RODRIGUEZ, R. J.; HENSON, J. M. Thermotolerance Generated by plant/fungal symbiosis. **Science**, 298: 1581, 2002.

SHARMA, V.; SUROLIA, A. Analyses of Carbohydrate Recognition by Legume Lectins: Size of the Combining Site Loops and their Primary Specificity. **Journal of Molecular Biology**, 267: 433-445, 1997.

SHARON, N. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. **Trends Biochemistry (Science)**, 18: 221-226, 1993.

SHISHIDO, M.; BREUIL, C.; Chanway, C. P. Endophytic Colonization of Spruce by Plant Growth-promoting Rhizobacteria. **Fems Microbiology Ecology**, 29, 191-196, 1999.

SPRENT, J. I.; JAMES, E. K. N-fixation by endophytic bacteria: questions of entry and operation. In: FENDRIK; M. DEL GALLO; J. VANDERLYDEN; M. DE ZAMAROCZY, **Springer- Verlag** ed. *Azospirillum VII* and related microorganisms. Berlin, 37: 15-19, 1995.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; MATHESON, B. G. Association of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. **Canadian Journal of Microbiology**, 44 : 162-167, 1998.

SYED, F. B. F.; JOSHI, B. N.; SIVARAMAN, H.; KHIRE, J. M. ; KHAN, M. I. Purification and characterization of a cell-surface lectin (lectin II) from *Agrobacterium radiobacter* NCIM 2443. **Biochemistry Molecular Biology Int**, 47: 361-367, 1999.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHULAVATNATOL, M. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. Syringae pv mori*. **Plant Science**, 160: 739-744, 2001.

VANDENKOORNHUYSE, P.; BALDAUF, S. L.; LEYVAL, C.; STRACZEK, J.; YOUNG, J. P. W. Extensive fungal diversity in plant roots. **Science**, 295: 2051, 2002.

VERHEYDEN, P.; PLETINCKX, J.; MAES, D.; PEPEMANS, H. A. M.; WYNS, L.; WILLEM, R.; MARTINS, J. C. H NMR Study of the interaction of *N, N', N''*-triacetyl chitotriose with Ac-AMP2, a sugar binding antimicrobial protein isolated from *Amaranthus caudatus*. **FEBS Letters**, 370: 245-249, 1995.

WANG, H.; GAO, J.; & NG, T. B. A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the Oyster Mushroom *Pleurotus ostreatus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 275: 810-816, 2000.

WILSON, D. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. **Oikos**, 73: 274-276, 1995.

XU, Q.; LIU, Y.; WANG, X. GU, H.; CHEN, Z. Purification and characterization of a novel anti-fungal protein from *Gastrodia elata*. **Plant Physiology Biochemistry**, 36 (12): 899-905, 1998.

YE, X.; NG, T. B. Isolation of lectin and albumin from *Pisum sativum* var. Macrocarpon ser. cv. Sugar snap. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 33: 95-102, 2001.

CONCLUSÕES

- Foram isolados 69 microrganismos endofíticos, dentre eles 54% fungos e 46% bactérias, sendo observado o melhor isolamento de fungo em meio BDA (33%) e bactérias AN (38%).
- Os fungos endofíticos não apresentaram atividade contra nenhum dos microrganismos testados; enquanto das 32 linhagens bacterianas (6 Gram-negativas e 26 positivas), 60% mostrou atividade antimicrobiana em bloco de gelose, com AN sendo o melhor meio para o ensaio, apresentado halos entre 20 e 30 mm.
- No ensaio de fermentativo apenas as linhagens bacterianas 27 (Gram-negativa) e 24 (Gram-positiva) exibiram inibição.
- Em meio M1, a linhagem 24 foi a única a apresentar formação de halos; possuindo bioatividade contra *Sarcina lutea*, *Bacillus subtilis*, *Colletotrichum graminicola*, *Aspergillus niger* e *Fusarium oxysporum*.
- O meio TSB demonstrou ser o mais eficiente no ensaio de fermentação, com as duas linhagens sendo antagônicas contra três tipos de *Candidas sp.* linhagens 2224, 4224 e 4249 e contra duas bactérias *Sarcina lutea* e *Staphylococcus aureus*.
- A BmoLL não mostrou efeito inibitório contra os endofíticos, nem contra os microrganismos testes.
- Apesar da concentração da BmoLL (0.96 mg/mL), das quatro bactérias endofíticas e das quatro patógenas, Apenas uma (linhagem 27) Gram-negativa e com atividade antimicrobiana, apresentou aglutinação; demonstrando uma possível relação da lectina e endofíticos na folha de *B. monandra*.