

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE FOLHAS DE *Lonchocarpus*
guilleminianus (Tul.) Malme (rabo-de-macaco).

LUCIANE DUARTE PINTO

RECIFE

2003

LUCIANE DUARTE PINTO

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE FOLHAS DE *Lonchocarpus
guilleminianus* (Tul.) Malme (rabo-de-macaco).**

Dissertação apresentada ao
programa de Pós-Graduação em
Genética para obtenção do grau
de mestre em Genética.

Área de Concentração: Genética de Microrganismos
Orientadora: Profa.Dra.Janete Magali de Araújo

RECIFE

2003

DEDICO

À meu pai, Waldir Pinto da Silva
pelo amor, carinho e dedicação.

É preciso reviver o sonho e a certeza de que tudo vai mudar.

É necessário abrir os olhos e perceber que as coisas boas estão dentro de nós, onde os sentimentos não precisam de motivos nem os desejos de razão.

O importante é aproveitar o momento e aprender sua duração, pois a vida está nos olhos de quem sabe viver.

(Gabriel Garcia Márquez)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado a vida.

À Dr^a Janete Magali de Araújo, por todo ensinamento.

Ao Departamento de Micologia, em especial à Dr^a Elza Luna e à Dr^a Cristina Motta pela identificação dos fungos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL), pela concessão da bolsa de estudos, sem a qual este trabalho não teria se realizado.

À minha mãe, Edgelma, e minhas irmãs, Karla, Christiane e Flávia, por todo incentivo que me foi dado.

Ao meu amado sobrinho, Felipe, que tanto significa para mim.

Aos amigos do Mestrado em Genética, pelos momentos difíceis e alegres que passamos juntos.

Aos técnicos de laboratório, Clécia, Fátima, Luiz Carlos e Sr. Zeca, pela ajuda indispensável sempre que necessário.

A José Orlando (José), pelas palavras certas nos momentos difíceis.

Aos amigos do Departamento, Adriana, Carla, Carlos, Cintia, Cynthia, Cristine, Danilo, Érika, Fernanda, Glayce, Iêda, Mariana, Michelle, Marcela, Patrícia, Rita, Rodrigo, Tatiana, Tacyana e Wanda, pelos bons momentos que passamos juntos.

À Danielle, pela amizade indispensável que sempre me dedicou.

Aos queridos amigos, Josimar, Jefferson, Leila e Ivanilda pelas sextas-feiras de lazer.

Em especial, à amiga Gláucia Lima, que esteve ao meu lado em boa parte desta jornada, escutando, brigando e sempre me ajudando, principalmente ao término desta caminhada. Que Deus a ilumine sempre.

À Juliana e Merylane, pela convivência e amizade.

À Carla Aguiar, pela hospitalidade e amizade indispensáveis. Sua ajuda foi muito valiosa para o andamento deste trabalho.

Ao meu amado esposo Alexandre, pelo companheirismo, incentivo e paciência. Obrigada por fazer parte da minha vida.

Ao estimado amigo Wagner Filho, que mesmo de longe, foi a pessoa que mais me motivou para enfrentar mais um obstáculo.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| LISTA DE FIGURAS..... | vii |
| RESUMO..... | Viii |
| ABSTRACT | ix |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 2 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA..... | 6 |
| 2.1 Microrganismos endofíticos e sua ocorrência | 6 |
| 2.2 Isolamento de microrganismos endofíticos | 12 |
| 2.3 Aplicações biotecnológicas | 15 |
| 2.4 Biologia molecular | 21 |
| 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 24 |
| 4. ARTIGO | 41 |
| 5. ANEXO | 60 |
| 6. CONCLUSÕES | 64 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Percentual de microrganismos endofíticos isolados de folhas jovens e adultas de <i>Lonchocarpus guilleminianus</i> (Tul.) Malme (rabo-de-macaco)..... | 48 |
| Figura 2. Diâmetro dos halos de inibição (mm) dos fungos endofíticos RM-13, RM-14, RM15 e RM-19 no ensaio em bloco de gelose contra vários microrganismos-teste..... | 50 |
| Figura 3. Diâmetro dos halos de inibição (mm) dos fungos endofíticos RM-14 e de <i>Colletotrichum</i> sp. RM-23 para <i>Candida</i> sp. (URM-4249), durante a fermentação em meio MPE..... | 51 |
| Figura 4. Diâmetro dos halos de inibição (mm) de <i>Colletotrichum</i> sp. RM-23 para <i>Candida</i> spp. (URM-2224, URM- 4224) durante a fermentação em meio MPE..... | 51 |
| Figura 5. Dendrograma construído pelo coeficiente de Jaccard (J) e agrupamento UPGMA, através dos perfis de RAPD obtidos de 9 fungos endofíticos com os <i>primers</i> OPQ-04, OPX17,OPX,19 e OPA-09..... | 53 |
| Figura 6. Dendrograma construído pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J) a partir dos perfis de RAPD obtidos de nove bactérias endofíticas com os <i>primers</i> OPQ-04, OPX17 e OPA-09..... | 62 |

RESUMO

Foram isolados de folhas desinfetadas de rabo-de-macaco (*Lonchocarpus guilleminianus*) 36 microrganismos endofíticos, sendo 12 bactérias (9 Gram-negativas e 3 Gram-positivas) e 24 fungos filamentosos. No ensaio primário em “Bloco de Gelose” as 12 bactérias endofíticas não apresentaram atividade antimicrobiana, enquanto 10 (27,8%) fungos endofíticos foram ativos para *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Candida* spp. (isolados de pacientes imunodeprimidos) e *Aspergillus niger*. Os 10 fungos com atividade antimicrobiana neste ensaio primário foram testados em 3 diferentes meios (MPE, M1 E SAB) e selecionado o melhor meio tempo de fermentação. Da fermentação dos 10 fungos endofíticos testados, 9 mostraram halo de inibição variando de 7 a 29mm para *S. aureus*, *B.subtilis*, *E. coli*, *A. niger* e *Candida* spp. (URM 720, URM 2224, URM 4224 e URM 4249). Dentre os meios utilizados, o meio MPE revelou-se o melhor para a produção de metabólitos bioativos. O fungo endofítico RM-23 apresentou halo de inibição de 29mm para *Candida* sp. (URM 4249) com 24 horas de fermentação no meio MPE. A variabilidade genética dos fungos endofíticos do gênero *Colletotrichum* sp. foi realizada através da técnica PCR-RAPD a qual gerou 2 grupos distintos com cerca de 20% de fragmentos comuns entre eles.

ABSTRACT

Endophytes are known as microorganisms that live inside the plant without causing damage to the host. This study aimed to isolate microorganisms from *Lonchocarpus guilleminianus* (Tul) Malme (rabo-de-macaco) and investigate whether the endophytes produce antimicrobial substance. A total of 36 endophytic microorganisms (fungi and bacteria) were isolated and the antimicrobial activity evaluated against pathogenic microorganisms. 10 endophytic fungi showed activity in the "Plug Agar" test against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Candida* sp (URM-720, URM-2224, URM-4224 and URM-4249 - isolated from immunedepressed) and *Aspergillus niger*. In the fermented broth only nine presented antimicrobial activity. The best zone of inhibition was observed with the endophytic fungi RM-23, *Colletotrichum* sp., against *Candida* sp. (29mm) in the ferment broth (MPE) after 24 hours. The genetic diversity of the endophytic microorganisms was demonstrated using the RAPD technique and the isolates of *Colletotrichum* sp. could be grouped into two distinct classes.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos endofíticos são conhecidos há mais de um século, porém, somente nas últimas décadas despertaram maior interesse em decorrência do seu potencial biotecnológico (Araújo et al., 2002).

São considerados endofíticos quaisquer microrganismos que, pelo menos em uma fase de seu ciclo de vida, colonizam o interior de tecidos vegetais aéreos sem causar dano aparente à planta hospedeira (Carroll, 1986). Esse conceito não incluía bactérias fixadoras de N₂, fungos micorrízicos e microrganismos que colonizam o interior da raiz.

Em geral, os endofíticos vivem em associação neutra com a planta e, com o passar do tempo, podem ajudar no desenvolvimento da mesma, proporcionando uma associação benéfica através da sua presença nas raízes, folhas ou caule.

Em todas as espécies de plantas estudadas até o momento foi encontrada a presença de microrganismos endofíticos, sugerindo íntima relação entre os endófitos e as plantas, o que evidencia a co-evolução dos microrganismos com seus hospedeiros, apresentando uma íntima relação mutualística, através da qual os endófitos recebem nutrientes e proteção da planta hospedeira (Saikkonen et al., 1998; Misaghi & Donndelinger, 1990).

O acúmulo de informações sobre essa interação planta-endofítico tem tido uma atenção especial, uma vez que, algumas espécies de microrganismos endofíticos são produtoras de fármacos, como por exemplo,

antitumorais e antibióticos, além do seu importante papel no controle biológico de doenças bacterianas e fúngicas (Azevedo et al., 2000; Salerno et al., 2000). Esta interação também possibilita, em alguns casos, resistência contra patógenos (Lemanceau & Alabouvette, 1993; Hallmann et al., 1997; M'piga et al., 1997).

O mundo dos microrganismos possui uma ampla diversidade biológica e bioquímica e representa um recurso ainda pouco explorado e de enorme valor para o futuro (Bull, 1991; Labeda, 1990).

O estudo da produção de substâncias antimicrobianas por microrganismos endofíticos em conjunto com a utilização da biologia molecular neste trabalho poderá facilitar o entendimento destas interações.

Este trabalho teve como objetivo geral, verificar a presença de microrganismos endofíticos isolados de folhas de *Lonchocarpus guilleminianus* (Tul.) Malme (rabo-de-macaco) envolvidos na produção de substâncias bioativas, e como objetivos específicos:

- Isolar bactérias e fungos de folhas de *Lonchocarpus guilleminianus* (Tul.) Malme rabo-de-macaco.
- Identificar os microrganismos isolados.
- Determinar a atividade antimicrobiana dos microrganismos isolados, usando como microrganismos teste, bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, leveduras e fungos filamentosos.

- Verificar por técnicas moleculares – RAPD – a diversidade e similaridade dos microrganismos isolados.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Microrganismos endofíticos e sua ocorrência

Os microrganismos endofíticos foram descritos inicialmente por Bary em 1866, mas, somente há poucas décadas, foi demonstrado que o interior de raízes, folhas e sementes de plantas podem servir como reservatório para abrigar estes microrganismos.

Pela ausência de conhecimento sobre o papel biológico destes microrganismos, alguns termos foram utilizados para defini-los. Sturdy & Cole (1974) os denominaram de microrganismos endógenos, enquanto Gardner et al (1982) os consideraram como bactérias residentes do xilema. Segundo Kloepper & Beauchamp (1992), o termo mais adequado é “endofítico”, que pode ser definido como “microrganismos que ocorrem no interior dos tecidos de plantas e aparentemente não causam sintomas de doenças ao hospedeiro”.

Wilson (1995) definiu microrganismos endofíticos como “fungos ou bactérias que, durante o seu ciclo de vida, invadem o tecido de plantas vivas e causam infecção inaparente ou assintomática, mas, não causam sintomas de doenças”.

Hallmann et al. (1997) sugeriram uma definição mais ampla, considerando microrganismos endofíticos aqueles isolados de tecidos vegetais desinfectados que não causam aparentemente dano às plantas.

