



Universidade Estadual de Londrina

PROJETO DE PESQUISA

**BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS COM ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA**

Prof. Dra. GISELE MARIA DE ANDRADE NÓBREGA – *Coordenadora*

Prof. Dra. ELISETE PAINS RODRIGUES – *Colaboradora*

Prof. Dra. LUZIA DORETTO PACCOLA MEIRELLES – *Colaboradora*

PARTE CIENTÍFICA

1. TÍTULO:

Bioprospecção de Microrganismos Endofíticos com atividade antimicrobiana

2. EQUIPE DE TRABALHO:

Prof. Dra. Gisele Maria de Andrade Nóbrega – Coordenadora

Plano de atividades: Coletas de material biológico, análises morfológicas, fisiológicas e moleculares, confecção de artigos e material para congressos.

Prof. Dra. Elisete Pains Rodrigues – Colaboradora

Plano de atividades: Coletas de material biológico, análises morfológicas, fisiológicas e moleculares, confecção de artigos e material para congressos.

Prof. Dra. Luzia Doretto Paccola Meirelles – Colaboradora

Plano de atividades: Análises morfológicas e fisiológicas, confecção de artigos e material para congressos.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICO-METODOLÓGICA

A procura e descoberta de um fenômeno biológico que possa ser explorado é o passo inicial em um projeto biotecnológico, no entanto tão crucial quanto qualquer outra etapa neste processo (Bull et al., 1992). A biotecnologia é baseada na busca e descoberta de recursos biológicos industrialmente exploráveis. Uma abordagem clássica das etapas do processo de busca e descoberta biotecnológica passa resumidamente pela coleta de material biológico adequado, seguida da seleção e triagem de materiais com os atributos desejados, seleção final do(s) melhor(es) candidato(s) a partir de uma lista reduzida de opções, e culmina com o desenvolvimento de um produto comercial ou processo industrial (Bull et al, 2000). Um dos estágios iniciais de um projeto de biotecnologia é conhecido como bioprospecção, sendo finalizado uma vez que o composto, organismo ou característica

desejável tenha sido encontrado. O termo bioprospecção foi inicialmente definido em 1993 como a “exploração da biodiversidade por fontes genéticas ou bioquímicas de valor comercial”. Durante os últimos 10 anos esta definição foi revisada sendo geralmente aceita como “a busca de fontes biológicas com características que podem ter valor para o desenvolvimento comercial”. Estas características podem ser morfológicas, fisiológicas, genéticas ou bioquímicas de potencial aplicabilidade comercial, as quais foram produzidas por organismos biológicos, seja fungo, bactéria, planta ou animal.

A utilização de microrganismos no desenvolvimento de novos produtos e processos biotecnológicos vem se destacando recentemente. Segundo Canhos & Manfio (1998), grande parte dos avanços da biotecnologia moderna são derivados das descobertas recentes nas áreas de genética, fisiologia e metabolismo de microrganismos. Há muitos anos a diversidade genética e metabólica dos microrganismos tem sido explorada para utilização nos diversos segmentos da indústria, incluindo a produção e processamento de alimentos (cogumelos, queijo, iogurte, vinagre, *etc.*), produção de bebidas alcoólicas (vinho, cerveja, *etc.*), vacinas, geração de combustível (etanol), tratamento e/ou remediação de resíduos (esgotos domésticos, lixo), entre outras aplicações (Colwell, 1997; Hunter-Cevera, 1998). Uma aplicação biotecnológica de relevante importância para a agroindústria e para a indústria farmacêutica é a produção de metabólitos naturais derivados de microrganismos que apresentam atividade biológica diversa como antiparasitídeos, antimicrobianos, antivirais, inseticidas, entre outras.

Produtos naturais bioativos são compostos produzidos pelo metabolismo secundário das plantas, microrganismos ou animais. Embora os metabólitos

secundários não estejam diretamente envolvidos nas funções básicas necessárias para a vida dos organismos produtores, eles conferem algumas características essenciais para sobrevivência e perpetuação de espécie no ecossistema (Santos, 2001). Os metabólitos secundários são específicos das espécies e contribuem, entre outras coisas, para a proteção do organismo conferindo resistência contra pragas, animais herbívoros e contra doenças causadas por patógenos (Braz-Filho, 2010).

As plantas superiores constituem uma das fontes mais importantes de produtos naturais, contribuindo de modo significativo para o fornecimento de novos metabólitos secundários, muitos destes de grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos (Braz-Filho, 2010, Pinto et al., 2002).

Além das plantas, os microrganismos representam uma fonte rica e diversa de produtos naturais bioativos. Assim como as plantas, os microrganismos contribuem com uma variedade de metabólitos biologicamente ativos que podem ser empregados não só como medicamentos (como por exemplo, os compostos com atividade antimicrobiana) como também como agentes agroquímicos naturais (Gunatilaka, 2006; Pinto, 2002; Strobel, 2003).

Entre os microrganismos de maior importância como fonte de produtos naturais destacam-se as actinobactérias e os fungos. Ambos são considerados os produtores mais ativos de metabólitos secundários. Conforme reportado por Qin (2011), dos 22.000 compostos biologicamente ativos obtidos de microrganismos até 2002, 45% foram produzidos por actinobactérias, especialmente por representantes do gênero *Streptomyces*, um excelente produtor de compostos bioativos (Qin, 2011; Bérdy, 2005).

Apesar da importância dos microrganismos, somente uma pequena parte da enorme diversidade de espécies de microrganismos existentes na Terra é atualmente conhecida. Estima-se que menos que 5% das espécies de fungos e menos que 1% das espécies de bactérias seja conhecida (Young, 1997). Considerando que a diversidade de microrganismos ainda desconhecidos é grande, os microrganismos podem representar uma fonte promissora de produtos naturais que ainda esperam para ser descobertos. Deste modo, a busca por microrganismos em habitat ainda inexplorados podem contribuir não só para o conhecimento da diversidade microbiana nestes habitat como também permitir a descoberta de novos produtos de interesse biotecnológico.

