

## Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham.

Antonia Queiroz Lima de SOUZA<sup>1</sup>, Afonso Duarte Leão de SOUZA<sup>2</sup>, Spartaco ASTOLFI FILHO<sup>2</sup>, Maria Lúcia BELÉM PINHEIRO<sup>2</sup>, Maria Inez de Moura SARQUIS<sup>3</sup>, José Odair PEREIRA<sup>2</sup>.

### RESUMO

Das plantas tóxicas da Amazônia *Palicourea longiflora* e *Strychnos cogens* foram isolados 571 fungos endofíticos e 74 bactérias endofíticas. *Palicourea longiflora* (Rubiaceae) e outras espécies desse gênero estão relacionadas a 90% das mortes de gado na região Amazônica. *Strychnos cogens* (Loganiaceae) e outras espécies de *Strychnos* são utilizadas pelos indígenas na confecção de “curares”. Entre os endófitos isolados de *P. longiflora* foram identificados os fungos: *Colletotrichum* sp. e seu telemorfo *Glomerella* sp., *Guignardia* sp., *Aspergillus niger*, *Phomopsis* sp. e *Xylaria* sp., além da bactéria *Burkholderia gladioli*, pertencente a um grupo de fixadoras de nitrogênio. Dos isolados de *S. cogens* foram identificados os fungos: *Colletotrichum* sp., *Guignardia* sp., *Aspergillus niger* e *Trichoderma* sp. Uma amostra de 79 isolados fúngicos teve seus metabólitos extracelulares bioensaiados contra microrganismos patogênicos e fitopatogênicos: 19 isolados inibiram um ou mais microrganismos-teste. Dos oito isolados com melhores resultados de inibição, as moléculas bioativas eram menores que 12.000 daltons, fato verificado pela diálise dos metabólitos.

### PALAVRAS-CHAVE

*Palicourea longiflora*, *Strychnos cogens*, fungos endofíticos, bactérias endofíticas, bioensaios.

## Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from amazonian toxic plants: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich and *Strychnos cogens* bentham.

### ABSTRACT

*Palicourea longiflora* (Rubiaceae), a toxic plant from the Amazon belonging to the genus related to 90% of cattle death in the region, and *Strychnos cogens* (Loganiaceae) belonging to a genus whose plants are used by Indians for manufacturing “curares”, were sources of 571 fungi isolates and 74 bacteria isolates. The fungi *Colletotrichum* sp., *Guignardia* sp., *Aspergillus niger*, *Glomerella* sp., *Phomopsis* sp. and *Xylaria* sp. and the endophytic bacterium *Burkholderia gladioli* were identified from *P. longiflora*, while the fungi *Colletotrichum* sp., *Guignardia* sp., *Aspergillus niger* and *Trichoderma* sp. were identified from *S. cogens*. Bioassays of fungi metabolites excreted by 79 isolates against pathogenic and phytopathogenic microorganisms showed that 19 products inhibited at least one of the microorganisms tested. Through metabolite dialysis it was possible to check the eight best inhibition results, observing that the bioactive molecules were smaller than 12.000 daltons.

### KEY WORDS

*Palicourea longiflora*, *Strychnos cogens*, Endophytic fungi, Endophytic bacterium, bioassay.

<sup>1</sup> Mestra em Genética e Evolução pela Universidade Federal de São Carlos / Universidade Federal do Amazonas, e-mail: antoniaqlsouza@yahoo.com.br.

<sup>2</sup> Universidade Federal do Amazonas.

<sup>3</sup> Fundação Oswaldo Cruz – RJ

## INTRODUÇÃO

O Brasil detém cerca de 20% da biodiversidade mundial, principalmente, na floresta Amazônica, a maior do Planeta e fonte inestimável de matérias-primas nos mais variados setores. Apesar da imensa diversidade biológica amazônica, as espécies que a compõem e suas relações filogenéticas são pouco conhecidas, muito menos seus microrganismos e suas interações com outros seres.

Uma parcela dos microrganismos, principalmente bactérias e fungos, habita o interior das plantas. São os endófitos que, segundo Petrini (1991), colonizam os tecidos saudáveis de partes aéreas da planta, em algum tempo do seu ciclo de vida, sem lhes causar danos aparentes. Este conceito também é estendido aos microrganismos das raízes. Os endófitos diferem dos epífitos que vivem na superfície dos vegetais, e dos fitopatógenos, que lhes causam doenças. Entre os microrganismos endófitos, os fungos e bactérias que formam nódulos nas raízes das plantas as quais estão associados são bastante estudados devido sua importância na agricultura, particularmente por sua participação na fixação de nitrogênio pelas plantas. Ao contrário, os endófitos das partes aéreas dos vegetais só recentemente têm despertado o interesse da comunidade científica, especialmente por seus potenciais na produção de metabólitos de interesse econômico, incluindo os relacionados às plantas hospedeiras.