Segundo Azevedo (1998), os microrganismos endofíticos são distintos dos fitopatogênicos, que causam doenças nas plantas, e também diferem dos microrganismos epifíticos, que vivem na superfície dos órgãos e tecidos vegetais. Estas distinções são apenas didáticas, uma vez que, pode ocorrer sobreposição entre estes grupos microbianos dificultando sua separação.

Certos endofíticos são provavelmente descendentes de patógenos de plantas, como sugerido por White et al. (1990). Além disso, alguns endofíticos podem não produzir sinais, mas, sob certas condições, podem tornar-se patogênicos em plantas hospedeiras (Sardi et al., 1992).

Outros grupos microbianos, como fungos micorrízicos e bactérias fixadoras de nitrogênio também vivem associados aos seus hospedeiros e podem ser considerados endofíticos. Entretanto, os fungos micorrízicos são diferentes de outros endofíticos da raiz porque possuem estruturas externas, como hifas. Igualmente, bactérias fixadoras de nitrogênio como *Rhizobium*, também apresentam estruturas externas, os nódulos, sendo possível distinguí-los de outras bactérias endofíticas da raiz. Estes dois grupos microbianos são bastante estudados e sua associação com as plantas é bem conhecida (Azevedo et al., 2000).

Os endofíticos, da mesma forma que os fitopatógenos, apresentam a capacidade de penetrar na planta e se disseminar sistemicamente, habitando de forma ativa o apoplasto do hospedeiro (Mahaffee et al., 1997; Quadt-Hallmann et al., 1997b; Salermo et al., 2000).

A disseminação pode se fazer por vários caminhos e, o mais comum, é através de feridas e aberturas naturais da raiz (Sprent & James, 1995).

Segundo Azevedo (1998), a disseminação pode ocorrer durante o próprio crescimento das raízes que, ao penetrar no solo, sofre abrasões que facilitam a entrada dos microrganismos, através das aberturas naturais como os estômatos e hidatódios; pelas aberturas causadas por insetos e por estruturas de fungos patogênicos, como os apressórios.

A disseminação também pode ocorrer dentro de estruturas fúngicas como mostrado por Paula et al. (1991), que identificaram a bactéria endofítica *Acetobacter diazotrophicus* dentro do fungo micorrízico *Glomus clarum*. Através destas vias, os microrganismos atingem diversos órgãos e tecidos das plantas.

Em decorrência da associação entre endofíticos e espécies vegetais, estes microrganismos co-evoluíram com os seus hospedeiros apresentando uma íntima interação mutualística, através da qual os endofíticos recebem nutrientes e proteção do hospedeiro e a planta apresenta vantagens decorrentes dessa interação (Araújo et al., 2000). Em conseqüência, a planta pode se tornar resistente aos patógenos (M'Piga et al., 1997; Hallmann et al., 1997) e aos diversos fatores bióticos e abióticos (Clay et al., 1993).

A ocorrência de microrganismos endofíticos é muito ampla e vem sendo observada em diferentes plantas, algas marinhas (Cubit, 1974), musgos e pteridófitas (Petrini, 1986), coníferas (Bernstein & Carroll, 1977;

Carroll & Carroll, 1978; Sieber, 1988), palmeiras tropicais (Rodrigues & Samuels, 1990; Dreyfuss & Petrini, 1984) e folhas largas (Fisher & Petrini, 1990; Sieber et al., 1991) apresentando uma certa preferência por certos órgãos da planta, principalmente em partes do hospedeiro que encontra-se saudas.

A maior concentração de endofíticos ocorre durante o verão quando as folhas estão mais envelhecidas. Do ponto de vista evolucionário pode-se supor que os microrganismos endofíticos sejam originalmente derivados de fitopatógenos que perderam a virulência em consequência de um prolongado período de crescimento dentro da planta, ou que estes endofíticos sejam patógenos em potencial, incapazes de expressar genes específicos da doença (Hallmann et al., 1998).

Recentemente, Huang et al. (2001) isolaram 172 fungos endofíticos do interior da casca de *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* e *Torreya grandis*, plantas medicinais na China. Dos fungos isolados, 13,4% e 52,3% apresentavam, respectivamente, atividade antitumoral e atividade antifúngica, indicando o grande potencial desta microbiota endofítica.

Segundo Fisher et al. (1986), a incidência de fungos endofíticos é maior à medida que aumenta a idade do tecido hospedeiro. Petrini & Fisher (1986) isolaram 32 espécies de endofíticos do caule da planta *Salicornia perennis* e observaram maior concentração destes microrganismos nos tecidos com maior tempo de cultivo (Petrini e Fisher, 1986).

Vários fungos endofíticos desempenham uma função nas plantas que os abrigam, como é o caso do *Acremonium coenophialum*, um endofítico de gramíneas, que tem efeito inibitório contra vários patógenos (Fisher et al., 1986). Além dos fungos, existem bactérias de grande importância que interagem com as plantas.

Glienke et al. (1995) isolaram vários fungos de *Citrus* entre os quais predominaram os gêneros *Glomerella* sp. (56,5%) e *Phyllosticta* sp. (27%).

Bussabam et al. (2001) isolaram de folhas de rizomas do gengibre (*Amomum siamense*), durante a estação seca e úmida, várias espécies de fungos endofíticos: sete *Ascomycetes*, vinte e seis *Colletotrichum*, além de *Glomerella* spp., *Xylaria* e *Phomopsis* spp., bem como duas novas espécies de *Ascomycetes* – *Gaeumannomyces amoni* e *Leiosphaerella amoni* – e três novas espécies de *Pyricularia*.

Erwinia sp. e *Xanthomonas* sp. foram isolados de raízes, caule e flores de plantas de algodão (*Gossipium hirsutum*) oriundas de casa de vegetação e do campo (Misaghi & Donndelinger, 1990).

McInroy & Kloepper (1991) isolaram de raízes e caules sadios, 822 bactérias endofíticas de milho e algodão, uma microflora bacteriana bastante diversificada, sendo que 27% eram da família Enterobacteriaceae, 26% Pseudomonadaceae e 11% pertenciam ao gênero *Bacillus*.

Fisher et al. (1992) isolaram bactérias e fungos endofíticos de três tipos de tecidos (epiderme, córtex do caule e folha) de plantas do milho

sadias, e verificaram que as partes das plantas mais próximas do solo eram mais colonizadas por bactérias do que a parte mais superior das plantas.

Souza e Azevedo (1995) obtiveram 189 bactérias endofíticas de folhas de plantas sadias de milho, sendo que 55% pertenciam ao gênero *Bacillus* e as demais aos gêneros *Pseudomonas*, *Clavibacter*, *Micrococcus* e *Erwinia*.

Hinton & Bacon (1995) relataram o isolamento de *Enterobacter cloacae* em raízes de plântulas de milho (*Zea mays*), e constataram que a natureza endofítica desta bactéria tem um potencial significativo no biocontrole de fitopatógenos do milho, particularmente *Fusarium moniliforme*.

Silva et al. (1995) verificaram a ocorrência de 53 actinomicetos endofíticos dos quais 31 foram isolados das folhas e 22 das raízes de milho (*Zea mays* L.). O gênero *Microbispora* foi o mais freqüente (62%), seguido de *Streptomyces* e *Streptosporangium*.

Maitan (1998) isolou sete actinomicetos endofíticos da planta medicinal *Solanum lycocarpum*, que ocorre no Estado de Góias. Alguns actinomicetos apresentaram atividade antibiótica e foram identificados como pertencentes aos gêneros: *Streptomyces*, *Rhodococcus*, *Microbacterium* e *Luteococcus*.

Matsuura (1998) isolou de folhas e raízes do feijão Caupi (*Vigna unguiculata*) 31 linhagens de actinomicetos endofíticos, entre os quais predominou o gênero *Streptomyces* (39%) seguido de *Nocardia* (25%).

Brito (1998) também isolou de folhas e raízes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) trinta e dois actinomicetos endofíticos, dos quais 78% foram isolados da raiz.

Araújo et al. (1999) isolaram 53 actinomicetos de folhas e raízes de milho (*Zea mays* L.) cultivado no Campus da UFPE, e cerca de 43% dos isolados apresentam atividade antimicrobiana contra algumas bactérias Gram-positivas e *Candida albicans*.

A exploração de micro-nichos ecológicos pode promover um maior conhecimento da diversidade microbiana endofítica e, através de técnicas moleculares, pode-se comparar esta biodiversidade nos diversos micro-nichos, relacionando-os aos produtos biotecnológicos de importância econômica.

2.2. Isolamento de Microrganismos Endofíticos

Os endofíticos podem ser isolados dos mais diferentes tecidos e órgãos vegetais. Este isolamento é realizado a partir de folhas, ramos, caules, raízes e estruturas florais como pólen, ovário, anteras e estames (Araújo et al., 2002).

Em decorrência da dificuldade de se isolar microrganismos endofíticos, que crescem mal ou não crescem *in vitro*, nos últimos anos foram descritas várias técnicas que facilitam o crescimento dos microrganismos mais exigentes, fornecendo condições de cultivo

semelhantes ao seu habitat natural. Além disso, é necessário eliminar os microrganismos epifíticos que vivem na superfície da planta hospedeira (Fisher et al., 1992; Pereira et al., 1993; Quadt-Hallmann et al., 1997a; Hallmann et al., 1997).

As principais técnicas utilizadas no isolamento de microrganismos endofíticos são: fragmentação (Pereira et al., 1993), extração a vácuo (Bell et al., 1995), centrifugação (Dong et al, 1994) e maceração (Hallmann et al, 1995), porém todas essas metodologias promovem uma ruptura ou fragmentação no tecido vegetal, o qual contém o microrganismo endofítico.

A técnica de fragmentação é a mais utilizada e baseia-se no corte dos diferentes órgãos vegetais (folhas, raízes, ramos, etc), podendo ser utilizada para o isolamento de bactérias e fungos (Pereira et al., 1993).

O processo de desinfestação é a etapa mais importante durante o isolamento de microrganismos endofíticos. A literatura relata a utilização de vários desinfetantes como: hipoclorito de sódio (Fischer et al., 1992; Quadt-Hallmann et al., 1997a), etanol (Dong et al., 1994; Fischer et al., 1992), peróxido de hidrogênio (McInroy & Klopper, 1994), cloreto de mercúrio (Sriskandarajah et al., 1993) ou uma combinação de dois ou mais destes desinfetantes (Pleban et al., 1995).

A concentração do hipoclorito de sódio assim como o tempo empregado podem variar de acordo com a textura do material a ser utilizado, pois esta etapa tem como finalidade eliminar apenas os microrganismos epifíticos sem destruir os endofíticos (Pereira et al., 1993).

Para eliminar a possibilidade de isolar contaminantes é importante monitorar a eficiência da desinfecção da amostra através da imersão da raiz em caldo nutriente (Gagné et al., 1987), ou transferir 0,1ml da água de lavagem final para meio sólido (McInroy & Kloepper, 1994).

Para verificar a ocorrência de microrganismos endofíticos não cultiváveis a estratégia, segundo Hallmann et al. (1997), é realizar a coloração vital *in situ* para enumeração e localização desta comunidade microbiana. A coloração vital em combinação com a microscopia, constitui um método rápido para detectar bactérias dentro da planta e realizar a sua quantificação.

Como relatado por Hallmann et al. (1997), estes procedimentos associados à utilização de meios nutritivos específicos, permitem conhecer a colonização interna e assim estimar a densidade populacional endofítica.