Tem sido cada vez mais enfatizado que os tecidos vegetais representam um habitat potencial, e ainda pouco explorado, de microrganismos produtores de compostos bioativos. O interior das plantas encontra-se naturalmente colonizado por grupo em especial de microrganismos, conhecido como endofíticos, os quais vivem em íntima interação com a planta hospedeira e, ao contrário dos microrganismos fitopatogênicos, habitam o interior das plantas sem causar sintomas aparentes de doença (Azevedo, 1998).

Os microrganismos endofíticos podem ser encontrados em diferentes órgãos e tecidos vegetais como as folhas, ramos, raízes, frutos, sementes e flores, sendo a comunidade microbiana endofítica representada, principalmente, por diferentes espécies de fungos e bactérias (Azevedo, 1998). Deste modo, os endófitos diferem dos epifíticos, microrganismos que vivem na superfície das plantas, bem como dos microrganismos fitopatogênicos, que causam sintomas de doenças aos seus hospedeiros (Azevedo, 1998). E, diferentemente dos microrganismos simbióticos, a

colonização das plantas pelo endófito não forma estruturas visíveis no hospedeiro, como é comumente observada pela formação de nódulos em raízes colonizadas por bactérias fixadoras de nitrogênio conhecidas coletivamente como rizóbios (Azevedo, 1998).

Os endófitos estabelecem com a planta hospedeira uma interação mutualística, onde a planta protege e alimenta o microrganismo endofítico que, em troca, melhoram o crescimento e a competitividade da planta hospedeira, protegem-na contra estresses bióticos como o ataque de herbívoros e pragas e de fitopatógenos causadores de doenças infecciosas e, ainda, fornecem a elas maior resistência ao estresse abiótico, como elevadas temperaturas e radiação (Azevedo, 1998; Azevedo et al., 2000).

Além de exercerem funções importantes para a sobrevivência do hospedeiro, atualmente, sabe-se que os endófitos podem produzir metabólitos bioativos como toxinas, antibióticos e outros compostos de potencial interesse biotecnológico (Azevedo, 1998).

Os microrganismos endofíticos são produtores hábeis de diversos compostos bioativos, em sua maioria produtos naturais com atividade antimicrobiana (Gunatilaka, 2006). A produção destes compostos confere aos endofíticos as habilidades necessárias à sobrevivência no ambiente sendo, deste modo, essencial em um ambiente como a planta onde diversos microrganismos coexistem e competem pelos nutrientes e por espaço. Por outro lado, a síntese de compostos antimicrobianos dentro da planta beneficia a planta hospedeira, pois permite a ela resistir ao estresse biótico causado pelos fitopatógenos, como as doenças infecciosas causadas por fungos, bactérias e outros microrganismos (Azevedo, 1998, Gunatilaka, 2006).

Um grande fato que despertou o interesse pelos microrganismos endofíticos como fonte de compostos bioativos foi a descoberta de que fungos endofíticos produzem compostos bioativos que são reconhecidamente produtos naturais produzidos pelas suas plantas hospedeiras, os fitoquímicos (Strobel et al., 2004). O paclitaxel (Taxol®), um importante diterpenóide com atividade antimitótica utilizado contra câncer de ovário e de mama, bem como no tratamento de inúmeras doenças proliferativas de humanos, foi originalmente isolado da planta *Taxus brevifolia*, porém, estudos posteriores levaram a descoberta de que a síntese deste composto não era restrita ao metabolismo secundário dos vegetais. A síntese de paclitaxel foi reportada no endofítico de *T. brevifolia*, o fungo *Taxomyces andreanae* (Stierly, 1993) e, posteriormente, em diversos outros endofíticos isolados de uma ampla variedade de plantas não produtoras de paclitaxel, indicando que a capacidade de produção deste composto, em particular, é mais disseminada em fungos do que em plantas (Aly et al., 2010, Strobel et al., 2004). A razão para esta ampla distribuição de paclitaxel tem sido relacionada ao fato de que este composto possui também atividade antifúngica, especialmente contra *Pythium* spp. e *Phytophthora* spp., alguns dos mais importantes fitopatógenos e também, fortes competidores com os fungos endofíticos pelo habitat dentro das plantas (Strobel et al., 2004).

Além do paclitaxel, estudos têm reportado que vários outros compostos, tais como camptotecina (antitumoral) e podofilotoxina (antimitótica), os quais foram originalmente isolados de plantas, são também produzidos por seus endófitos (Aly et al., 2010) demonstrando que esta correspondência entre o metabolismo secundário da planta e de seus endófitos pode ser bastante comum. Conforme Tan & Zou (2001), a capacidade de sintetizar certos compostos fitoquímicos pode estar relacionada à

recombinação genética do endófito com o hospedeiro, ocorrida ao longo do processo de co-evolução destes dois organismos.

Deste modo, estes microrganismos representam um fornecedor alternativo de compostos fitoquímicos característicos das plantas (Strobel & Daisy, 2003; Strobel et al., 2004). Além disso, os microrganismos endofíticos representam uma reserva enorme e inexplorada de estruturas químicas únicas que foram modificadas durante a evolução e que são produzidas para a comunicação planta-endófito e em resposta as alterações em seus habitats (Gunatilaka, 2006). Assim, é grande a oportunidade de encontrar novos metabólitos secundários com atividades biológicas relevantes de microrganismos endofíticos (Gunatilaka, 2006).

Em princípio, estes microrganismos combinam a riqueza bioquímica da planta com a conveniente acessibilidade e a capacidade fermentativa dos microrganismos o que torna mais simples o processo de obtenção de compostos de interesse biotecnológico. Além desta e outras conveniências, o uso de microrganismos endofíticos como fonte de compostos bioativos deverá não somente reduzir a necessidade de coletar plantas de crescimento lento e possivelmente raras, mas também auxiliar na preservação da biodiversidade do ambiente natural (Strobel et al., 2004).