As interações endófito/planta, ainda não são muito bem compreendidas, mas podem ser simbióticas, neutras ou antagonicas (neste caso, estudadas pela fitopatologia). Nas interações simbióticas os microrganismos produzem ou induzem a produção de metabólitos primários e secundários que podem conferir diversas vantagens à planta tais como: a diminuição da herbivoria e do ataque de insetos, o aumento da tolerância a estresses abióticos e o controle de outros microrganismos (Araújo, 1996; Rodrigues & Dias Filho, 1996; Pereira, 1993). Exemplo de metabólitos que podem ser induzidos pelos endófitos são as fitoalexinas, substâncias de baixo peso molecular com atividades antimicrobianas, produzidas pelas plantas ante a ação de microrganismos ou de agentes estressantes (Cordeiro Neto & Dietrich, 1992). Da parte dos fungos pode-se citar a produção de micotoxinas, metabólitos secundários que podem causar doenças em humanos e outros animais (Clay, 1988; D'Mello & Macdonald, 1997).

Os endófitos são potencialmente úteis na agricultura e na indústria, particularmente na alimentícia e farmacêutica. Podem ser utilizados como vetores para introdução de genes de interesse nas plantas (Fahey, 1988; Murray *et al.*, 1992), como agentes inibidores de pragas e patógenos (Volksch *et al.*, 1992; Hallmann & Sikora, 1996) e como fontes de metabólitos primários (Stamford *et al.*, 1998) e secundários de interesse como o taxol, poderoso anticancerígeno (Stierle *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2000), a cryptocandina, lipopeptídeo antimicótico (Strobel *et al.*, 1999) e diversos outros antibióticos. Relatos como o do taxol, inicialmente

isolado de *Taxus brevifolia* e, em seguida, de diversos endófitos desta e de outras plantas que o produzem, sugerem um relacionamento entre planta e microrganismo que deve ser melhor explorado.

Neste contexto, pretende-se contribuir para o conhecimento da diversidade e do potencial biotecnológico dos microrganismos da Amazônia, em especial dos fungos endófitos isolados de plantas tóxicas das espécies *Palicourea longiflora* (Rubiaceae) e *Strychnos cogens* (Loganiaceae). Várias espécies do gênero *Palicourea* são citadas em 90% dos casos de mortes de gado na Região Amazônica (Tokarnia *et al.*, 1979) e plantas do gênero *Strychnos* são usadas por indígenas para a confecção dos venenos de flechas denominados "curares" (Belém-Pinheiro, 2000). *P. longiflora*, é homóloga à *P. marcgravii* (Taylor, comunicação pessoal, 2001), conhecida pelos nomes populares de "cafezinho", "café bravo", "erva de rato", "roxa", "roxinha", "roxana", "vick" e "cambará". Ambas são arbustos de lugares sombreados e invadem capoeiras e pastos recém formados de terra firme, onde ocorrem, sendo *P. marcgravii*, uma das oito plantas identificadas no Brasil como causadoras da síndrome de "mortes súbitas" em bovinos e a planta tóxica mais largamente distribuída (Tokarnia *et al.*, 1979; Gorniak *et al.*, 1989). Plantas americanas do gênero *Strychnos*, da família Loganiaceae, têm história na medicina popular como antimaláricas, tônicas, afrodisíacas, febrífugas e anti-anêmicas (Quetin-Leclercq *et al.*, 1990). As espécies sulamericanas têm sido muito estudadas devido à ação dos alcalóides quaternários, componentes dos "curares", juntamente com a *d*-tubo curarina, isolada de Menispermaceae, que revolucionaram o arsenal terapêutico das cirurgias, inspirando uma linha de mio-relaxantes sintéticos, coadjuvantes em anestésias (Belém-Pinheiro, 2000). A espécie *S. cogens* Bentham apresenta-se como uma liana de porte médio, encontrada principalmente em terra-firme, sendo comum nas vizinhanças de Manaus (Krukoff, 1972). Não existem na literatura estudos sobre o potencial biotecnológico de endófitos dessas plantas tóxicas da Amazônia.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material Vegetal

*P. longiflora* (Aubl.) Rich, identificada pela doutora Charlotte Taylor do Missouri Botanical Garden, foi coletada no interior da floresta ou próximo de pastagens na Fazenda Experimental da Universidade Federal do Amazonas, no Km 42 da BR-174, Manaus-Caracará (local I) e numa área de capoeira na Reserva Adolfo Ducke, pertencente ao Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, no Km 26 da AM-10, Manaus-Itacoatiara (local II). Para isolamento de endófitos (fungos e bactérias) foram utilizados fragmentos de folhas e caules, além de frutos verdes e maduros para isolamento apenas de bactérias.

*Strychnos cogens* Bentham, identificada por pesquisadores do projeto Flora – INPA, foi coletada no interior da floresta próxima de Manaus, na Estrada Manaus-Itacoatiara, Km 76 (local III). Para o isolamento dos fungos endofíticos foi realizada uma coleta, de um único indivíduo, do qual foram utilizados fragmentos de folhas, do caule e da raiz.