Outro fator bastante importante para o isolamento de microrganismos endofíticos é a composição do meio de cultura que vai estimular o crescimento da comunidade microbiana da planta estudada e a produção de compostos bioativos. A utilização dos meios Água Ágar, Arginina Glicerol Ágar e Caseína Amido Ágar tem como finalidade oferecer condições nutritivas diversificadas para observar a presença de actinomicetos endofíticos, como realizado em gramíneas (Sardi et al., 1992), folhas e raízes do milho (*Zea mays* L.) (Silva et al., 1995; Araújo et al., 1999), folhas e raízes do feijão Caupi (*Vigna unguiculata*) (Matsuura, 1998). Galvão (2002) utilizou, sem sucesso, a mesma diversidade de meios de cultura para isolar actinomicetos endofíticos da planta medicinal *Capraria biflora* L., embora

tenha isolado uma grande diversidade de fungos e outras bactérias endofíticas.

2.3. Aplicações Biotecnológicas

Com o surgimento de bactérias patogênicas resistentes a agentes antimicrobianos, várias investigações vêm sendo desenvolvidas para a obtenção de antibióticos mais efetivos.

As plantas medicinais utilizadas pelas diversas populações indígenas em todo o mundo constituem uma fonte promissora de substâncias com atividade antimicrobiana, imunossupressiva e antitumoral.

Algumas vezes, microrganismos associados às plantas, oferecem materiais com elevado efeito terapêutico mais do que a própria planta, rendendo novos compostos farmacologicamente ativos (Strobel & Long, 1998)

Segundo Azevedo (1998) a planta proporciona nutrientes e proteção para os microrganismos, os quais, por sua vez, protegem a superfície das folhas de insetos (inseticida natural), promovem resistência, liberam subprodutos de interesse biotecnológico como fitohormônios, enzimas, antibióticos e antitumorais. Alguns endofíticos aumentam a tolerância das plantas à seca, enquanto outros promovem a fixação não simbiótica do nitrogênio atmosférico e produzem fatores de crescimento vegetal, toxinas e enzimas.

Atualmente, está demonstrado que esta associação planta–microrganismo desempenha um papel fundamental para o hospedeiro.

Muitos microrganismos endofíticos podem produzir substâncias bioativas que podem estar envolvidas na relação hospedeiro-endofítico. Segundo Strobel et al. (1997), estes metabólitos secundários desempenham um importante papel na natureza, possuindo uma grande aplicabilidade para a medicina humana e para a agropecuária.

As infecções causadas por fungos constituem um grande problema para a saúde do homem, especialmente aidéticos e imunocomprometidos, necessitando de novos antimicóticos para solucionar este problema.

Estudos realizados por Schutz (2001) mostraram que 51% de compostos bioativos isolados de fungos endofíticos, possuem estrutura química desconhecida, tratando-se, portanto, de novos compostos bioativos.

Até 1990 nenhum fungo endofítico tinha sido isolado de plantas medicinais. Árvores da família taxácea (*Taxus* spp) produtoras de taxol, um diterpenóide utilizado no tratamento do câncer mamário e de útero, possui elevado custo operacional da sua extração.

O isolamento do fungo endofítico *Taxomyces andreanae* a partir da casca da árvore *Taxus brevifolia* abriu uma nova etapa para a produção do taxol permitindo a sua produção por fermentação (50ng/litro), comprovando a importância dos endofíticos na produção de metabólitos bioativos (Stierle et al. 1993).

Posteriormente Li et al. (1996) isolaram *Pestalotiopsis microspora* de plantas do Nepal, *Taxus wallichiana*, e observaram que este fungo endofítico

produz taxol em nível próximo a sua utilização comercial, especialmente quando inibidores da síntese de esteróis são adicionados ao meio de fermentação, mudando o fluxo do carbono do ergosterol para taxol.

Diversos fungos endofíticos produzem comumente mais taxol do que diversas plantas superiores. A distribuição destes endófitos em outras plantas mostra que o taxol é de distribuição mundial e não confinada simplesmente a endofíticos de árvores da família taxáceas (Strobel e Long, 1998).

A diversidade genética e bioquímica de fungos endofíticos é enorme. Strobel & Long (1998) obtiveram de uma única árvore cipreste (*Taxodium distictuns*) 20 isolados de *P. microspora* e apenas dois apresentaram características fenotípicas idênticas. Enquanto alguns destes isolados produzem quantidades significativas de taxol, outros são incapazes de sintetizar este agente terapêutico.

Strobel et al. (1999) isolaram de uma planta medicinal (*Tripterygium wilfordii*) nativa da Eurasia, o fungo endofítico *Cryptosporiopsis quercina*, produtor de um potente antimicótico – criptocandin – que apresenta elevada atividade contra *Candida albicans* e *Trichophyton* spp., sendo importante para o tratamento de dermatoses.

Lee et al. (1995) isolaram, da mesma planta medicinal (*T. wilfordii*), o fungo endofítico *Fusarium subglutinans* que produz um agente imunossupressivo denominado subglutinol, tão eficiente quanto a ciclosporina, um imunossupressivo já comercializado.

Da mesma planta (*T. wilfordii*) Wagenaar et al. (2000) obtiveram um novo alcalóide denominado de citochalcasina, produzido pelo fungo endofítico *Rhinochadiella* sp. Este composto apresenta elevada atividade antitumoral e foi identificado como 22-oxa-12 citochalcasina.

Antibióticos voláteis também são produzidos por fungos endofíticos. Worapong et al. (2001) e Strobel et al. (2001) isolaram uma nova espécie de fungo, *Muscador albus*, de ramos da árvore *Cinnamomum zeylanicum*. Este fungo produz cinco compostos voláteis e entre eles o éster isoamil acetato que inibe vários fungos e bactérias patogênicas de humanos, além de vários fitopatógenos.

Endofíticos são importantes no controle biológico de doenças bacterianas, fúngicas ou causadas por nematóides em plantas ou ainda controlam insetos-pragas. Isso fez com que os pesquisadores voltassem sua atenção para o seu isolamento e caracterização visando não apenas estudos acadêmicos, mas também aplicações biotecnológicas (Araújo et al., 2002).

Endofíticos de plantas perenes são prováveis antagonistas de insetos fitopatogênicos (Carroll, 1988, 1991; Clark et al., 1989; Claydon et al., 1985; Webber, 1981).

Microrganismos endofíticos isolados da superfície desinfetada de tecidos de plantas exibem elevado potencial como agentes de biocontrole contra microrganismos patogênicos (Pleban et al., 1995; Sturz & Matheson, 1996; Sharma & Nowak, 1998; Duijff et al., 1997; Sturz et al., 1998; Vilich et

al., 1998), insetos (Petrini et al., 1989; Azevedo et al., 2000) e nematóides (Hallmann et al., 1998).

Da associação entre endófitos e espécies vegetais, destaca-se uma maior resistência dos vegetais em ambientes com intenso estresse causado por fatores bióticos ou abióticos como, temperatura, umidade, luz, etc (Saikkonen et al., 1998; Clay et al., 1993), e/ou aumento do crescimento vegetal (Hallmann et al., 1997; Bent & Chanway, 1998; Shishido et al., 1999).

Sardi et al. (1992) isolaram 499 actinomicetos endofíticos, dos quais 31 mostraram atividade antibacteriana para *Micrococcus luteus* e 23 apresentaram ação antifúngica para *Fusarium oxysporum*.

Das 243 linhagens de bactérias endofíticas isoladas de pecíolos e raízes do algodão por Chen et al. (1993), nove *Pseudomonas* sp. e duas *Phyllobacterium rubiacearum* reduziram expressivamente os sintomas da doença causada pelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*.

Kisuka et al. (1998), encontraram novas substâncias químicas produzidas por *Microbispora* sp. e *Streptomyces* sp., endofíticos isolados de folhas de gramíneas. Esse novo antibiótico – herbimicina - apresenta atividade contra ervas daninhas.

Azevedo (1998), observou que fungos endofíticos produzem fatores de crescimento, como giberelina produzida por *Fusarium moniliforme*, a qual promove modificações morfológicas nas plantas hospedeiras.

Brady & Clardy (2000) isolaram de plantas da Área de Conservação Guanacaste da Costa Rica, o fungo endofítico *Fusarium* sp.CR377, dotado de potente atividade contra *Candida albicans*.

Rodrigues et al. (2000) isolaram compostos bioativos produzidos pelos fungos endofíticos *Guignardia* sp., *Phomopsis* sp. e *Pestalotiopsis guepinii* isolados de *Spondias mombin*. A atividade dos endofíticos foi testada contra 14 microrganismos, incluindo actinomicetos, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, leveduras e fungos filamentosos. O fungo *Guignardia* sp. inibiu *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Geotrichum* sp. e *Penicillium canadensis*. *Pestalotiopsis guepinii* apresentou atividade contra *S. cerevisiae*, enquanto que *Phomopsis* sp. apresentou atividade antifúngica contra *Cladosporium elatum*, *Mycotypha* sp. e *S. cerevisiae*.

As perspectivas de utilização de microrganismos para solucionar problemas nas áreas da saúde, da agricultura e do meio ambiente, estão sendo potencializadas pelo rápido desenvolvimento da engenharia genética. Avanços nas técnicas de triagem e isolamento, associados ao desenvolvimento da computação e instrumentação, permitirão que novas linhagens se tornem disponíveis para as mais diversas aplicações (Bull, 1991; Hall, 1989; Matsuura, 1998).

2.4. Biologia Molecular

Inúmeras investigações vêm mostrando que microrganismos endofíticos produzem moléculas bioativas que são iguais aos compostos isolados de suas plantas hospedeiras. Estudos genéticos vêm sendo realizados para explicar como estes genes de produção de metabólitos da planta foram adquiridos pelo fungo endofítico.

Long et al. (1998) verificaram que *Pestalotiopsis microspora* Ne32 pode ser transformado pela adição de DNA exógeno junto a telômeros repetidos, promovendo a formação de DNA extracromossomal com replicação autônoma e expressão da informação do DNA. Segundo estes autores, a fácil transformação deste fungo ajuda a entender a adaptação destes endofíticos às condições ambientais da planta hospedeira, sugerindo que o DNA da planta pode ser absorvido pelo próprio genoma do fungo. Este resultado confirma que vegetais e fungos transgênicos podem ocorrer naturalmente pela transferência de genes entre espécies pertencentes a diferentes reinos.

Como relatado nas diversas investigações, numerosos compostos químicos de origem vegetal são produzidos por microrganismos que habitam vegetais. Segundo Azevedo (1998) ocorre uma transposição de genes entre plantas e fungos em uma verdadeira engenharia genética *in vivo*.

A introdução de genes exógenos em bactérias possibilita a aquisição de novas características utilizadas no controle de doenças e pragas. *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*, um endófito colonizador do xilema de

várias espécies vegetais, foi modificado para expressar o gene *cryA(c)*, de *Bacillus thuringiensis*, que codifica uma proteína com atividade inseticida contra a broca (*Ostrinia nubilalis*) do colmo do milho (Fahey et al., 1991; Lampell et al., 1994). O gene *cryA(c)* foi inserido em um vetor suicida que não se replica em *C. xyli*. Um fragmento genômico de *C. xyli* foi utilizado na construção para induzir recombinação do vetor com o cromossomo da bactéria. Os transformantes resultantes apresentaram grande estabilidade do gene inserido no cromossomo bacteriano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, J.M.; SILVA, A.C.; AZEVEDO, J.L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, (in press), 1999.

ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI, W. ; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, P.A.V.; SARIDAKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. Variability and interaction between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p.229-236, 2001.