Considerando que existam aproximadamente 300.000 espécies de plantas superiores e que uma planta individual é colonizada por um ou mais endófitos a oportunidade de se descobrir novos e interessantes microrganismos endofíticos é muito grande (Strobel & Daisy, 2003; Strobel et al., 2004). Assim, os microrganismos endofíticos representam uma fonte potencial e ainda inexplorada de novos produtos naturais bioativos com atividade biológica relevante (Strobel et al., 2004)

Contudo, a diversidade de espécies de endófitos existentes e o potencial dos mesmos na produção de compostos bioativos ainda são poucos conhecidos. Alguns estudos onde estes compostos bioativos produzidos por endofíticos têm sido isolados e identificados, revelam a grande diversidade de compostos produzidos e o potencial destes para diferentes aplicações biotecnológicas. Conforme reportado por Gunatilaka et al. (2006) os compostos biológicos produzidos por microrganismos endofíticos possuem ampla variedades de atividades biológicas, sendo bastante comum a atividade antimicrobiana, mostrando que a produção de compostos antimicrobianos é bastante difundida entre os diferentes grupos de microrganismos endofíticos.

Alguns estudos que evidenciam a atividade antimicrobiana de microrganismos endofíticos isolados de diversas espécies vegetais e o potencial destes microrganismos na produção de compostos bioativos são citados a seguir.

Na planta herbácea medicinal *Orthosiphon stamineus* (Lamiaceae), conhecida como chá de Java, 92% dos isolados de fungos endofíticos exibiram atividade inibitória significativa contra diferentes espécies bacterianas e contra leveduras e fungos filamentosos (Tong, 2011).

Em espécies de *Dendrobium sp.* (Orchidaceae) foram isolados de raízes e colmos 53 fungos endofíticos, sendo o mais comum o gênero *Fusarium sp.* O extrato etanólico destes isolados foi ativo contra pelo menos um dos patógenos testados (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*), destacando-se o fungo endofítico *Epicoccum nigrum* que apresentou atividade antibacteriana mais intensa que o antibiótico ampicilina e o fungo *Fusarium sp.*, efetivo tanto contra bactérias quanto contra fungos patogênicos (Xing et al., 2011).

Smallanthus sonchifolius (yacón) é uma planta perene com raízes tuberosas originária dos Andes conhecida pelas suas propriedades fungicida, bactericida, antioxidante e hipoglicêmica. O extrato de dois fungos endofíticos, *Papulaspora immersa* e *Apiospora montagnei* Sacc. (estado *Arthrinium*), que foram isolados das raízes, apresentaram atividade antibacteriana frente *Staphylococcus aureus*, *Kocuria rhizophila*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, sendo o extrato em acetato de etila o que apresentou maior atividade antimicrobiana (Ramos et al., 2010).

Em *Camptotheca acuminata*, conhecida como a árvore da vida, foram isolados 26 fungos endofíticos, incluindo os taxos *Nigrospora*, *Diaporthe*, *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Pestalotiopsis*, *Sordariomycete*, *Guignardia*, *Penicillium* e *Zythia*. A maioria dos isolados exibiu atividade antifúngica e 50% apresentou atividade antibacteriana, alguns de amplo espectro (Ding et al., 2010).

A atividade antimicrobiana dos microrganismos endofíticos é resultante da produção de uma grande variedade de compostos de estrutura química bastante diversa. Conforme reportado por Gunatilaka (2006) estes microrganismos representam uma reserva enorme de estruturas químicas únicas e que, portanto, são de grande interesse para o desenvolvimento biotecnológico.

Em *Pestalotiopsis microspora*, um fungo isolado da planta *Terminalia morobensis*, nativa da Nova Guiné, foram identificados dois compostos, pestacina e isopestacina, os quais possuem atividade antimicrobiana, bem como atividade antioxidante (Strobelet al., 2002; Strobel et al., 2003, Strobel et al., 2004).

O fungo endofítico *Acremonium zeae* encontrado nos grãos de milho (*Zea mays*) apresentou forte antagonismo aos fungos *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides*, ambos causadores do apodrecimento dos grãos e produtores de

micotoxinas, aflotoxina e fumonisina, respectivamente. A atividade antifúngica deste endófito deve-se a produção de dois novos antibióticos derivados de policetídeo, pirrocidinas A e B, as quais também foram ativas contra *Candida albicans* e bactérias gram-positivas, incluindo estirpes multiresistentes `a antibióticos (Wicklow et al., 2005; Wicklow & Poling, 2009).

Grande versatilidade na produção de metabólitos foi observada no fungo *Aspergillus fumigatus*, endofítico das folhas da forrageira *Cynodon dactylon* (Poaceae), que produziu dois novos metabólitos, asperfumoide e asperfumina, e outros compostos, fumigaclavina C, funitremorgina C, fisciona e ácido helvólico, os quais inibiram o crescimento de *C. albicans* (Liu et al., 2004).

No fungo endofítico *Muscodor albus* isolado de *Cinnamomum zeylanicum* (Lauracea) conhecida como pau-canella, uma mistura de compostos voláteis (alcoóis, ésters, cetonas, ácidos e lipídios) mostrou ação sinérgica contra uma ampla variedade de fungos e bactérias patogênicas de plantas e humanos (Strobel, 2001).

Outro grupo com grande capacidade de produção de produtos naturais bioativos são as bactérias filamentosas, os actinomicetos. Um dos principais gêneros deste grupo, o *Streptomyces* spp. é fonte de 80% dos antibióticos produzidos pelos actinomicetos (Strobel et al., 2004). Os actinomicetos habitam o solo e, como tem sido relatado em vários estudos, são encontrados também no habitat endofítico. O primeiro relato de que plantas serviam como habitat para os actinomicetos veio do isolamento de um *Streptomyces* spp. endofítico de uma espécie de gramínea, a *Lolium perenne* (Guerny & Mantle, 1993). Posteriormente, um outro *Streptomyces* sp. foi isolado de *Kennedia nigricans*, uma planta conhecida pelo seu uso tradicional por nativos australianos no tratamento de cortes, feridas e infecções. Este *Streptomyces*

produz uma família de potentes peptídeos com atividade antibiótica chamados de munumbicinas, os quais em geral foram ativos contra bactérias gram-positivas como *Bacillus anthracis* e contra *Mycobacterium tuberculosis* e também, apresentaram atividade contra o protozoário parasita *Plasmodium falciparum*, causador da doença infecciosa malária (Castillo et al., 2002).