### Esterilização do Material e Isolamento dos Endófitos

O material botânico coletado foi processado no prazo de 24 horas, após a coleta, tendo sido lavado abundantemente com água corrente e detergente neutro para retirar o excesso de epifíticos. Em seguida, em câmara asséptica, o material foi imerso em álcool 70% por 1 minuto, em hipoclorito 3% por 4 minutos e novamente em álcool 70% por 30 segundos, para retirar o excesso de hipoclorito. Lavou-se, então, em água destilada estéril da qual se retirou 50 µL para fazer o controle da assepsia (Pereira, 1993).

Após a assepsia, pequenos fragmentos medindo aproximadamente 8 x 8 mm foram plaqueados em meio de batata, dextrose e ágar (BDA) com 0,2% de extrato de levedura, acrescido de terramicina (100µmL), para inibir o crescimento bacteriano no isolamento dos fungos, e benlate (1µg/mL), para inibir o crescimento fúngico no isolamento das bactérias. As placas com os fragmentos foram incubadas a 18 °C (Guimarães, 1998).

A partir do terceiro dia de incubação, pequenos fragmentos de ágar com hifas dos fungos recém desenvolvidas foram transferidos para tubos de ensaios contendo meio BDA inclinado. Este procedimento durou oito dias consecutivos. Os isolados de bactérias começaram a ser transferidos após 24 horas de incubação para tubos de penicilina com meio BDA *soft* acrescido de 10% de água de coco.

### Conservação e Frequência dos Endófitos

Após o isolamento dos endófitos a purificação foi feita, quando possível, pela Técnica de Tween (Azevedo & Costa, 1973) ou por sucessivos repiques. Os isolados fúngicos que apresentaram estrutura reprodutiva, foram armazenados em triplicata, conforme a metodologia de Castellani (1939). Os que não apresentaram estrutura reprodutiva foram cultivados em BDA, em triplicata, bem como os isolados bacterianos que foram purificados pelo método do esgotamento por estrias cruzadas e armazenados a 4 °C. As frequências dos endófitos foram calculadas através do número de colônias obtidas dividido pelo número de fragmentos incubados.

### Identificação dos Fungos Endofíticos

Para a identificação foi feito o micro-cultivo e observados os aspectos macro e micro-morfológicos das estruturas vegetativas e reprodutivas. Os resultados foram comparados com base em literatura específica.

### Ensaio Biológicos

Foram escolhidas aleatoriamente 79 linhagens de fungos endofíticos, sendo 64 isolados de *P. longiflora* e 15 de *S. cogens*, representando, respectivamente, 15,4% e 25,4% do total de isolados de cada espécie. Após cultivados por oito dias em placas de petri com meio BDA, foram retirados fragmentos do meio com 6 x 6 mm para fermentação em 10 mL de BD (acrescido de 0,2% de extrato de levedura) a 25 °C, a 120 r.p.m., por oito dias. Decorrido este tempo o micélio foi separado do meio metabólico por filtração em papel Whatman, nº 4. O líquido foi novamente filtrado em membrana millipore (0,22 µm ou 0,45 µm) e armazenado a 4 °C para realização dos ensaios antimicrobianos, contra os seguintes microrganismos:

a) *Bacillus* sp. (linhagem VRF13 2.2) – bactéria endofítica isolada da macrófita aquática *Vitoria amazonica*, conhecida como vitória-régia, planta peculiar da Amazônia. Esta bactéria possui a particularidade de ser extremamente sensível a diferentes antibióticos em baixas concentrações.

b) *Bacillus subtilis* – bactéria Gram-positiva não patogênica, porém considerada similar à *B. cereus*, responsável por diarreias, náuseas e vômitos.

c) *Staphylococcus aureus* – bactéria Gram-positiva, patogênica, causadora de doenças respiratórias e cardíacas e principal causadora de infecções hospitalares.

d) *Escherichia coli* - bactéria Gram-negativa, patogênica para humanos e animais.

e) *Candida albicans* - fungo leveduriforme, patogênico, responsável pela candidíase no trato vaginal e oral.

f) *Trichoderma* sp. – fungo filamentosos, fitopatogênico e produtor de metabólitos de interesse industrial.

g) *Aspergillus flavus* – fungo filamentosos, patogênico, principal espécie produtora de micotoxinas encontradas nos alimentos, mais especificamente em sementes, sendo causadora de grandes prejuízos econômicos.

Foram realizados testes semi-quantitativos, em triplicata, *in vitro*, para avaliar a antibiose dos metabólitos extracelulares presentes nos meios fermentados contra as linhagens-teste. A metodologia utilizada foi a do líquido metabólico, também conhecido como método do filtrado ou para detecção de antibióticos (Kawamoto & Lorbeer, 1976). As linhagens dos microrganismos-teste, cultivadas em meios líquidos, foram semeadas com alça de Drigalski (50 µL) em placas de Petri contendo o meio específico para cada uma (*cup plate*). Para *A. flavus*, 1 mL da suspensão de conídios foi incorporado ao meio de cultura de cada placa (*Pour plate*). Para *Trichoderma* sp. foi colocado um fragmento de ágar contendo suas hifas no centro da placa. Aplicaram-se 100 µL do líquido metabólico em poços de 8 mm seguindo-se a incubação por 24-72 horas. Os resultados foram registrados considerando-se os valores médios das três repetições.