ARAÚJO, W.L.; LIMA, A.O.S.; AZEVEDO, J.L.; MARCON, J.; SOBRAL, J.K.; LACAIVA, P.T. **Manual de Isolamento de Microrganismos Endofíticos**, Piracicaba, 86p. 2002.

AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. In: I.S. MELO e J.L. AZEVEDO **Ecologia Microbiana**. Editora da EMBRAPA, Jaguariúna, SP. p.117-137, 1998.

AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI Jr., W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **EJB: Eletronic Journal of Biotechnology [on line]**, 3, <http://www.ejb.org/content/vol3/issue1/full/3/4.2000>.

BACON, C.W.; HINTON, D.M. Endophytic and biological control potential of *Bacillus mojavensis* and related species. **Biological Control**, v.23, p.274-284, 2002.

BARY, A. **Morphologie und physiologie der Pilze, Flechten end Myxomyceten**. Leipzig: Engelamn, 316p., 1866.

BELL, C.R.; DICKIE, G.A.; HARVEY, W.L.G.; CHAN, J.W.Y.F. Endophytic bacteria in grapevine. **Canadian Journal of Microbiology**, v.41, p.46-53, 1995.

BENT, E.; CHANWAY, C.P. The growth- promoting effects of a bacterial endophyte on lodgepole pine are partially inhibited by the presence of other rhizobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.44, p.980-988, 1998.

BERNSTEIN, M.E.; CARROLL, G.C. Internal fungi in old-growth douglas fir foliage. **Canadian Journal of Botany**, v.55, p.644-653, 1977.

BRADY, S.F.; CLARDY, J. CR377, a new pentaketide antifungal agent isolated from an endophytic fungus. **Journal of Natural Products**, v.63, p.1447-1448, 2000.

BRITO, K.C. **Isolamento e atividade antimicrobiana de actinomicetos endofíticos do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Monografia de Graduação Universidade Federal Rural de Pernambuco, PE, Brasil, 40p. 1998.

BULL, A.T. Biotechnology and biodiversity. In: D.L. HAWKSWORTH. **The Biodiversity of Microorganisms and Invertebrates: Its Role in Sustainable Agriculture**. Dordrecht: Kluwer,1991.

BUSSABAN, B; LUMYONG, S; LUMYONG, P; MCKENZIE, & H; HYDE, K D. Endophytic fungi from *Amomum siamense*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47,. p.943-948, 2001.

CARROL, G.C. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: N.J. FOKKEMA, J. VAN DER HEAVEL (edts), **Microbiology of the Phylloplane**. Cambridge University Press, London, UK. p. 205-222, 1986.

CARROL, G.C. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen too mutualistic symbiont. **Ecology**. v.69, p.2-9, 1988.

CARROL, G.C. Fungal associates of woody plants as insect antagonists in leaves and stems. In: P. BARBOSA, V.A. KRISCHIK, C.G. JONES (edts.). **Microbial mediation of plant-herbivore interactions**. New York, John Wiley and Sons. p.253-271, 1991.

CARROL, G.C.; CARROL,F.E. Studies on the incidence of coniferous endophytes in the Pacific Northwest. **Canadian Journal of Botany**, v.56, p.3034-3043, 1978.

CHEN, C.Q.; MUSSON, G; BAUSKE, E.; KLOEPPER, J.W. Potential of endophytic bacteria for biological control of Fusarium wilt of cotton.

Phytopathology, v.83, p.1404, 1993.

CLARK, C.L.; MILLER, J.D.; WHITNEY, N.L. Toxicity of conifer needle endophytes to spruce budworm. **Mycological Research**, v.95, p.508-512, 1989.

CLAY,K.; MARKS,S.; CHEPLICK, G.P. Effects of insect herbivory and fungal endophyte infection on competitive interactions among grasses. **Ecology**, v.74, p.1767-1777, 1993.

CLAYDON, N.; GROVE, J.F.; POPLE, M. Elm bark beetle boring and feeding deterrents from *Phomopsis oblonga*. **Phytochemistry**, v.24, p.937-943, 1985.

CUBIT, J.D. **Interactions of seasonally changing physical factors and grazing affecting high intertidal communities on a rocky shore.** Dissertation. University of Oregon. Eugene, Oregon, 1974.

DONG, Z.; CANNY, M.J.; McCULLY, M.E.; ROBOREDO, M.R.; CABADILLA, C.F.; ORTEGA, E.; RODÉS, R. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. A new role for the apoplast. **Plant Physiology**, v.105, p.1139-1147, 1994.

DREYFUSS, M.; PETRINI, O. Further investigations on the occurrence and distribution of endophytic fungi in tropical plants. **Botanica Helvetica**, v.94, p.33-40, 1984.

DUIJFF, B.J.; GIANINAZZI-PEARSON, V.; LEMANCEAU, P. Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. **New Phytologist**, v.135, p.325-334. 1997.

FAHEY, J.W.; DIMOCK, M.B.; TOMASINO, S.F.; TAYLOR, J.M.; CARLSON, P.S. Genetically engineered endophytes as biocontrol agents: A case study in industry. In: **Microbial Ecology of Leaves**. Springer-Verlag, New York, p.402-411, 1991.

FISHER, P.J.; ANSON, A.E.; PETRINI, O. Fungal endophytes in *Ulex europaeus* and *Ulex gallii*. **Transactions British Mycological Society**, v.86, p.153-93, 1986.

FISHER, P.J.; PETRINI, O. A comparative study of fungal endohpytes in xylem and bark of *Alnus* species in England and Switzerland. **Mycology Research**, v.94, p.313-319, 1990.

FISHER, P.J.; PETRINI, O. ;LAPPIN SCOTT, H.M The distribution on some fungal and bacteria endophytes in maize (*Zea mays* L.) **New Phytologist**, v.122, p.299-305, 1992.

GALVÃO, K.D. **Isolamento e atividade antifúngica de microrganismos isolados de folhas e raízes de *Capraria biflora* L. (Schrophulariaceae).**

Tese (mestrado), Universidade Federal de Pernambuco, PE, Brasil, 87p., 2002.

GAGNÈ, S.; RICHARD, C.; ANTOUN, H. Xylem-residing bacteria in alfalfa roots. **Canadian Journal Microbiology**, v.33, p.996-1000, 1987.

GARDNER, J.M.; FELDMAN, A.W.; ZABLOTOWICZ, R.M. Identity and behavior of xylem-resident bacteria in rough lemon roots of Florida citrus trees. **Applied and Environmental Microbiology**, v.43, p.1335-1342, 1982.

GLIENKE, C.; LIMA, E.A.L.A.; AZEVEDO, J.L. Isolamento e identificação de fungos endofíticos de quatro variedades de tangerinas. In: **Reunião Anual de Genética de Microrganismos**, 20. Resumos. Piracicaba: ESALQ/USP, p.114,1995.

HALL, M.J. Microbial product discovery in the biotechnology. **Biothecnology**, v.7, p.427-430, 1989.

HALLMANN, J.; KLOEPPER, J.; RODRIGUEZ-KABANA, R.; SIKORA, R.A. . Endophytic rhizobacteria as antagonists of *Meloidogyne incognita* on cucumber. **Phytopathology**, v.85, p.1136, 1995.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.895-914, 1997.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R.; KLOEPPER, J. W. Interactions between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, p.925-937, 1998.

HINTON, D.M.; BACON, C.W. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. **Mycopathologia**, v.129, p.117-125, 1995.

HUANG, H.; WANG, J.; LI, G.; ZHENG, Z. & SU, W. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.31, p.163-167, 2001.

JACOBS, M.J.; BUGBEE, W.W.; GABRIELSON, D.A. Enumeration, location and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. **Canadian journal of botany**, v.63, p.1262-1265, 1985.

KLOEPPER, J.W.; BEAUCHAMP, C.J. A review of issues related to measuring colonization of plants roots by bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.38, p.1219-1232, 1992.

LABEDA, D.P. **Isolation of Biotechnological Organisms from Nature.** New York: McGRAW-HILL, 1990.

LAMPEL, J.S.; CANTER, G.L.; DIMOCK, M.B.; KELLY, J.L.; ANDERSON, J.J.; URATANI, B.B.; FOULKE JR., J.S.; TURNER, J.T. Integrative cloning, expression, and stability of the *cryIA(c)* gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* in a recombinant strains of *Cavibacter xyli* subsp. *Cynodontis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.501-508, 1994.

LEE, J.C.; LOBKOVSKY, E.; PLIAM, N.B.; STROBEL, G.A.; CLARDY, J. Subglutinol A&B: immunosuppressive compouds from endophytic fungus - *Fusarium subglutinans*. **Journal of Organic Chemistry**, v.60, p.7076-7077, 1995.

LEMANCEAU, P.; ALABOUVETTE , C. Supression of *Fusarium* wilt by fluorescent *Pseudomonas*, mechanisms and applications. **Biocontrol Science and Technology**, v.3, p.219-234,1993.

LI, J.Y.; STROBEL, G.; SIDHU, R.; HESS, W.M.; FORD, E.J. Endophytic taxol-producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum*. **Microbiology-UK**, v.142, p.2223-2226, 1996.

LONG, D.M.; SMIDMANSKY, E.D.; ARCHER, A.J.; STROBEL, G.A. In vivo addition of telomeric repeats to foreign DNA generates chromossomal DNAs

in the taxol-producing fungus *Pestalotiopsis microspora*. **Fungal Genetic & Biology**, v.24, p.335-344, 1998.

MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W.; VAN VUURDE, J.W.L.; VAN DER WOLF, J.M.; VAN DEN BRINK, M. Endophytic colonization of *Phaseolus vulgaris* by *Pseudomonas fluorescens* strain 89b-27 and *Enterobacter asburiae* strain JM22. In: M.H. RYDER, P.M. STEPHENS, G.D. BOWEN **Improving plant productivity in rhizosphere bacteria**. CSIRO, Melbourne, Australia, p.180, 1997.

MAITAN, V.R. **Isolamento e caracterização de actinomicetos endofíticos isolados de *Solanum lycocarpum* (lobeira)**. Tese (mestrado), Universidade Federal de Goiás, GO, Brasil. 122p., 1998.

MATSUURA, T. **Ocorrência de actinomicetos endofíticos produtores de antibióticos isolados de folhas e raízes de feijão Caupi (*Vigna unguiculata*)**. Tese (mestrado), Universidade Federal de Pernambuco, PE, Brasil, 85p., 1998.

McINROY, J.A.; KLOEPPER, J.W. Analysis of population densities and identification of endophytic bacteria of maize and cotton in the field. **Bulletin SROP**, v.14, p.328-331, 1991.

McINROY, J.A.; KLOEPPER, J.W. Studies on indigenous endophytic bacteria of sweet corn and cotton. In: . F. DOWLING, D.N. BOESTEN, B.

VCH. **Molecular ecology of rhizosphere microorganisms**, Verlagsgesellschaft, p.19-18, 1994.

MISAGHI, I.J.; DONNDELINGER, C.R. Endophytic bacteria in symptomfree cotton plants. **Phytopathology**, v.80, p.808-811, 1990.

M'PIGA, P.; B'LANGER, R.R.; PAULITZ, T.C.; BENHAMOU, N. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.50, p.301-320, 1997.

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

PEREIRA, J.O. **Fungos endofíticos dos hospedeiros tropicais *Stylosanthes guianensis* e *Musa cavendish***. Tese (doutorado), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo., SP, Brasil, 105p. 1993.

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

PETRINI, O. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In: N.J. FOKKENS; J. VAN DEN HEUVEL. **Microbiology of the phyllosphere**, p.175-187, 1986.