Na planta epifítica *Monstera* sp., encontrada na região amazônica do Peru, foi isolado um *Streptomyces* verticilado com atividade inibitória à *Phytium* sp. e *Cryptococcus neoformans*, um fungo patogênico humano, bem como à *Plasmodium falciparum*. Estas atividades estão relacionadas à produção de coranomicina, um novo complexo de peptídeos antibióticos produzidos por estes actinomicetos.

Além dos fungos e actinomicetos, as bactérias endofíticas representam um grupo bastante ativo na produção de compostos bioativos. Um dos gêneros mais comuns de bactérias encontradas em associação com plantas é *Pseudomonas* spp. Este gênero possui espécies e estirpes que são epifíticas, endofíticas e também, patogênicas. Algumas destas espécies produzem compostos fitotóxicos assim como antibióticos. Um destes compostos, os peptídeos antifúngicos conhecidos como pseudomicinas são ativos contra uma variedade de fungos patogênicos de humanos, incluindo *C. albicans* e *C. neoformans*. As pseudomicinas têm sido consideradas para uso na agricultura para controle do fungo fitopatogênico *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal da doença sigatoka negra em bananas (Strobel et al., 2004).

Na planta medicinal chinesa *Scutellaria baicalensis* Georgi, um isolado de *Bacillus amyloliquefaciens* produziu duas famílias de compostos com atividade antibacteriana e atividade antifúngica de amplo espectro, ativos contra fungos e bactérias fitopatogênicos e contaminantes de alimentos. Dois compostos ativos,

identificados como homólogos de fengicina e surfactina, foram identificados demonstrando potencial para preservação de alimentos e no controle de doenças de plantas (Sun et al., 2006).

Estes estudos citados anteriormente assim como muitos outros que relatam o potencial de produção de compostos com atividade biológica diversa demonstra que é crescente o interesse por microrganismos endofíticos como fonte de compostos bioativos. Este interesse, em parte, é atribuído ao grande potencial dos microrganismos endofíticos em produzir compostos com ampla diversidade de atividade biológica, como antifúngica, antibacteriana, antiviral, anticâncer, antioxidante, nematicida, inseticida, inibidor enzimático, anti-inflamatório e citotóxico (Strobel et al., 2004; Gunatilaka, 2006; Aly et al., 2010; Qin et al., 2011). Apesar do crescente interesse, as pesquisas voltadas para o estudo dos microrganismos endofíticos como fonte de compostos bioativos é ainda incipiente. Considerando a enorme diversidade vegetal existente, espécies ainda inexploradas representam fontes promissoras destes microrganismos e de seus compostos.

Uma vez que o número de espécies vegetais é enorme, a pesquisa por endófitos produtores de compostos bioativos requer estratégias para aperfeiçoar esta procura tornando mais bem-sucedida a descoberta de microrganismos promissores. Conforme reportado por Strobel (2003), plantas com características únicas, plantas que tenham história etnobotânica (uso por nativos locais, rurais, indígenas) e que estão relacionadas com finalidades específicas ou aplicações de interesse, plantas endêmicas, ou ainda, aquelas que crescem em áreas de grande biodiversidade e/ou possuem biologia incomum apresentando novas estratégias de sobrevivência são mais propensas a hospedar novos endófitos produtores de compostos bioativos.

Neste sentido, o Brasil é um país privilegiado e de grande potencial. O País é o principal dentre aqueles de megabiodiversidade, detendo em seu território entre 15 e 20% do número total de espécies do planeta. Apresenta a mais diversa flora do mundo, número superior a 55 mil espécies descritas, bem como alguns dos ecossistemas mais ricos em número de espécies vegetais - a Amazônia, a Mata Atlântica e o Cerrado. A Floresta Amazônica brasileira, com mais de 30 mil espécies vegetais, compreende cerca de 30% das florestas tropicais remanescentes no planeta (Azevedo, 2006). Tendo em vista a enorme diversidade da flora brasileira representa uma fonte promissora de endófitos e de seus compostos bioativos, a busca e a exploração do potencial de microrganismos endofíticos em variadas espécies vegetais se fazem necessárias.

4. JUSTIFICATIVA CIRCUNSTANCIADA

A demanda por novos agentes antimicrobianos e agentes agroquímicos que sejam efetivos no controle de doenças infecciosas em plantas e animais, incluindo o homem, é cada vez mais crescente. Isto, em parte, é devido ao desenvolvimento de resistência à drogas antimicrobianas em microrganismos infecciosos como o *Staphylococcus*, *Mycobacterium* e *Streptococcus*, bem como, o surgimento de novos e ameaçadores microrganismos infecciosos que afetam a saúde da população humana e a sanidade vegetal.

As plantas há muito tempo são utilizadas para os mais variados fins terapêuticos devido as suas propriedades farmacológicas. Elas são reconhecidamente fontes promissoras de uma variedade de substâncias bioativas incluindo, compostos

antifúngicos, antibacterianos, antivirais bem como, substâncias com atividade imunomoduladora, antitumoral, entre outras, o que tem levado a inúmeros estudos que buscam a descoberta de compostos ativos potencialmente úteis para o desenvolvimento de novos fármacos.

Além das plantas, outra fonte potencial de compostos bioativos são os microrganismos em especial aqueles que habitam o interior dos tecidos vegetais, conhecidos como endofíticos. Microrganismos endofíticos colonizam os tecidos de plantas e não causam nenhum sintoma aparente de doença. Estes microrganismos, onde se incluem, principalmente, bactérias, leveduras, actinomicetos e fungos filamentosos, vivem em equilíbrio com a planta hospedeira em diferentes tecidos e órgãos vegetais. Dentro da planta, os microrganismos produzem compostos que tem papel essencial na defesa vegetal contra fitopatógenos, herbívoros e pragas. Em muitos casos, a resistência da planta ao estresse biótico proporcionado pelo endófito está correlacionada com a produção de produtos naturais bioativos, dos quais a maioria tem atividade antimicrobiana (Azevedo, 1998).