Entre as amostras de líquidos metabólicos mais promissores, oito foram submetidos à diálise, colocando-se 2 mL de cada em

sacos de celulose com capacidade de retenção para 12.000 daltons. Os sacos foram amarrados e colocados em água destilada por nove horas. Os metabólitos retidos nos sacos foram coletados e novamente submetidos aos ensaios antimicrobianos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As folhas de *P. longiflora* quando mergulhadas no hipoclorito sofreram oxidação, ficando escuras mais rapidamente que as folhas de outras plantas analisadas no Laboratório de Genética-UFAM, ocasionando uma redução na quantidade de microrganismos isolados. Em casos de folhas muito jovens a oxidação acentuava ainda mais o decréscimo do número de isolados endofíticos. O mesmo processo foi utilizado para as amostras vegetais de *S. cogens*, porém não foi observada a rápida oxidação.

### Endófitos isolados

Foram obtidos 571 isolados fúngicos dos quais 59 de *S. cogens* e 512 de *P. longiflora*. Desta última, também foram isoladas 74 bactérias endofíticas (Tabela 1) perfazendo um

total de 645 isolados. Os primeiros isolados bacterianos (14) cresceram em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA, acrescido de terramicina, sugerindo tratar-se de espécies resistentes a este antibiótico. Estas bactérias foram percebidas após o repique para os tubos com BDA inibindo o crescimento dos fungos: *Guignardia* e *Colletotrichum*, ambos considerados fitopatógenos. O uso de alternativas ecológicas corretas para o controle de fitopatógenos será num futuro próximo uma das aplicações dos endófitos, e estas bactérias isoladas, poderão então ser avaliadas.

### Frequência dos Fungos Endofíticos

A Tabela 2 apresenta a frequência estimada dos fungos endofíticos para as plantas *P. longiflora* e *S. cogens*. De forma geral houve uma maior frequência de fungos endofíticos nas folhas dos hospedeiros que nos caules, decrescendo ainda mais para a raiz de *S. cogens*. Este fato sugere que após a entrada dos microrganismos, principalmente através das folhas, ocorre uma migração para os diferentes tecidos das plantas. Estas apresentam tecidos mais frágeis e expostos, devido aos estômatos, prováveis portas de entrada para os endófitos.

**Tabela 1** – Número total de fungos e bactérias endofíticas isoladas das plantas *Palicourea longiflora* e *Strychnos cogens* no Estado do Amazonas-BR.

Planta hospedeira	Local de coleta	Data da coleta	Tipo de isolado	Quantidade de isolados			Total
				folhas	caules	raiz	
<i>P. longiflora</i>	I	Março/98	Fungo	72	15	-	87
<i>P. longiflora</i>	II	Maió/98	Fungo	142	16	-	158
<i>P. longiflora</i>	II	Maió/98	Bactéria	4	10	-	14
<i>S. cogens</i>	III	Dezembro/98	Fungo	40	13	6	59
<i>P. longiflora</i>	I	Junho/99	Fungo	180	87	-	267
<i>P. longiflora</i>	I	Junho/99	Bactéria	-	60*	-	60

I = Fazenda Experimental da U.A.; II = Reserva Adolfo Ducke; III = Km 76 da Manaus-Itacoatiara-Am; \* Isolados de frutos, caules e folhas e selecionados de um total de 805 (ver texto).

**Tabela 2** – Frequência de fungos endofíticos isolados de folhas, caules e raízes das plantas hospedeiras.

Planta hospedeira	Tipos de tecido vegetal						Frequência total (%)
	folha		caule		raiz		
	Quant. Isol.	Freq. (%)	Quant. Isol.	Freq. (%)	Quant. Isol.	Freq. (%)	
<i>P. longiflora</i> Março/98	72	72,0	15	37,5	-	-	62,1
<i>P. longiflora</i> Maio/98	142	78,8	16	20,0	-	-	60,7
<i>S. cogens</i> Nov./98	40	66,6	13	21,6	6	15	36,8
<i>P. longiflora</i> Junho/99	180	81,8	87	39,5	-	-	60,7

Frequências calculadas dividindo-se o número de colônias obtidas pelo número de fragmentos incubados.

Percentagens elevadas de ocorrência dos fungos endofíticos também foram descritas para as folhas das plantas tropicais *Pueraria phaseoloides* (72,5%) e *Theobroma grandiflorum* (58,7%) por Galvão (1998). Quanto à frequência destes endófitos nos caules não foram encontrados dados consistentes para comparar com os deste trabalho, entretanto, a menor taxa de frequência foi observada nas amostras coletadas da reserva Adolfo Ducke onde houve o aparecimento de bactérias endofíticas, inclusive com maior incidência delas no caule.

### Bactérias Endofíticas em *P. longiflora*

A avaliação nos tecidos foi realizada a partir do isolamento da última coleta, sendo evidenciado um maior número de bactérias endofíticas nos caules (195) e nos frutos verdes (539) do que nos frutos maduros (62) e nas folhas (nove). Contudo o elevado número de bactérias endofíticas observado nos frutos verdes deve-se ao fato de que um único fruto (MgFV37) apresentou 429 isolados bacterianos, 60 dos quais foram selecionados aleatoriamente para juntamente com os 14 da primeira coleta serem preservados para futuros trabalhos.