PETRINI, L.E.; PETRINI, O.; LAFLAMME, G. Recovery of endophytes of *Abies balsamiae* from needles and galls of *Paradiplosis tumifex*. **Phytoprotection**, v.70, p.97-103, 1989.

PETRINI, O., FISHER, P.J. Fungal endophytes in *Salicornia perennis*. **Transaction British Mycological Society**, v.87, p.647-651, 1986.

PLEBAN, S.; INGEL, F.; CHET, I. Control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse using endophytic *Bacillus* spp. **European Journal Plant Pathology**. V.101, p.665-672, 1995.

QUADT-HALLMANN, A.; BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in cotton: mechanisms of entering the plant. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p.577-582. 1997b.

QUADT-HALLMANN, A.; HALLMAN, J.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in cotton: localization and interaction with other plant-associated bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v.3, p.254-259, 1997a.

RODRIGUES, K.F.; SAMUELS, G.J. Preliminary study of endophytic fungi in a tropical palm. **Mycological Research**, v.94, p.827-830, 1990.

RODRIGUES, K.F.; HESSE, M.; WERNER, C. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*.

Journal of Basic Microbiology, v.40, p.261-267, 2000.

SAIKKONEN, K.; FAETH, S.H.; HELANDER, M.; SOLLIVAN, T.J. Fungal endophytes: A continuum of interactions with host plants. **Annual Review of**

Ecology and Systematics, v.29, p.319-343, 1998.

SALERMO, M.I.; GIANINAZZI, S.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Effects on growth and comparison of root tissue colonization patterns of *Eucalyptus viminalis* by pathogenic and nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*.

New Phytopathology, v.146, p.317-324, 2000.

SARDI, P.; SARACCHI, M.; QUARONI, S.; PETROLINO, B.; BORGONOV, G.E.; MERLI, S. Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized roots. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.2691-2693, 1992.

SCHUTZ, B. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. **British Mycological Society**, International Symposium Proceedings, Bioactive Fungal Metabolites-Impact and Exploitation, University of Wales, Swansea, 2001.

SCOTT, B.; SCHARDL, C. Fungal symbionts of grasses: evolutionary insights and agricultural potential. **Trends in Microbiology**, v. 1, p. 196-200, 1993.

SHARMA, V.K.; NOWAK, J. Enhancement of verticillium wilt resistance in tomato transplants by in vitro co-culture of seedling with a plant growth promoting rhizobacterium (*Pseudomonas* sp. strain PsJN). **Canadian Journal of Microbiology**, v.44, p.528-536,1998.

SHISHIDO,M.;BREUIL,C.; CHANWAY, C.P. Endophytic colonization of spruce by plant growth-promoting rhizobacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v.29, p.191-196, 1999.

SIEBER, T.N. Endophytische Pilze in Nadeln von gesunden un geschädigten Fichten (*Picea abies* (L.) Karst.). **European Journal Forest Patholog**, v.18, p.321-342, 1988.

SIEBER, T.N.; SIEBER-CANAVESI, F.; DORWORTH, C.E. Endophytic fungi of red alder (*Alnus rubra*) leaves and twigs in British Columbia. **Canadian Journal Botanic**, v.69, p.407-411, 1991.

SILVA, A.C., ARAUJO, J.M. & AZEVEDO, J.L. Ocorrência de actinomicetos endofíticos em milho (*Zea mays*). In: G. BANDEL, A.A. PIZZIRANI-KLEINER, J. L. AZEVEDO. **20ª Reunião anual de genética de microorganismos**, Piracicaba, v. 20., 1995.

SOUZA, A.O. & AZEVEDO, J.L. Interação de bactérias e fungos endofíticos isolados de Milho (*Zea mays*). **20ª Reunião anual de genética de microorganismos**. Piracicaba, v.20, p.126, 1995.

SPRENT, J.I., JAMES, E.K. N- fixation by endophytic bacteria: questions of entry and operation. In: FENDRIK; M. DEL GALLO; J.VANDERLEYDEN; M. DE ZAMAROCZY, ed. *Azospirillum* VII and related microorganisms. Berlin: Springer-Verlag, p.15-29 (NATO ASI Series, 37), 1995.

SRISKANDARAJAH, S.; KENNEDY, I.R.; YU, D.; TCHAN, Y.T. Effects of plant growth regulators on acetylene-reducing associations between *Azospirillum brasilense* and wheat. **Plant Soil**, v.153, p.165-177, 1993.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreane* na endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, v.260, p.214-216, 1993.

STROBEL, G.A.; LONG, D.M. Endophytic microbes embody pharmaceutical potential. **American Society of Microbiology News**, v.64, p.263-268, 1998.

STROBEL, G.A.; DIRKSIE, E.; SEARS, J.; MARKWORTH, C. Volatili antimicrobials from a novel endophytic fungus. **Microbiol**, v.147, p.2943-2950, 2001.

STROBEL, G.A.; FORD, E.; LI, J.Y. ; SEARS, J.; SIDHU, R.S.; HESS, W.M. *Seimatoantlerium tepuiense* gen. Nov., a unique epiphytic fungus producing taxol from the Venezuelan Guyana. **Systematic and Applied Microbiology**, v.22, p.426-433, 1999.

STROBEL, G.A.; HESS, W.M.; LI, J.Y., FORD, E.; SEARS, J.; SIDHU, R.S.; SUMMERELL, B. *Pestalotiopsis guepinii*, a taxol producing endophyte of the Wollemi Pine, *Wollemia nobilis*. **Australian Journal Botany**, v.45, p.1073-1082, 1997.

STURDY, M.L.; COLE, L.J. Studies on endogenous bacteria in potato tubers infected by *Phitophthora erythroseptica* Pethybr. **Annual Botanic**, v.8: p.121-127, 1974.

STURZ, A.V.; MATHESON, B.G. Populations of endophytic bacteria which influence host-resistance to *Erwinia*-induced bacterial soft rot in potato tubers. **Plant Soil**, v.184, p.265-271, 1996.

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**, v.44, p.162-167. 1998.

TIMOTHY, L.; CUTCHEON, N.; CARROL, G.A. Genotype diversity in populations of a fungal endophyte from Douglas Fir. **Mycologia**, v. 82, p. 180-186, 1993.

VILICH, V.; DOLFEN, M.; SIKORA, R.A. *Chaetomium* spp. of barley following seed treatment and its effect on plant growth and *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* disease severity. **Journal Plant Disease Prot.** v.105, p.130-139, 1988.

WAGENAAR, M.; CORWIN, J. STROBEL, G.A., CLARDY, J. Three new chytochalasins produced by an endophytic fungus in the genus *Rhinochadiella*, **Journal Nat. Prod.** v.63, p.1629-1695, 2000.

WEBBER, J. A natural control of Dutch elm disease. **Nature**, v.292, p.449-451, 1981.

WHITE Jr, J.F.; MORROW, C.J.; MORGAN-JONES,G. Endophyte-host associations in forage grasses. XII. A fungal endophyte of *Trichachne insularis* belonging to *Pseudocercospora*. **Mycologia**, v.82, p.218-226. 1990.

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

WORAPONG, J.; STROBEL, G.A.; FORD, E.J.;LI, J.Y.; BAIRD, G.; HESS, W.M. *Muscodor albus* gen. et sp. nov. an endophyte from *Cinnamomum zeylanicum*. **Mycotaxon**, v.79, p.67-79, 2001.

ARTIGO

Manuscrito a ser encaminhado à Revista **Bioresource Technology**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR
DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE FOLHAS DE
Lonchocarpus guilleminianus (Tul) Malme (rabo-de-macaco).**

PINTO, L.D.^{1,2}; LIMA, G.M.S.¹; ARAÚJO, J.M.^{1,2}

¹ Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco, ² Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco. Cidade Universitária, 50670-901 Recife-PE, Brasil.

RESUMO

Fungos e bactérias foram isolados da superfície desinfetada de folhas de *Lonchocarpus guilleminianus* (Tul.) Malme (rabo-de-macaco). Os 36 microrganismos, isolados foram testados quanto à sua atividade antimicrobiana, dos quais 12 bactérias e 14 fungos endofíticos foram inativos. Apenas 10 fungos apresentaram atividade no ensaio em “Bloco de Gelose” para *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Candida* spp. (URM-720, URM-2224, URM-4224 e URM-4249 - isolados de imunodeprimidos) e *Aspergillus niger*. Da fermentação dos 10 fungos, o único que não apresentou atividade antimicrobiana, foi o RM-35 identificado como *Colletotrichum* sp. O fungo endofítico RM-23, identificado também como *Colletotrichum* sp., destacou-se com halo de 29mm de diâmetro para *Candida* sp. (URM-4249), com 24h de fermentação em meio MPE. Entre os fungos endofíticos *Colletotrichum* sp. analisados foi observado, através da técnica PCR-RAPD, uma grande variabilidade genética, gerando 2 grupos distintos com cerca de 20% de fragmentos comuns entre eles.

INTRODUÇÃO

São considerados microrganismos endofíticos bactérias e fungos que habitam pelo menos em um período do seu ciclo vital, o interior de plantas sem causar danos aparentes, colonizando rapidamente outras áreas da planta à medida que o tecido hospedeiro envelhece (Timothy et al., 1993; Bacilio-Jiménez et al., 2001).

Em geral, estes microrganismos vivem em associação com a planta podendo ajudar no seu desenvolvimento, proporcionando efeito benéfico através da sua presença nas raízes, folhas ou caule, como relatado por vários autores (Scott & Schardl, 1993; Hallmann , 1997; Herd et al., 1997).

Determinadas plantas apresentam propriedades medicinais que podem estar relacionadas com os metabólitos secundários produzidos pelos microrganismos endofíticos (Azevedo et al. 2002). Entre estes, destacam-se os fungos e os actinomicetos, devido à sua capacidade de produzir uma variedade de compostos biologicamente ativos, tais como antibióticos, antitumorais, enzimas, alcalóides e hormônios de crescimento (Lu et al., 2000; Brady et al., 2000; Li et al., 2001; Bacon & Hinton, 2002; Galvão 2001).

Atualmente, a utilização destes microrganismos como agentes antimicrobianos vem abrindo novas perspectivas no campo da biotecnologia. Lu et al. (2000) isolaram o fungo *Colletotrichum* sp. de *Artemisia annua* , erva medicinal chinesa, o qual exibiu grande atividade *in vitro* contra bactérias e fungos. Já Araújo et al. (2001) isolaram do interior de folhas

sadias de citrus, o fungo *Guignardia citricarpa*, capaz de inibir o crescimento de espécies de *Bacillus*. Galvão (2001) isolou e raízes de folhas de *Capraria biflora* L. 32 fungos dos quais 41% apresentaram atividade para diferentes espécies de *Candida*.

Investigações com microrganismos endofíticos de plantas medicinais constituem uma área de grande interesse biotecnológico, que visa a busca da biodiversidade microbiana e o seu potencial de utilização para produção de metabólitos bioativos.

Este trabalho tem como objetivo isolar bactérias e fungos endofíticos de folhas sadias de *Lonchocarpus guilleminianus* (Tul.) Malme (rabo-de-macaco) e selecionar microrganismos que apresentem atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras, além de analisar a variabilidade genética dos microrganismos isolados através da técnica de RAPD.

MATERIAIS E MÉTODOS

Desinfecção e Isolamento

Foram utilizadas 30 folhas saudáveis de *Lonchocarpus guilleminianus* (Tul.) Malme (rabo-de-macaco) coletadas em Surubim, Pernambuco (Janeiro/2002), e submetidas ao processo de desinfecção, segundo Pereira (1993).