É crescente o interesse por estes microrganismos como fonte de compostos bioativos naturais e isto se deve, em parte, ao fato de que microrganismos endofíticos são capazes de produzir compostos bioativos, os fitoquímicos, que são reconhecidamente produtos naturais produzidos pelas suas plantas hospedeiras (Strobel et al., 2004). Deste modo, estes microrganismos representam um fornecedor alternativo de compostos fitoquímicos característicos das plantas. Além disso, os microrganismos endofíticos representam uma reserva enorme e inexplorada de estruturas químicas únicas que foram modificadas durante a evolução e que são

produzidas para a comunicação planta-endófito e em resposta as alterações em seus habitats (Gunatilaka, 2006).

Considerando que existam aproximadamente 300.000 espécies de plantas superiores e que uma planta individual é colonizada por um ou mais endófitos a oportunidade de se descobrir novos e interessantes microrganismos endofíticos é muito grande (Strobel & Daisy, 2003, Strobel et al., 2004).

Deste modo, embora as plantas ainda se constituam uma das principais fornecedoras de compostos bioativos para o desenvolvimento de novos fármacos, os microrganismos endofíticos representam uma fonte alternativa, promissora e ainda pouco explorada de substâncias naturais bioativas que podem ter diferentes aplicações biotecnológicas desde o desenvolvimento de novos fármacos, agroquímicos, bem como agentes de controle biológico de doenças em plantas.

Considerando a enorme diversidade da flora existente no Brasil e que a maioria das espécies vegetais continua ainda inexplorada, a flora brasileira representa uma fonte promissora de microrganismos endofíticos e dos compostos bioativos produzidos por eles. Portanto, a busca por tais microrganismos é essencial, pois seus produtos naturais podem ser de grande relevância para o desenvolvimento biotecnológico de novos fármacos e novos agroquímicos.

5. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste projeto é explorar as comunidades de microrganismos endofíticos de diferentes plantas nativas da flora brasileira visando à identificação e seleção de microrganismos com atividade antimicrobiana contra patógenos de interesse agrônomo e de importância clínica.

6. PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS/MÉTODOS E TÉCNICAS

6.1. Material Vegetal

O material vegetal será coletado de regiões de ocorrência natural das espécies vegetais. A classificação da espécie vegetal será realizada no departamento de biologia vegetal (BAV) da universidade estadual de londrina, onde será depositada uma exsicata da planta.

Em cada coleta será obtido material de 4 plantas independentes distribuídas dentro da região de coleta. De cada planta serão retiradas aleatoriamente 10 amostras saudáveis (sem sintomas aparentes de dano ou doença) de diferentes partes vegetais (folhas, flores, raízes, caules e sementes/frutos, quando disponíveis). As amostras serão embaladas em sacos plásticos e levadas para o Laboratório de Genética de Fungos isolamento dos microrganismos endofíticos no mesmo dia.

6.2. Desinfecção das amostras vegetais

Para o isolamento de microrganismos endofíticos é necessário que a superfície do material vegetal seja desinfetada para retirada de microrganismos epifíticos e contaminantes. Os procedimentos de desinfecção do material vegetal e isolamento de microrganismos endofíticos serão realizados conforme descrito por Araújo e colaboradores (2000).

Para desinfecção, as amostras sadias de tecidos vegetais serão lavadas sequencialmente com etanol 70% (30 segundos), hipoclorito de sódio 3% (3 minutos),

etanol 70% (30 segundos) e duas vezes com água destilada esterilizada (6 minutos) (Araújo et al., 2000).

A eficiência da desinfecção do material vegetal será avaliada pelo plaqueamento em meio agar-batata-dextrose (BDA) e TSA de alíquotas da água utilizada na última lavagem do material vegetal e pelo pressionamento dos fragmentos desinfestados sobre o meio de cultura (Araújo et al., 2000). As amostras de tecidos vegetais desinfetadas serão utilizadas no isolamento de fungos e leveduras, actinomicetos e bactérias endofíticas.

6.3. Isolamento e identificação de microrganismos endofíticos

6.3.1 – Isolamento, caracterização de fungos endofíticos

Para o isolamento dos fungos endofíticos, as amostras vegetais desinfetadas superficialmente serão cortadas em fragmentos pequenos de 1x1 cm² distribuídos na superfície dos meios sólidos BDA e Vogel (Vogel et al., 1964) contendo 50 µg/mL de ampicilina. As placas inoculadas serão incubadas a 28°C até o crescimento dos fungos serem visíveis. Uma porção de cada micélio morfológicamente distinto que tenha crescido dos segmentos das plantas durante o período de incubação será retirado e transferido para placas contendo BDA sem antibiótico para purificação do isolado. Os isolados de fungos serão armazenados em meio sólido BDA inclinado a 4°C, em microtubos contendo água destilada a 4°C e em glicerol (30%) a -70°C.

A identificação dos fungos será feita por métodos tradicionais e moleculares. Na tradicional serão consideradas as características culturais e morfológicas dos esporos e micélios, bem como características microscópicas ao microscópio óptico. Para visualização das estruturas microscópicas, os micélios serão fixados em lâminas

de vidro, visualizados ao microscópio óptico e fotografado. Os isolados serão agrupados e representantes de cada grupo serão selecionados para identificação por técnicas moleculares.

6.3.2 – Isolamento e caracterização de actinomicetos endofíticos

Isolamento e caracterização dos actinomicetos endofíticos serão feitos conforme descrito Verma et al. (2009). Para inibir o crescimento de fungos endofíticos, após a desinfestação superficial as amostras serão tratadas com uma solução de NaHCO₃ 10%. Após, as amostras de tecidos vegetais serão cortadas em fragmentos pequenos de 1x1 cm² e distribuídos na superfície dos meios ágar S (Baker, 1990; Verma et al., 2009) e no meio TWYE (Crawford et al., 1993), para isolamento de actinomicetos de crescimento mais lento. Para inibir o crescimento de microrganismos não-actinomicetos, 50 µg/mL do antibiótico ácido nalidíxico será adicionado aos meios. As placas inoculadas serão incubadas a 28°C por 15-30 dias para permitir o crescimento dos actinomicetos endofíticos.