A presença das bactérias endofíticas no caule em quase todas as placas utilizadas para o isolamento é um fato que deve ser pesquisado mais detalhadamente, pois, enquanto o número de bactérias é alto no caule decresce para as folhas, o inverso do observado em relação aos fungos para este hospedeiro.

### Identificação e Importância dos Fungos Endofíticos

A identificação completa dos fungos endofíticos não é fácil, devido à carência de especialistas em taxonomia das diferentes espécies e de conhecimento sobre seus micro *habitat*, podendo haver, entre eles muitas espécies inéditas. Os isolados que apresentaram estruturas reprodutivas, foram classificados após observação dos aspectos macro e micro morfológicos, comparados com dados específicos de literatura. Foram identificados até o nível de gênero: *Colletotrichum*, *Guignardia* e *Aspergillus* isolados das duas plantas; *Phomopsis*, *Glomerella* e *Xylaria* de *P. longiflora* e *Trichoderma* de *S. cogens*. Fungos endofíticos destes gêneros foram isolados de outras plantas tropicais tais como *Theobroma grandiflorum*, *Pueraria phaseoloides* e *Scleria pterota* (Galvão, 1998). Similarmente Pereira *et al.* (1993) isolaram de *Stylosantes guianensis* e *Musa* spp.: *Aspergillus* e *Trichoderma* entre outros fungos endofíticos. Outros fungos, especialmente os que não apresentaram estruturas reprodutivas não foram identificados.

Espécies do gênero *Guignardia* são citadas como os agentes da podridão da videira e da doença “mancha negra” nas culturas de citros (Glienke-Blanco, 1999), causando grandes perdas econômicas. Os isolados das espécies deste gênero (29) foram purificados e após oito dias de cultivo

em BDA notava-se claramente diferenças morfológicas entre eles. Diferenças morfológicas neste grupo já haviam sido descritas por Glienke-Blanco (1999) para um período de crescimento de 3-4 semanas e meio de cultura diferente – Meio Completo (MC). Outros grupos, inclusive *Colletotrichum guaranicola*, apresentam variações morfológicas e fisiológicas (Duarte *et al.*, 1995) o que dificulta a identificação dos fungos. Por isso têm sido desenvolvidos novos métodos que envolvem desde a triagem dos metabólitos até o estudo da variabilidade do DNA por técnicas de PCR (Fungaro, 2001).

*Phomopsis* é um ascomiceto, anamórfico de *Diaporthe*, cujo *habitat* é o caule de plantas lenhosas e herbáceas (Hanlin & Menezes, 1996). É o agente causal da queima da haste de soja e da podridão de seus frutos e de outras sementes.

Espécies de *Glomerella* são encontradas como parasitas ou saprófitas nos tecidos de plantas vasculares. Seu teleomorfo *Colletotrichum* está relacionado com a antracnose. Seu mais reconhecido representante é *G. cingulata* (Stonemam) Spauld. & H. Schrenk, agente causal da podridão amarga da maçã e da antracnose em diferentes culturas (Hanlin & Menezes, 1996).

Apesar dos gêneros *Guignardia*, *Colletotrichum*, *Phomopsis* e *Glomerella* serem considerados fitopatógenos, estes isolados foram obtidos a partir de plantas sadias sem qualquer doença aparente.

### Identificação e Importância das Bactérias Endofíticas

As 14 bactérias isoladas na reserva Adolfo Ducke, foram submetidas a ensaios de antibiograma e apresentaram resistência aos antibióticos clorafenicol 20 µg/mL, terramicina 100 µg/mL e tetraciclina 20 µg/mL. Foram identificadas por Souza *et al.* (2001), num estudo envolvendo a diversidade de bactérias endofíticas de diferentes plantas tropicais, através do sequenciamento do DNA ribossomal região 16S (SSU-rDNA). As linhagens foram identificadas como *Burkholderia gladioli*, pertencentes a um grupo de fixadoras de nitrogênio. “Em solos muito pobres como o da Amazônia, a presença de bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio ajuda a entender tamanha exuberância e riqueza da flora e, consequentemente, da fauna” (Pavan e Moreira-Filho, 1998). Vale ressaltar que Benvivino *et al.* (1994) relataram que isolados de *B. cepacia* foram capazes de reduzir o crescimento de fungos fitopatogênicos em meio artificial, coincidindo com o fato observado por nós para *B. gladioli*, quando da sua obtenção.

O grupo *Burkholderia* é composto por várias espécies que tem sido isoladas da rizosfera de diversos vegetais, de pacientes com fibrose cística (Whitby *et al.*, 2000) e recentemente, de algumas plantas tropicais como cana-de-açúcar, gramíneas (Baldani, 1996), arroz (Gillis *et al.*, 1995), mandioca (Belota, 1994) e abacaxi (Weber *et al.*, 2000).