As folhas desinfetadas foram fragmentadas (1cm²) e colocadas sobre diferentes meios de cultura. Para o isolamento de bactérias foram utilizados os meios Caseína-Amido-Agar (Küster & Williams, 1964); Ágar Nutritivo (AN)

à 5%; Czapeck; Arginina Glicerol Ágar e Água Ágar com cicloheximida na concentração de 50 µg/mL (Williams & Davies, 1965). Para o isolamento de fungos foram utilizados os meios Sabouraud Dextrose Ágar (SAB) e Batata Dextrose Ágar, com estreptomicina na concentração de 50 µg/mL. Todas as placas foram incubadas em BOD à 30°C durante 25 dias. Cada colônia isolada foi purificada por plaqueamento seguido do seu cultivo em tubos contendo os meios AN (bactérias) e SAB (fungos). Os isolados foram preservados em óleo mineral.

Ensaio primário em meio sólido

Os microrganismos endofíticos isolados foram submetidos aos ensaios antimicrobianos para determinar a atividade antimicrobiana em meio sólido, segundo a metodologia descrita por Ichikawa et al. (1971). Cada fungo foi cultivado em forma de “tapete” em placas de Petri com meio Sabouraud Dextrose Ágar, durante 7 dias, a 30°C; e em seguida, blocos de gelose de 6mm de diâmetro foram retirados para o ensaio antimicrobiano. As bactérias foram cultivadas em blocos de gelose em meio Ágar Nutritivo, por 24 horas, a 30°C, seguido de inativação com clorofórmio segundo Azevedo & Costa (1973). Em seguida, os blocos de cada bactéria e de cada fungo foram transferidos para placas de Petri contendo 10mL dos meios Ágar Nutritivo e Sabouraud Dextrose Ágar, inoculadas com os diferentes microrganismos-teste: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Sarcina lutea*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans* e *Candida* spp. (URM-720, URM-2224, URM-4224 e URM-4249 - isolados de pacientes imunodeprimidos). Após 24 horas foram realizadas

leituras dos halos de inibição. Foram considerados positivos halos com 10mm ou mais de diâmetro.

Ensaio secundário em meio líquido

Este ensaio tem por finalidade selecionar o meio líquido de fermentação e o tempo de maior produção do princípio ativo, determinando a atividade antimicrobiana através do ensaio de difusão em ágar. O pré-inóculo foi preparado em Erlenmeyer contendo 50mL de meio Sabouraud Dextrose líquido, previamente autoclavado a 121°C por 15 minutos e inoculado com uma suspensão de esporos contendo 10^7 - 10^8 UFC/mL seguido do cultivo sob agitação de 200rpm por 48 horas. Deste pré-inóculo foram retirados 5mL (10%) e adicionados a 50mL do meios líquidos M1(Lima & Albuquerque,1958), MPE (Hamada et al., 1974) e Sabouraud Dextrose líquido, e cultivados sob agitação de 200rpm durante 96 horas. A cada 24 horas foram retiradas alíquotas para realização do ensaio antimicrobiano, como descrito anteriormente.

Identificação dos microrganismos

As bactérias Gram-negativas foram identificadas usando o sistema de galerias API 20E (Biomérieux) segundo recomendações do fabricante. Os fungos foram identificados no Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco.

Extração do DNA total

O DNA dos fungos endofíticos que apresentaram atividade antimicrobiana foi extraído segundo a técnica descrita por Raeder & Broda

(1985). Suspensões de esporos dos fungos foram inoculadas em Erlenmeyer contendo 50mL de Sabouraud Dextrose líquido, previamente esterilizado à 121°C por 15 minutos e cultivados sob agitação de 200rpm, por 48 horas. Para extração do DNA, 0,5g do micélio foi macerado em nitrogênio líquido e incubado em 800µL de tampão de extração de DNA (1M Tris-HCl pH 8.0, 0,5M EDTA, 5M NaCl e SDS 10%) à 65°C, por 20 minutos. A suspensão foi desproteïnizada extraindo uma vez com fenol/clorofane/clorofil, seguida da precipitação do DNA com 40µl de 3M NaCl e lavado com 800µl de etanol absoluto gelado. O precipitado foi coletado por centrifugação e, em seguida, o sedimento foi ressuspendido em tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA). Para determinar a concentração do DNA foi utilizado o DNA de fago λ em gel de agarose.

O DNA das bactérias foi extraído utilizando a metodologia de Gonçalves e Rosato (2000): na qual 5mL da cultura foi lavada em tampão TAS (50 mM Tris HCl pH 8, 50 mM EDTA, 150 mM NaCl) e ressuspendido no mesmo tampão. A suspensão foi tratada com proteinase K (150 µg/mL) e SDS 2% e incubada por 1 hora à 50°C. As proteínas foram removidas com fenol e fenol/clorofórmio e o DNA foi precipitado com etanol e ressuspendido em tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA). A concentração do DNA foi estimada por comparação com concentrações conhecidas de DNA do fago λ em gel de agarose.

Análise do RAPD

As reações de amplificação foram realizadas com um volume final de 25µL para cada linhagem. A mistura continha 3µL (50ng) de DNA, 1µL (100µM) dNTPs (Pharmacia), 1,5µL (50mM) MgCl₂, 14µL de água Milli Q, 0,4µL (5U/µL) *Taq* DNA polymerase (Gibco - Life Technologies), 2,5 µL tampão (100mM Tris-HCl pH 8.3, 500mM KCl e 15mM MgCl₂) e 3µL (5µM) do *primer*. Foram utilizados os seguintes *primers* (www.operon.com): OPQ4 (5'-AGTGCGCTGA- 3'), OPA9 (5'-GGGTAACGCC-3'), OPX17 (5'-GACACGGACC-3') e OPX19 (5'-TGGCAAGGCA-3'). Os controles negativos continham água ao invés de DNA. As condições da amplificação foram 1 x 94°C/ 3 min, 40 X (94°C/ 1 min, 37°C/ 1 min, 72°C/ 1 min). As amostras dos produtos RAPD foram submetidas à eletroforese em 1,2% de agarose com tampão TBE e a corrida eletroforética conduzida à 3V/cm. Os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados sobre luz UV usando câmara fotográfica Polaroid. As bandas de RAPD foram analisadas utilizando informação qualitativa (presença ou ausência de bandas). A matriz de similaridade foi gerada pelo programa NTSYS (Numerical Taxonomy System), pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group with Arithmetic Mean) utilizando o coeficiente de Jaccard (Sj) (Sneath & Sokal, 1973).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento e Caracterização dos Microrganismos Endofíticos

Das 30 folhas utilizadas (15 folhas jovens do ápice da planta e 15 folhas adultas da base da planta), foram isolados e purificados 36 microrganismos endofíticos (Figura 1). O processo de desinfestação utilizado

foi eficiente, pois, não foi observado o aparecimento de colônias de fungos ou bactérias no plaqueamento da última água da lavagem, como recomendado por McInroy & Kloepper (1995).

Das folhas jovens, foram isolados um total de 12 (33%) microrganismos, sendo nove (25%) fungos e três (8%) bactérias, enquanto das folhas adultas foram obtidos um total de 24 (66%) microrganismos, dos quais 15 (42%) eram fungos e nove (25%) foram bactérias (Figura 1). Estes resultados são similares àqueles encontrados por Fisher et al. (1986) os quais observaram na leguminosa *Ulex europaeus* maior frequência de fungos endofíticos à medida que aumentava a idade do tecido hospedeiro. A habilidade da bactéria estar dentro da planta sem causar doença, foi primeiro documentado por Holles (1951) que isolou de tubérculo de batata 14 bactérias de diferentes grupos morfológicos.

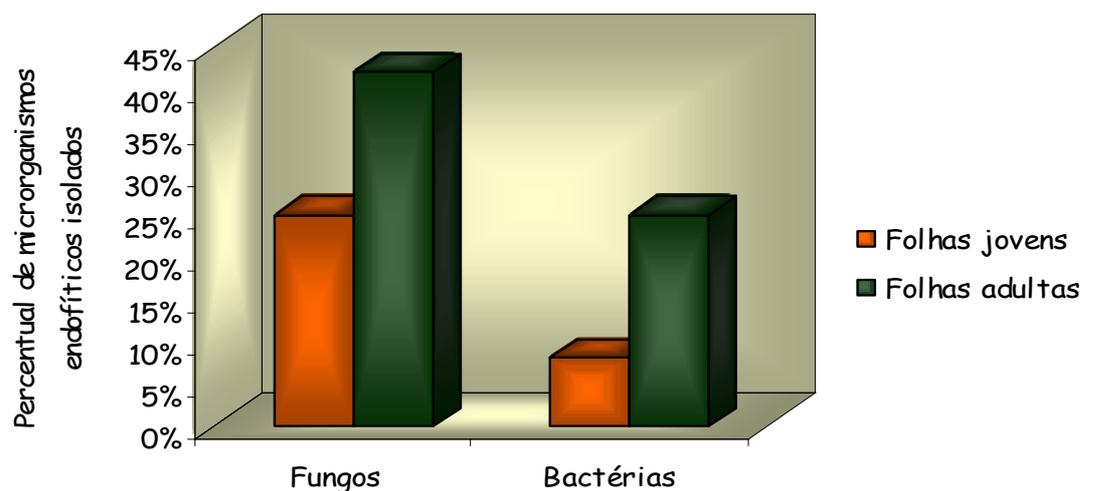


Figura 5. Percentual de microrganismos endofíticos isolados de folhas jovens e adultas de *Lonchocarpus guilleminianus* (Tul.) Malme (rabo-de-macaco).

Atualmente, inúmeros trabalhos mostram a presença de bactérias e fungos endofíticos em várias plantas medicinais e culturas de interesse agrônomo. Araújo et al. (2001), isolaram de folhas de citrus 36 bactérias, predominando *Alcaligenes* sp., *Bacillus* sp., *Burkholderia cepacia*, enquanto Galvão (2001) isolou de *Capraria biflora* L., uma planta medicinal do nordeste brasileiro, 13 bactérias, sendo cinco isoladas de folhas e oito de raiz. Estes resultados confirmam mais uma vez que a associação microrganismos endofíticos-planta é um fenômeno generalizado, sendo os endofíticos simbióticos facultativos que podem crescer *in vitro*, a partir de órgãos vegetais desinfetados (Sieber , 1988).

As 12 bactérias endofíticas, três Gram-positivas e nove Gram-negativas, isoladas das folhas não apresentaram atividade antimicrobiana no ensaio primário em meio sólido para os microrganismos-testes utilizados. Estes resultados são similares aos obtidos por Galvão (2002), com *Capraria biflora* L., que isolou bactérias não portadoras de atividade antimicrobiana e fungos com atividade antimicrobiana.

Neste ensaio primário, os fungos endofíticos RM-13 e RM-15 apresentaram, respectivamente, halo de inibição de 25 e 17mm para *Candida* sp. (URM-4249), enquanto RM-14 e RM-19 mostraram halos com diâmetro entre 10 mm e 13 mm para *S. aureus*, *B. subtilis* e *E. coli* (Figura 2).

As fermentações dos 10 fungos endofíticos nos meios M1 e SAB não mostraram liberação de substâncias com atividade antimicrobiana, enquanto o meio MPE se destacou como o melhor para a produção de metabólitos

bioativos para nove destes fungos. O meio de cultura e o tempo de fermentação influenciam a produção de metabólitos secundários por microrganismos, como enfatizado por Mukhopadhyay et al. (1996).