A identificação preliminar do isolados será feita pelas características morfológicas e culturais (Verma et al., 2009). Os isolados serão agrupados e representantes de cada grupo serão escolhidos para a caracterização molecular.

6.3.3 – Isolamento, caracterização de bactérias endofíticas

Para o isolamento de bactérias endofíticas, 1 g das amostras vegetais desinfetadas superficialmente será macerado em 9 mL de solução salina (0.85%) estéril. A suspensão obtida será diluída serialmente e alíquotas de 0.1 mL de cada

diluição serão plaqueadas em meio sólido TSA contendo 50 µg/mL do antifúngico benomil. As placas inoculadas serão incubadas a 28°C por até 10 dias, sendo o crescimento dos microrganismos acompanhado diariamente. Após, as colônias crescidas nas placas serão contadas para determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC). A densidade da população de bactérias endofíticas será estimada pelo peso fresco e pelo fator de diluição.

As diferentes colônias crescidas serão repicadas e transferidas para meio TSA sem antifúngico para purificação do isolado. As bactérias isoladas serão armazenadas em meio sólido TSA inclinado a 4°C e em glicerol 30% a -80°C.

Todos os ensaios serão conduzidos com três repetições utilizando-se o delineamento inteiramente ao acaso. No tratamento controle, as placas serão inoculadas com solução salina 0.85% esterilizada. As médias serão comparadas pelo teste de Tukey (5%).

Os isolados bacterianos serão caracterizados e agrupados conforme a cor e a morfologia da colônia, morfologia e mobilidade da célula, crescimento e reação de Gram (Holt et al., 1994). Representantes de cada grupo serão selecionados para a identificação molecular.

6.4 Caracterização molecular dos microrganismos endofíticos

Para a identificação dos isolados fúngicos será analisada a região ITS (Internal Transcribed Spacer) do DNA ribossomal (rDNA). O DNA genômico dos fungos endofíticos será extraído a partir de amostras de micélios crescido em BDA usando o método de CTAB conforme descrito por Reichardt & Rogers (1987). A região ITS1-5.8S-

ITS2 do rDNA dos isolados fúngicos serão amplificados com os primers universais ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White, *et al*, 1990) conforme condições descritas por Favaro (2009).

Para a identificação dos isolados de bactérias e de actinobactérias será analisada a sequencia parcial do 16S rDNA. O DNA genômico será extraído pelo método de CTAB conforme descrito por Wilson (1987). A sequencia parcial do 16S rDNA será amplificada utilizando os primers 27f (5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3') e 738r (3' AGG GTA TCT AAT CCT GTT TGC 5') (ROSCH & BOTHE, 2005; GURTLER & STANISICH, 1996) conforme as condições de reação descritas por Goes (2011).

A visualização do DNA genômico e dos fragmentos amplificados por PCR será feita em gel de agarose com a concentração adequada ao tamanho do fragmento. A eletroforese será feita em tampão TBE 1X e a coloração do gel será com brometo de etídeo, conforme descrito por Sambrook & Russel (2001).

Os fragmentos de DNA amplificados serão purificados utilizando o PureLink™ PCR Purification kit (Invitrogen™), conforme recomendações do fabricante. O sequenciamento será realizado com os mesmos primers utilizados na PCR em um sequenciador automático MegaBace1000 conforme recomendações do fabricante. As sequências obtidas serão comparadas às sequencias depositadas no banco de dados do GenBank utilizando BlastN para busca de sequencias similares (Altschul et al., 1997).

6.5. Avaliação da atividade antimicrobial dos microrganismos endofíticos

6.5.1 *Microrganismos testes*

Para os ensaios de avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica serão utilizados como microrganismos testes representantes de bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*), gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*), leveduras (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Cryptococcus* sp.) e fungos filamentosos (*Aspergillus niger*, *Rhizoctonia solani*, *Microsporium gypseum* e *Trichophyton rubrum*).

As bactérias serão cultivadas em meio inclinado agar nutriente enquanto as leveduras e os fungos serão cultivados em meio inclinado batata-dextrose-ágar (BDA). O inóculo será preparado pela adição de 4 mL de solução salina 0.85% ao meio inclinado e homogeneização vigorosa para obter suspensão de células ou esporos (Tong et al., 2011).

6.5.2. *Preparo do caldo de fermentação*

O preparo do caldo de fermentação dos microrganismos endofíticos será feito conforme procedimentos descritos por Huang e colaboradores (2001). Os isolados de fungos, actinomicetos e bactérias endofíticas serão inoculados em meio líquido batata-dextrose (BD), meio-S e meio TSA, respectivamente. Os microrganismos serão cultivados sob agitação de 120 rpm por 7 dias. Após crescimento, o caldo da fermentação será homogeneizado vigorosamente e centrifugado a 4.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante será filtrado (0.22 µm) e armazenado a 4 °C para realização dos bioensaios.

6.5.3. Bioensaio em disco de difusão

A avaliação da atividade antimicrobiana do caldo de fermentação será feita pelo bioensaio de disco de difusão conforme procedimentos definido por Huang et al. (2001).

A suspensão (10^5 unidade formadoras de colônias (UFC)/mL) de células (ou esporos) de bactérias, leveduras ou fungos será espalhada na superfície do meio de cultura BDA. Discos de papel estéreis (Whatman) serão impregnados o caldo de fermentação e então, posicionados na superfície do meio de cultura inoculado. No controle negativo será inoculado o meio de cultura e no controle positivo será utilizado 30 µg/ml cloramfenicol para bactérias e 30 µg/ml cetoconazol para fungos e leveduras.

As placas serão incubadas a 28°C por 2-5 dias. Após crescimento, a atividade antimicrobiana será avaliada pelo diâmetro do halo de inibição (em mm) ao redor do disco de papel. Os bioensaios serão feitos com quatro repetições e as médias serão comparadas pelo teste de Tukey (5%).