Coenye *et al.* (2000) fizeram a comparação das sequências da região 16S rDNA de *Pseudomonas antimicrobica* e constataram que ela pertencia ao grupo *Burkholderia*. Posteriormente sua hibridização DNA-DNA confirmou que *P. antimicrobica* e *B. gladioli* representam a mesma espécie. Segundo Matssura (1998) é difícil encontrar substâncias inibidoras para este grupo, o que está de acordo com a resistência observada para estas bactérias nos resultados obtidos pelo antibiograma realizado.

Utilizando linhagens de *B. gladioli* oriundas de seringueira (*Hevea brasiliensis*), de mandioca (*Manihot esculenta* (cassava) e de bananeira (*Musa* sp), conservadas em uma biblioteca genômica, Reiter *et al.* (2000) realizaram uma triagem sobre atividade esterolítica e constataram uma homologia significativa entre as enzimas produzidas por elas e pelos vegetais das quais foram isoladas. Weber *et al.* (2000) selecionaram bactérias diazotróficas isoladas de bananeiras (*Musa* spp.) e avaliaram sua influência no crescimento de mudas micropropagadas. As bananeiras cv. caipira cresceram melhor com os inóculos de *Burkholderia*.

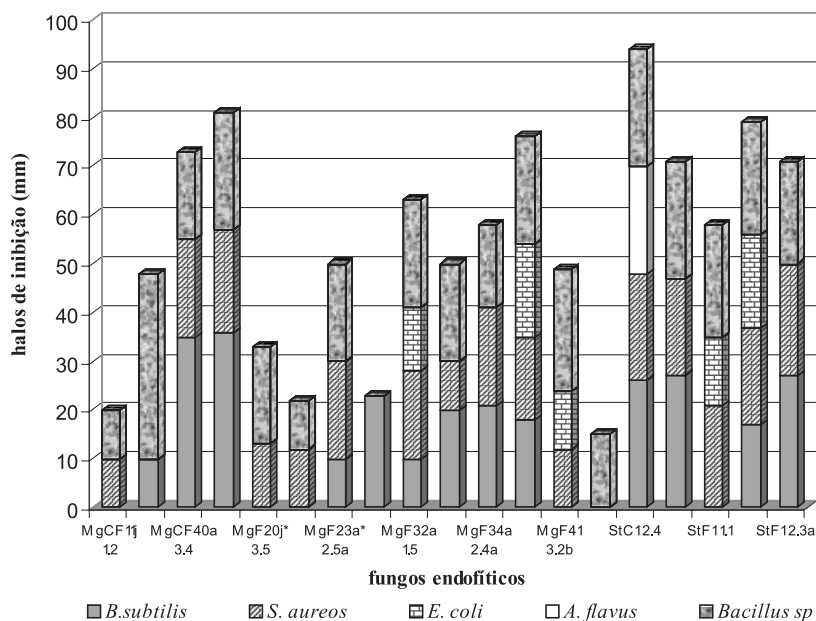
Até pouco tempo se desconhecia a importância das bactérias diazotróficas, que utilizam o nitrogênio como fonte de seu metabolismo. Com o início da chamada “Revolução Verde” começaram os estudos com estas bactérias ligadas ao solo e mais recentemente com as oriundas das partes aéreas das plantas, tendo sido comprovado que 60% do nitrogênio fixado pela cana-de-açúcar é resultado do metabolismo das bactérias endofíticas da parte aérea (Baldani, 1996). A afinidade com as plantas pode fazer de *Burkholderia* spp. um possível vetor para introdução de genes de interesse.

## Atividade Antibiótica dos Metabólitos Extracelulares

Os microrganismos podem produzir uma variedade muito grande de metabólitos tanto primários quanto secundários, incluindo enzimas (Stamford *et al.*, 1998), aminoácidos (Kleinkauf & Von Dohren, 1990), vitaminas, antibióticos, pigmentos (Demain, 1992), agentes moduladores de respostas imunológicas (Trilli *et al.*, 1978), toxinas (Bach & Kimati, 1999), agentes anti-tumorais (Wang *et al.*, 2000), fatores de crescimento de plantas (Alexopoulos, 1996), anti-helmínticos (Rodrigues *et al.*, 2000) e anti-micóticos (Li *et al.*, 2001; Li & Strobel, 2001).

Dos líquidos metabólicos das 79 linhagens de fungos endofíticos selecionadas para os ensaios de antagonismo *in vitro*, 19 (24,05%) apresentaram atividades antagonônicas contra um ou mais microrganismo-teste utilizados nestes ensaios (Tabela 3; Figuras 1, 2 e 3). *Candida albicans* e *Trichoderma* sp. não foram inibidos pelos metabólitos de nenhuma das linhagens selecionadas. Em alguns casos os metabólitos ao invés de inibir o crescimento das bactérias ocasionaram sua maior propagação, fato também observado por Araújo (1996) ao realizar ensaios de culturas pareadas entre bactérias endofíticas, isoladas de citrus, com diferentes fungos.