Os fungos endofíticos RM-8, RM-22, RM-23 e RM-35 foram identificados como *Colletotrichum* spp., sendo que o fungo RM-35 não apresentou atividade. A fermentação no meio MPE das linhagens RM-8, RM-22 e RM-30 (*Penicillium* sp.), além do isolado RM-21 (não identificado) apresentaram halo de inibição menor que 10 mm para bactérias Gram-positivas e *Candida* spp. O endofítico *Colletotrichum* sp. RM-23 e o isolado RM-14 (não identificado) apresentaram os melhores halos de inibição com 24 horas de fermentação (Figura 3).

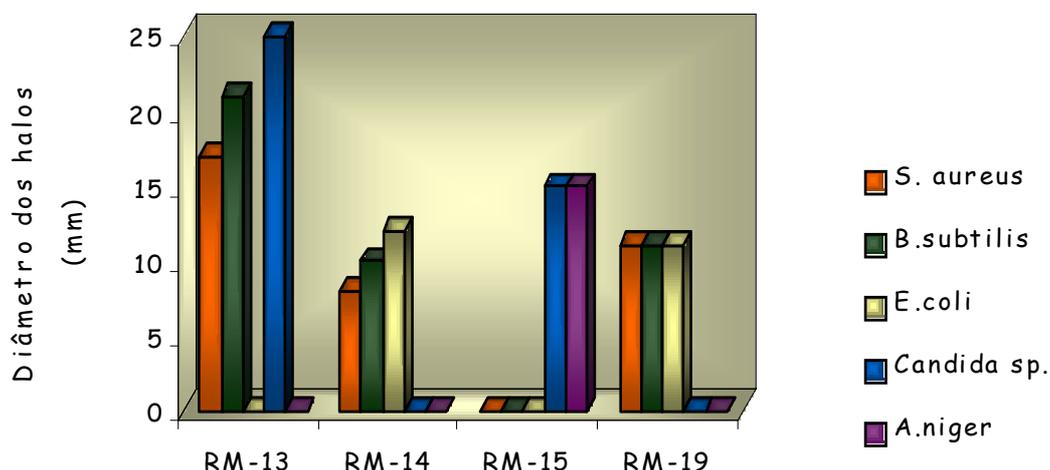


Figura 2. Diâmetro dos halos de inibição (mm) dos fungos endofíticos RM-13; RM-14; RM-15 e RM-19 no ensaio em bloco de gelose contra vários microrganismos-teste.

Nas condições de fermentação utilizadas *Colletotrichum* sp. RM-23 destacou-se com halos de inibição de 28mm para *Candida* spp. (URM 2224 e URM 4224) e de 29mm para *Candida* sp. (URM 4249) com 24h de fermentação, diminuindo esta atividade ao longo do tempo, como pode ser observado na figura 4.

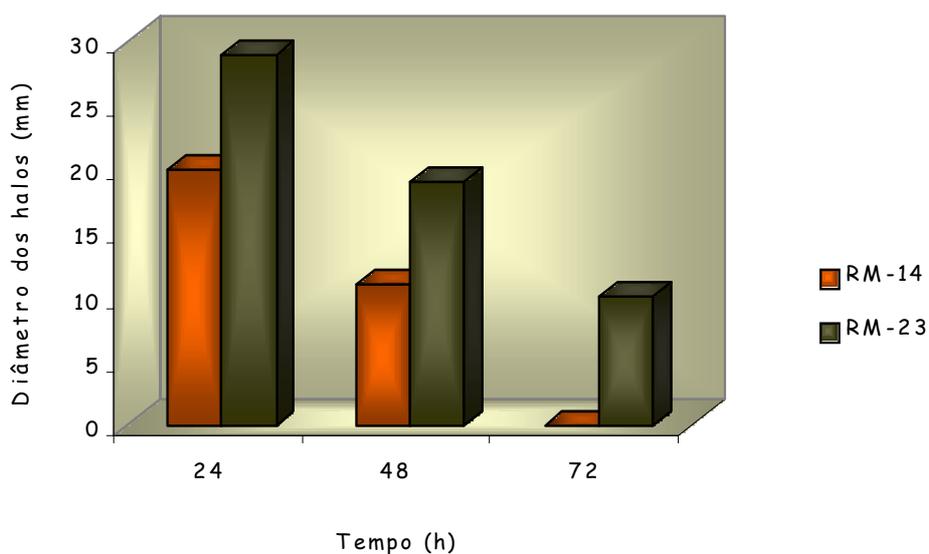


Figura 3. Diâmetro dos halos de inibição (mm) dos fungos endofíticos RM-14 e de *Colletotrichum* sp. RM-23 para *Candida* sp. (URM 4249), durante a fermentação em meio MPE.

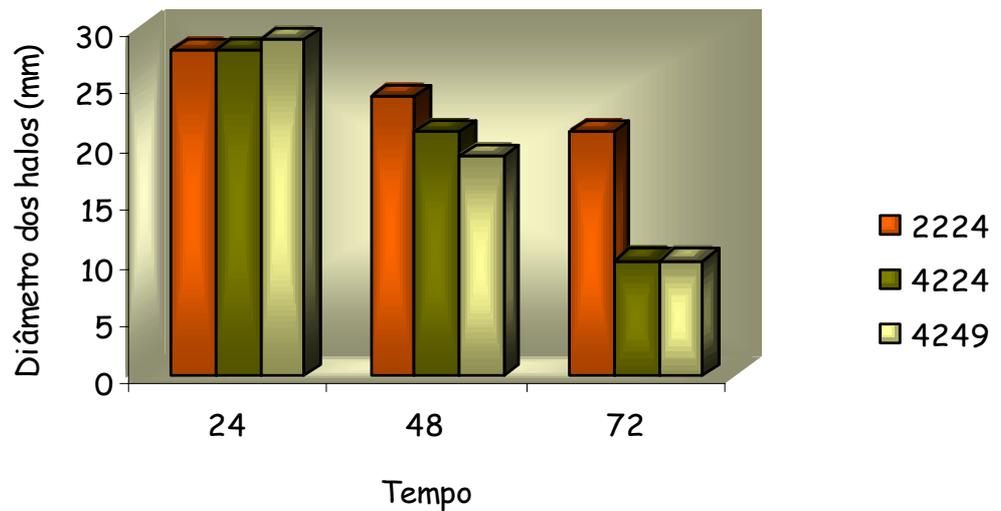


Figura 4. Diâmetro dos halos de inibição (mm) de *Colletotrichum* sp. RM-23 para *Candida* spp. (URM 2224, URM 4224 e URM 4249), durante a fermentação em meio MPE.

Azevedo et al. (2002) relatam que alguns gêneros de microrganismos são encontrados com maior frequência nas mais diversas plantas, destacando-se entre estes o gênero *Colletotrichum*. Lu et al. (2000) isolaram da *Artemisia annua* o fungo *Colletotrichum* sp. com capacidade de produzir compostos bioativos. Araújo et al. (2002) também isolaram o fungo *Colletotrichum gloesporioides* de raízes de citrus. Os nossos resultados corroboram com os obtidos por Huang et al. (2001), os quais isolaram de três plantas medicinais da China, *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* e *Torreya grandis*, fungos endofíticos com atividade antifúngica.

Fungos endofíticos bioativos apresentam uma grande importância biotecnológica e ecológica, uma vez que, o fungo produzindo o composto bioativo diminui a devastação da floresta minimizando o impacto ambiental.

Para a análise de RAPD dos quatro fungos endofíticos pertencentes ao gênero *Colletotrichum* sp. foram testados oito *primers* para acessar a diversidade genética entre os microrganismos. Destes, apenas quatro geraram um total de 48 bandas, todas polimórficas. Os fragmentos gerados variaram de 0,27 a 2,8 Kb, observando-se o maior número de bandas com o *primer* OPX-19, que produziu 14 bandas.

A construção do dendrograma baseada na amplificação dos fragmentos pode ser observada na figura 5. Foi possível observar dois grupos distintos com cerca de 20% de fragmentos comuns entre eles. O primeiro grupo é formado pelas linhagens de *Colletotrichum* spp. RM-8, RM-22 e RM-35, sendo evidenciado um grau de similaridade de 35% entre as linhagens RM-22 e RM-35 e 30% para a linhagem RM-8. O segundo grupo é formado por uma única linhagem, *Colletotrichum* sp RM-23, com 20% de similaridade com o grupo 1.

Apesar do coeficiente de similaridade não ser tão próximo entre as quatro linhagens de *Colletotrichum* spp. estudadas, este fato pode ser explicado pela existência de uma alta variabilidade genética entre elas. O uso de marcadores RAPD tem sido muito utilizado na identificação taxonômica do gênero *Colletotrichum*. Vasconcelos et al. (1994) diferenciaram isolados de *C. truncatum* causadores de antracnose em soja.

O mesmo foi evidenciado por Guthrie et al. (1992) que verificaram a variabilidade das linhagens de *C. graminicola* na antracnose do sorgo.

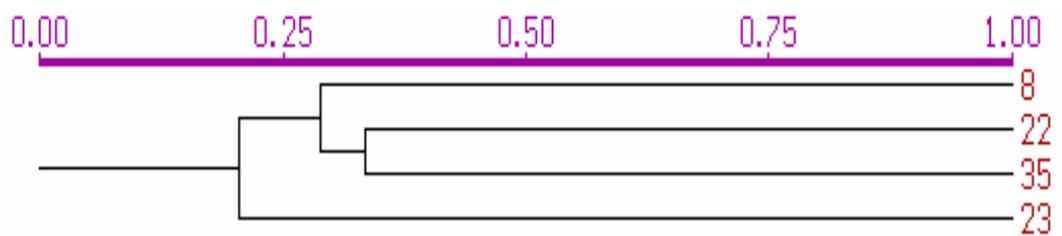


Figura 5. Dendrograma construído pelo coeficiente de Jaccard (J) e pelo agrupamento UPGMA, através dos perfis de RAPD obtidos dos 4 fungos endofíticos do gênero *Colletotrichum* sp. com os *primers* OPQ4; OPX17, OPX19 e OPA9.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI, W. ; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, P.A.V.; SARIDAKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. Variability and Interaction between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p.229-236, 2001.

AZEVEDO, J.L.; COSTA, S.O.P. **Exercícios práticos de genética**. 3ª ed. São Paulo: Ed. Nacional, Ed. da Universidade de São Paulo, p.186-188,1973.

AZEVEDO. J.L.; MACCHERONI Jr., W.; PEREIRA, J.O.; ARAÚJO, W.L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **EJB: Eletronic Journal of Biotechnology [on line]**, 3, <http://www.ejb.org/content/vol3/issue1/full/3/4.2000>.

BRADY, S.F.; SINGH, M.P.; JASON, J.E.; CLARDY, J. Cytoskyrins A and B, new BIA active bisanthraquinones isolated from an endophytic fungus. **Organic Letters**, v.2, p.4047-4049, 2000.

DUARTE, M.S. Caracterização de bactérias produtoras de ramnolipídeos isoladas de poços de petróleo. Universidade Federal de Pernambuco. Tese (mestrado), Recife, Pernambuco, Brasil, 44p., 2003.

FISHER, P.J.; ANSON, A.E.; PETRINI, O. Fungal endophytes in *Ulex europaeus* and *Ulex gallii*. **Transactions British Mycological Society**, v.86, p.153-193, 1986.