6.6 Plano de Metas e Cronograma

Meta 1: Construção de um banco de estirpes de fungos, leveduras, actinomicetos e bactérias endofíticas através de técnicas de isolamento e cultivo em meio de cultura.	Ano 1	Ano 2	Ano 3
	6 12	18 24	30 36
– Coleta e preparo das amostras vegetais	X		
– Isolamento e purificação dos microrganismos endofíticos	X		
– Armazenamento e catalogação dos isolados obtidos	X X		
– Caracterização morfológica e agrupamento preliminar dos isolados.	X		
Meta 2: Caracterização molecular dos isolados	Ano 1	Ano 2	Ano 3
	6 12	18 24	30 36
–Extração do DNA de isolados representantes de bactérias, actinomicetos, fungos e leveduras.		X	
–Amplificação por PCR do 16S rDNA de bactérias e actinomicetos		X X	
–Amplificação por PCR do ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA de fungos e leveduras.		X X	X
–Purificação Sequenciamento dos fragmentos amplificados obtidos		X X	X
– Análise das seqüências e identificação dos isolados		X X	X
Meta 3: Avaliação da atividade antimicrobiana dos isolados de microrganismos endofíticos e seleção dos isolados promissores para caracterização futura.	Ano 1	Ano 2	Ano 3
	6 12	18 24	30 36
–Catalogação e cultivo dos microrganismos testes		X	X X
–Preparo do caldo de fermentação dos isolados de endofíticos		X	X X
– Bioensaio em discos de difusão		X	X X
–Análise dos resultados e seleção de microrganismos promissores		X	X X

7. RESULTADOS E CONTRIBUIÇÕES ESPERADAS

1. Desenvolver uma coleção de culturas de microrganismos endofíticos, permitindo não só a preservação da biodiversidade de microrganismos endofíticos, mas também a organização e manutenção de microrganismos que podem ser explorados para atividades diversas em pesquisa.
2. Avaliar a diversidade genética de microrganismos endofíticos.
3. Identificar dentro da coleção de microrganismos aqueles que apresentam maior potencial antimicrobiano contra os microrganismos testes.
4. Selecionar microrganismos endofíticos com elevado potencial antimicrobiano para estudos posteriores de identificação e caracterização de compostos bioativos.

8. LOCAL DE REALIZAÇÃO/ ÓRGÃOS ENVOLVIDOS

O presente projeto será desenvolvido no **Laboratório de Genética de Microrganismos** da Universidade Estadual de Londrina.

9. BIBLIOGRAFIA BÁSICA OU PRELIMINAR

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p. 17, 1997.

ALY, A.H.; DEBBAB, A.; KJER, J.; PROKSCH, P. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products. **Fungal Diversity**, v. 41, p. 1-16, 2010. DOI 10.1007/s13225-010-0034-4.

ARAÚJO, W.L.; MACCHERONI JR., W.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; BARROSO, P.A.V. SARIDAKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Can. J. Microbiol.**, v. 47, p.229-236, 2001. DOI: 10.1139/cjm-47-3-229.

AZEVEDO, C.M.A. Biodiversidade - Acesso a Recursos Genéticos, Proteção ao Conhecimento Tradicional Associado e Repartição de Benefícios. In: **Agrobiodiversidade e diversidade cultural/MMA** (Série Biodiversidade, 20). Brasília: MMA/SBF, 2006. p. 40-42.

AZEVEDO, J.L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: Melo, I.S. & Azevedo, J.L. (coords) **Ecologia microbiana**, Jaguariuna: Editora Embrapa/CNPMA, 1998. p.445-461.

BAKER D. Method for the isolation, culture and characterization of the Frankiaceae: soil actinomycetes and symbionts of actinorrhizal plants. In: LABEDA DP (Ed) **Isolation of biotechnological organisms from nature**. New York: McGraw-Hill, 1990. p. 213-236.

BÉRDY J. Bioactive microbial metabolites. **J. Antibiot.**, v. 58, p.1-26, 2005.

BULL, A.T.; GOODFELLOW, M.; SLATER, J.H. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. **Annual Review of Microbiology**, v. 46, p.219-252, 1992.

BULL, A.T.; WARD, A.C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p.573-606, 2000.

CANHOS, V.P; MANFIO, G.P. Recursos Microbiológicos para Biotecnologia. Disponível em: http://www.anbio.org.br/pdf/2/mct_recursos_biologicos.pdf. Acesso em: 12 maio 2011.

CASTILLO, U.F.; STROBEL, G.A.; FORD, E.J.; HESS, W.M.; PORTER, H.; JENSEN, J.B.; ALBERT, H.; ROBISON, R.; CONDRON, M.A.M; TELOW, D.B. ; STEVENS, D.; YAVER, D. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*. **Microbiology**, v. 148, p.2675-2685, 2002.

COLWELL, R. Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. **Journal of industrial Microbial and Biotechnology**, v. 18, p.302-307, 1997.

CRAWFORD, D. L., J. M. LYNCH, J. M. WHIPPS, AND M. A. OUSLEY. Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p.3899-3905, 1993.

DING, T.; JIANG, T.; ZHOU, J. ; XU, L.; GAO, Z.M. Evaluation of antimicrobial activity of endophytic fungi from *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae). **Genetics and Molecular Research**, v. 9, p.2104-2112, 2010.

EZRA, D.; CASTILLO, U.F.; STROBEL, G. A.; HESS, W. M.; PORTER, H.; JENSEN, J.B.; CONDRON, M.A.M.; TELOW, D.B.; SEARS, J.; MARANTA, M.; HUNTER, M.; WEBER, B.; YAVER, D. Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. endophytic on *Monstera* sp. **Microbiology**, v. 150, p.785-793, 2004.

FAVARO, L.C.L. **Diversidade e interação de *Epicoccum* spp. com cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. 2009. 291f. Tese (Doutorado), Piracicaba, 2009.