Espécies de *Xylaria* são naturalmente encontradas em árvores mortas como saprófitas (Hanlin & Menezes, 1996). Pereira (1993) relata com base nos trabalhos de Rodrigues & Samuels (1990) e Rodrigues & Samuels (1992) que espécies de *Xylaria* são isoladas de plantas tropicais com maior frequência que de plantas de clima temperado, sendo capazes de sintetizar celulasas e ligninases e podendo atuar como



**Figura 1** - Resultado dos ensaios de antagonismo *in vitro* pelos metabólitos extracelulares de linhagens fúngicas endofíticas de *S. cogens* (St) e *P. longiflora* (Mg) a diferentes microrganismos-teste.

patógenos latentes ou como decompositores. Em trabalho recente na Alemanha, Stadler *et al.* (2001) isolaram do estroma de *Daldinia concentrica*, ascomiceto da família Xylariaceae (mesma família de *Xylaria*), o triterpenoide concentricol. Eles ainda relatam que, recentemente, um grupo de pesquisadores japoneses descobriu mais de 20 novos metabólitos, produzidos por duas espécies de *Daldinia* no Japão. Os metabólitos secundários de espécies europeias e americanas deste grupo tem sido muito bem investigado.

Outro importante trabalho realizado com *Xylaria* sp. envolve a descoberta de um novo sesquiterpenoide que inibe a enzima integrase do vírus HIV-1, uma das três responsáveis por sua replicação. Esta enzima está ausente no homem, parecendo ser muito específica do HIV-1 sendo, portanto, um alvo potencial para o desenvolvimento de agentes anti-HIV de alta seletividade (Singh *et al.*, 1999). Embora a linhagem de *Xylaria* (MgF8a 2.3), isolada de *P. longiflora*, tenha apresentado fraca ação antibiótica contra *Bacillus* sp. seria importante no futuro desenvolver pesquisas envolvendo este gênero.



Figura 2: Halos de inibição a *Bacillus* sp. pelos metabólitos de fungos endofíticos de *P. longiflora*. (3,4,10,11,12 e 13) e *S. cogens* (1, 2 e 5).

Fungos do gênero *Trichoderma* tem sido isolados de solos e também como endofítico, porém com menor frequência. Suas linhagem têm sido relatadas pelo antagonismo *in vitro* a diversos fungos, entre eles: *Sclerotium rolfsii* agente causador da podridão seca do talo do tabaco (Velásquez & Pineda, 1995),

Tabela 3 - Halos de inibição provocados pelos metabólitos extracelulares de 19 linhagens de fungos endofíticos para diferentes microrganismos-teste.

Linhagem		Microrganismos-Teste				
		1	2	3	4	5
*MgCF11j 1.2	Não identificada	10 <sup>⊕</sup>	0	10	0	0
MgCF38 3.1b	Não identificada	38	10	0	0	0
MgCF40a 3.4	<i>Colletotrichum</i> sp.	18	35	20	0	0
MgF20j* 3.1a	<i>Colletotrichum</i> sp.	24	36	21	0	0
MgF20i 3.5	Não identificada	20	0	13	0	0
MgF22a 1.4	Não identificada	10	0	12	0	0
MgF23a* 2.5a	Não identificada	20	10	20	0	0
MgF24a 2.3a	Não identificada	0	23	0	0	0
MgF32a 1.5	<i>Aspergillus niger</i>	22	10	18	13	0
MgF33a 2.2	Não identificada	20	20	10	0	0
MgF34a 2.4a	<i>Aspergillus niger</i>	17	21	20	0	0
MgF40a* 3.1b	<i>Aspergillus niger</i>	22	18	17	19	0
MgF41 3.2b	Não identificada	25	0	12	12	0
MgF8a 2.3	<i>Xylaria</i> sp.	15	0	0	0	0
StC1 2.4	<i>Trichoderma</i> sp.	24	26	22	0	22
StC1 4.5	Não identificada	24	27	20	0	0
StF1 1.1	Não identificada	23	0	21	14	0
StF1 1.5a	<i>Aspergillus niger</i>	23	17	20	19	0
StF1 2.3a	<i>Trichoderma</i> sp.	21	27	23	0	0
Total		18	13	16	5	1
Percentagem relativa de linhagens com atividade entre as 79 ensaiadas.		22,74%	16,45%	20,25%	6,33%	1,26%

⊕ Halos de inibição em mm. 1= *Bacillus* sp.; 2= *B. subtilis*; 3= *Staphylococcus aureus*; 4= *Escherichia coli*; 5= *Aspergillus flavus*.

*Verticillium dahliae* causador da murcha verticilar na cultura de beringela (Martins-Cordeiro & Melo, 1998) e, recentemente, *Crinipellis pernicioso*, agente causal da vassoura de bruxa, doença que dizima as culturas de cacau. Entretanto, não são todas as linhagens de *Trichoderma* que apresentam atividade antibiótica, pois esta capacidade pode variar de indivíduo para indivíduo ou mesmo estar ausente como ocorreu com outras linhagens de *Trichoderma* testadas durante este trabalho. A linhagem de *Trichoderma* StC1 2.4, isolada do caule de *S. cogens*, além de apresentar atividade antibiótica contra *E. coli* foi a única a inibir o crescimento de *A. flavus* (Figura 3A). Futuras investigações serão realizadas com StC1 2.4, devido o potencial farmacológico da planta hospedeira e do endófito.