GALVÃO, K.D. Isolamento e atividade antifúngica de microrganismos isolados de folhas e raízes de *Capraria biflora L.* (Schrophulariaceae). Universidade Federal de Pernambuco. Tese (mestrado), Recife, Pernambuco, Brasil, 87p., 2002.

GONÇALVES, E.R.; ROSATO, Y.B. Genotypic characterization of xanthomonad strain isolated from passion fruit plants (*Passiflora spp*) and their relatedness to different *Xanthomonas* species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 811-821, 2000.

GUTHRIE, P. A.I.; MAGILL, C.W.; FREDERIKSEN, R.A.; ODVODY, G.N. Random amplified polymorphic DNA markers: a system for identifying and differentiating isolates of *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, v.82, p. 832-835, 1992.

HAMADA, M.; KONDO, S.; YOKOYAMA, T.; MIURA, K.; IINUMA, K.; YAMAMOTO, H.; MAEDA, H.; TAKEUCHI, T.; UMEZAWA, H.

Minosaminomycin, a new antibiotic containing myo-inosamina. **The Journal of Antibiotics**, v.27, p.81-83, 1974.

HERD, S.; CHRISTENSEN, M.J.; SAUNDERS, K.; SCOTT, D.B.; SCHMID, J. Quantitative assessment of in planta distribution of metabolic activity and gene expression of an endophytic fungus. **Microbiology**, v.143, p.267-275, 1997.

HOLLIS, J.P. Bacteria in healthy potato tissue. **Phytopathology**, v.41, p.350-367, 1951.

ICHIKAWA, T.; ISHIKURA, T.; OZAKI, A. Improvement of Kasugamycin - producing strain by the agar piece method and the prototroph method. **Folia Microbiologica**, v.16, p.218-224, 1971.

KUSTER, E.; WILLIAMS, S.T. Selection of media for isolation of *Streptomyces*. **Nature**, v.202, p.928-929, 1964.

LI, J.Y.; HARPER, J.K.; GRANT, D.M.; TOMBE, B.O.; BASHYAL, B.; HESS, W.M.; STROBEL, G.A. Ambuic acid, a highly functionalized cyclohexenone with antifungal activity from *Pestalotiopsis* spp. and *Monochaetia* sp.. **Phytochemical**, v.56, p.463-468, 2001.

LIMA, O.G.; ALBUQUERQUE, I.L. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v.I, no.I, p.7, Janeiro, 1958.

LU, H.; ZOU, W.X.; MENG, J.C.; HU, J., TANG, R.X. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. **Plant Science**. v. 151, p.67-73, 2000.

McINROY, J.A.; KLOPPER, J.W. Population dynamics of endophytic bacteria in field-grown sweet corn and cotton. **Canadian Journal Microbiology**, v.41, p.895-901, 1995.

MUKHOPADHYAY, K; GARRISON, N.K.; HINTON, D.M.; BACON, C.W.; KHUSH, G.S.; PECK, H.D.; DATTA, N. Identification and characterization of bacterial endophytes of rice. **Mycopathology**, v.134, p.151-159, 1996.

PEREIRA, J.O. **Fungos endofíticos dos hospedeiros tropicais *Stylosanthes guianensis* e *Musa cavendish***. Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Tese (doutorado). Piracicaba, São Paulo, Brasil, 105p. 1993.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, v.1, p.17-20, 1985.

SIEBER, T.N. Endophytische Pilze in Nadeln von gesunden un geschädigten Fichten (*Picea abies* (L.) Karst.). **European Journal Forest Pathology**, v.18, p.321-342, 1988.

SNEATH, P.H.; SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy**. San Francisco: W.H. Freeman and Company, 573p., 1973.

SPRENT, J.I., JAMES, E.K. N- fixation by endophytic bacteria: questions of entry and operation. In: FENDRIK; M. DEL GALLO; J.VANDERLEYDEN; M. DE ZAMAROCZY, ed. *Azospirillum VII and related microorganisms*. Berlin: Springer-Verlag, p.15-29 (NATO ASI Series, 37), 1995.

VASCONCELOS, M.J.V., MACHADO, M.A., ALMEIDA, A.M.R., HENNING, A.A., BARROS, G. & MOREIRA, M.A. Differentiation of collectotrichum truncatum isolates by random amplified polymorphic DNA. **Fitopatologia Brasileira**, v.19, p.520-530, 1994.

WILLIAMS, S.T.; DAVIES, F.L. Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycets in soil. **Journal of General Microbiology**. 38p., 1965.

ANEXO

As bactérias endofíticas isoladas de folhas jovens (três) e de folhas adultas (nove) da planta *Lonchocarpus guilleminianus* foram testadas quanto a sua atividade antimicrobiana, através do ensaio em “Bloco de Gelose”. Neste teste foi utilizado apenas o meio Tryptic Soy-Ágar (TSA), não sendo observado atividade antimicrobiana para os microrganismos testados: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Sarcina lutea*, *Aspergillus niger*, *Candida albicans* e *Candida* spp. (URM 720, URM 2224, URM 4224 e URM 4249 - isolados de pacientes imunodeprimidos). Outros meios sólidos e também meios líquidos precisarão ser testados afim de verificar se, em outras condições, genes biossintéticos poderão ser ativados para a produção de metabólitos com atividade para bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos leveduriformes e filamentosos.

As bactérias endofíticas isoladas apresentam uma grande diversidade genética, indicando o grande potencial das plantas medicinais para o estudo da diversidade bacteriana neste micro ambiente. A utilização de métodos genéticos mais sensíveis como RAPD, constitui uma estratégia importante para o diagnóstico molecular de diferentes níveis taxonômicos como enfatizado por Fungaro & Vieira (1998).

As nove bactérias endofíticas Gram-negativas foram analisadas através da técnica RAPD. Apenas os *primers* OPA-9, OPX-17 e OPQ-4 foram capazes de produzir bandas bem definidas facilitando a visualização do polimorfismo entre as linhagens.

Os três *primers* geraram um total de 32 bandas, das quais 26 (81,25%) foram polimórficas e cinco (18,5%) monomórficas. Os fragmentos gerados variaram de 0,34 a 2,036Kb. O maior número de bandas foi obtido com *primer* OPA-9, que produziu 11 bandas, das quais três foram monomórficas, enquanto o *primer* OPX-17 gerou o maior polimorfismo. Dentre as 10 bandas testadas, nove foram polimórficas, sendo portanto um *primer* útil para detecção da diversidade genética destas bactérias

A análise dos fenótipos moleculares gerados por RAPD permitiu a construção do dendrograma (Figura 6). Quatro grupos foram formados; o primeiro compreende as linhagens RM-1 e RM-2 com 72% de similaridade e RM-4 com 60%. Neste grupo apenas RM-1 foi identificada como *Flavimonas* sp, enquanto as outras duas linhagens não foi possível realizar identificação taxonômica a nível de gênero. O segundo grupo inclui as linhagens RM-3 e RM-33 com 65% de similaridade e ambas pertencem à mesma espécie, *Pseudomonas aeruginosa*. O terceiro grupo contém as bactérias endofíticas RM-5 e RM-6 com 56% de similaridade e o quarto grupo com 45% de similaridade para as linhagens RM-31 e RM-32.

No terceiro e quarto grupo, os isolados RM-5 e RM-31, foram identificadas com *Flavimonas* spp. através do sistema de galerias API 20E (Biomérieux). Ainda não foi possível concluir a taxonomia dos isolados RM-2, RM-4, RM-6 e RM-32.

A detecção da diversidade genética utilizando as bandas geradas por RAPD tem sido utilizada em diversos grupos de bactérias, fungos fitopatogênicos e microrganismos de importância médica. Duarte (2003)

estudou a diversidade genética de linhagens de *P. aeruginosa* através da análise de RAPD, a qual foi capaz de demonstrar um alto nível de polimorfismo formando 3 grupos com nível de similaridade de 50%.

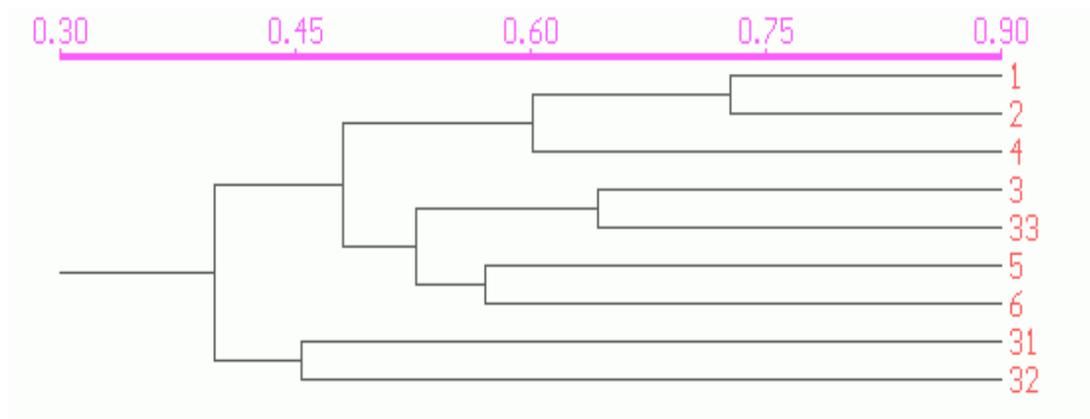


Figura 6. Dendrograma construído pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard (J) a partir dos perfis de RAPD obtidos de nove bactérias endofíticas com os *primers* OPQ-04, OPX-17 e OPA-09.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- Foram isolados 36 microrganismos endofíticos de folhas de *Lonchocarpus guilleminianus* (Tul.) Malme (rabo-de-macaco), sendo nove fungos e três bactérias de folhas jovens, enquanto, de folhas adultas, foram obtidos 15 fungos e nove bactérias.
- Dos 24 fungos endofíticos isolados, dez apresentaram atividade no ensaio em “Bloco de Gelose”, para *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Candida* spp. (isoladas de pacientes imunodeprimidos) e *Aspergillus niger*.
- O meio de fermentação MPE foi o melhor para os nove fungos endofíticos que apresentaram atividade antimicrobiana. Os isolados RM-8, RM-21, RM-22 e RM-30 apresentaram halo de inibição inferior a 10 mm.
- O fungo endofítico RM-13 apresentou maior halo de inibição (25mm) para *Candida* sp. (URM 4249) no ensaio em “Bloco de Gelose”, enquanto a linhagem RM-23 exibiu maior halo de inibição (29mm) para *Candida* sp. (URM 4249), com 24h de fermentação em meio MPE.
- A técnica PCR-RAPD utilizada foi capaz de detectar uma grande variabilidade genética entre os fungos endofíticos do gênero

Colletotrichum spp. RM-8, RM-22, RM-23 e RM-35, gerando 2 grupos distintos com cerca de 20% de fragmentos comuns entre eles.

- A análise dos perfis de RAPD das nove bactérias endofíticas Gram-negativas mostrou 81,25% de bandas polimórficas e 18,5% monomórficas.
- Dos 10 fungos endofíticos bioativos em “Bloco de Gelose” apenas cinco foram identificados taxonomicamente: RM-8, RM-22, RM-23 e RM-35 pertencem ao gênero *Colletotrichum* e o RM-30, *Penicillium* sp.
- Das 12 bactérias endofíticas isoladas, apenas cinco bactérias Gram-negativas foram identificadas taxonomicamente: RM-1, RM-5 e RM-31 como *Flavimonas* spp., enquanto RM-3 e RM-33 como *Pseudomonas aeruginosa*.