GOES, K.C.G.P. **Caracterização Bioquímica e Molecular de isolados de bactérias promotoras do crescimento vegetal associados ao girassol (*Helianthus annuus*)**. 2011. 78f. Dissertação (Mestrado)-Curso de Biotecnologia, UEL, Londrina-PR, 2011.

GUNATILAKA, L.A.A. Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence. **J. Nat. Prod.**, v. 69, p.509-526, 2006.

GURNEY, K. A.; MANTLE, P. G. Biosynthesis of 1-Nmethylalbonoursin by an endophytic *Streptomyces* sp. **J Nat Prod**, v. 56, p. 1194-1198, 1993.

GURLER, V., V. A. STANISICH. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. **Microbiology**, v. 142, p.3-16, 1996.

HARPER, J. K.; ARIF, A.M.; FORD, E. J.; STROBEL, G. A.; PORCO, J.; TOMER, D. P.; O'NEILL, K.; HEIDER, E.M.; GRANT, D. M. Pestacin: a 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. **Tetrahedron**, v. 59, p.2471-2476, 2003.

HOLT, J.G., KREIG, N.R., SNEATH, P.H.A., STALEY, J.T., WILLIAMS, S.T.. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, 1994

HUANG, Y.; 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.

HUNTER-CEVERA, J.C. The value of microbial diversity. **Current Opinion in Microbiology**, v. 1, p.278-285, 1998.

LIU, J.Y.; SONG, Y.C.; ZHANG, Z.; WANG, L.; GUO, Z.J.; ZOU, W.X.; TAN, R.X. *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites. **Journal of Biotechnology**, v. 114, p.279-287, 2004. DOI:10.1016/j.jbiotec.2004.07.008

MARK REICHARDT AND SHARON ROGERS Preparation of genomic DNA from plant tissue. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, (eds) **Current Protocols in Molecular Biology**, New York: John Wiley & Sons, 1987. p. 2.3.3-2.3.6.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLDANI, V.S.; LOPES, N.P. **Produtos naturais: Atualidade, desafios e perspectivas**. Química Nova, v. 25, n. 1, p.45-61, 2002.

QIN, S.; XING, K.; JIANG, J.; XU, L.; LI, W. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. **Appl Microbiol. Biotechnol.**, v. 89, p.457-473, 2011. DOI: 10.1007/s00253-010-2923-6.

RAMOS, H.P.; BRAUN, G.H.; PUPO, M.T.; SAID, S. Antimicrobial Activity from Endophytic Fungi *Arthrinium* state of *Apiospora montagnei* Sacc. and *Papulaspora immerse*. **Brazilian archives of Biology and Technology**, v. 53, p.629-632, 2010.

RÖSCH, C. & BOTHE, H. Improved Assessment of Denitrifying, N₂-Fixing, and Total-Community Bacteria by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis Using Multiple Restriction Enzymes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 2026-2035, 2005.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **The Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabolismos secundários. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A. & PETROVICK, P.R. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2001. p.209-216.

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

STROBEL G.A., DAISY B.H., CASTILLO U., HARPER J. Natural products from endophytic microorganisms. **J Nat Prod**, v. 67, p. 257-268, 2004.

STROBEL, G. A.; FORD, E.; WORAPONG, J.; HARPER, J. K.; ARIF, A. M.; GRANT, D.; FUNG, P. C. W.; CHAN, K. Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. **Phytochemistry**, v. 60, p.179-183, 2002.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 67, n. 4., p.491-502, 2003. DOI: 10.1128/MMBR.67.4.491-502.2003.

STROBEL, G.A.; DIRKSE, E.; SEARS, J.; MARKWORTH, C. Volatile antimicrobials from *Muscodor albus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, v. 147, p. 2943-2950, 2001.

SUN, L.; LU, Z.; BIE, X.; LU, F.; YANG, X. Isolation and characterization of a co-producer of fengycins and surfactins, endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2, from *Scutellaria baicalensis* Georgi. *World J Microbiol Biotechnol*, v. 22, p.1259-1266, 2006. DOI 10.1007/s11274-006-9170-0

TAN, R. X.; ZOU, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Nat. Prod. Rep.**, v. 18, p.448-459. 2001,

TONG, W. Y.; DARAH, I.; LATIFFAH, Z. Antimicrobial activities of endophytic fungal isolates from medicinal herb *Orthosiphon stamineus* Benth. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, p. 831-836, 2011.

VERMA, V.C.; GOND, S.K.; KUMAR, A.; MISHRA, A.; KHARWAR, R.N.; GANGE, A.C. Endophytic Actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: Isolation, Diversity, and Antimicrobial Activity. **Microb Ecol**, v. 57, p.749-756, 2009. DOI 10.1007/s00248-008-9450-3

WHITE TJ, BRUNS TD, LEE S, TAYLOR JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JS, White TJ (eds) **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, 1990. p.315-322.

WICKLOW, D.T.; POLING, S.M. Antimicrobial Activity of Pyrrocidines from *Acremonium zeae* Against Endophytes and Pathogens of Maize. **Biological Control**, v. 99, p. 109-115, 2009. DOI:10.1094/PHYTO-99-1-0109

WICKLOW, D.T.; ROTH, S.; DEYRUP, S.T.; GLOER, J.B. A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. **Mycol. Res.**, v. 109, p.610-618, 2005. DOI:10.1017/S0953756205002820

WILSON,K. Preparation of genomic DNA from bacteria. In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, (eds) **Current Protocols in Molecular Biology**, New York: John Wiley & Sons, 1987. p. 2.4.1-2.4.5.

XING, Y; CHEN, J.; CUI, J. CHEN, X; GUO, S. Antimicrobial Activity and Biodiversity of Endophytic Fungi in *Dendrobium devonianum* and *Dendrobium thyrsiflorum* from Vietman. **Curr Microbiol**, v. 62, p.1218-1224, 2011. DOI 10.1007/s00284-010-9848-2.

VOGEL, Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. *Am. Nat.*, v. 98, p. 435-446, 1964.

YOUNG, P. Major Microbial Diversity. **ASM News**, v. 63, p.417-421, 1997.

10. CURRICULUM VITAE ATUALIZADO