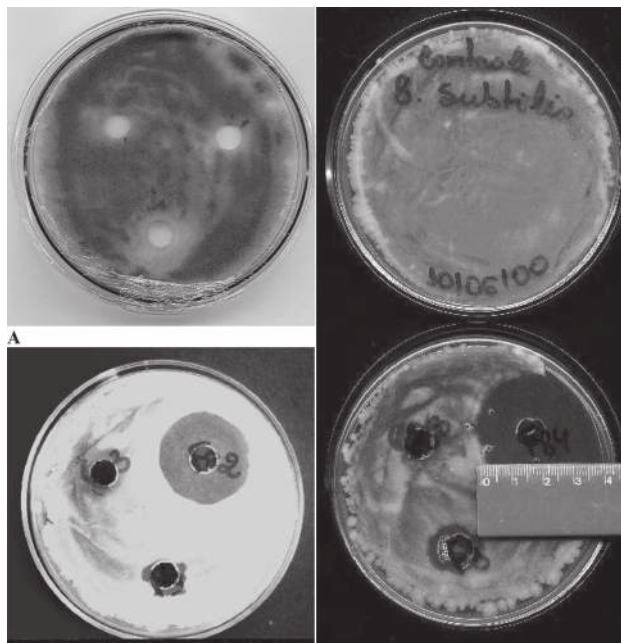
O grupo *Aspergillus* compõe-se das principais espécies de microrganismos produtores de enzimas de interesse alimentício, com utilidades tais como a clarificação de sucos de frutas (pectinases), fabricação de xaropes (amilases) (Peppler & Reed, 1988) e a produção do ácido cítrico (Azevedo, 1997). São também descritos como produtores de micotoxinas junto com as espécies de *Fusarium* (Mallozi & Corrêa, 1998) sendo, portanto, de interesse tanto econômico quanto médico. As linhagens isoladas de *P. longiflora* e de *S. cogens* apresentaram atividade antibiótica para às linhagens-teste de *Bacillus* sp., *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, enquanto que uma linhagem controle de *Aspergillus niger*, isolada da atmosfera, não apresentou atividade. Tais resultados ratificaram a importância da escolha do hospedeiro, pois durante a coevolução do endófito e de seu hospedeiro pode ocorrer a transferência de gens (Azevedo, 1998).

O gênero *Colletotrichum* está relacionado à pinta preta e à antracnose do guaraná. Hong Lu *et al.* (2000), na China, conseguiram isolar de *Colletotrichum* sp. um novo metabólito bioativo para inibição de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina lutea* e *Pseudomonas* sp. Este microrganismo tinha sido isolado de *Artemisia annua*, planta medicinal de onde se extrai a artemisinina, droga antimalárica. De *Artemisia mongolica* foi isolado *Colletotrichum gloeosporioides* com as mesmas atividades acima citadas para *Colletotrichum* sp. (Zou *et al.*, 2000; Hong Lu *et al.*, 2000). Coincidentemente, duas linhagens de *Colletotrichum* sp. aqui ensaiadas apresentaram atividades antibióticas frente a *Bacillus* sp., *B. subtilis* (Figura 3 B e C) e *Staphylococcus aureus* (Tabela 3).

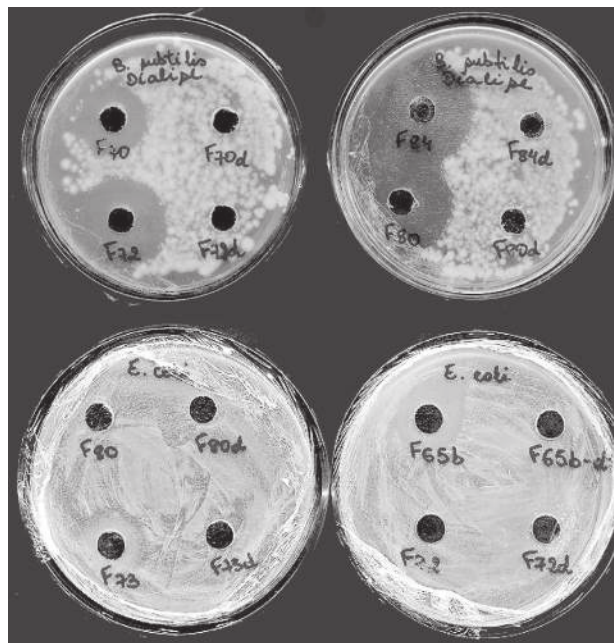
### Diálise dos Metabólitos Extracelulares

Os líquidos metabólicos das oito linhagens de endófitos consideradas as mais promissoras através dos bioensaios foram dialisados com o objetivo de avaliar o tamanho das moléculas responsáveis pela atividade antimicrobiana. Dessas linhagens quatro eram do grupo *Aspergillus niger*, duas *Colletotrichum* sp., uma *Trichoderma* sp. e uma está em fase de classificação (StC1 4.5).

Após a diálise os líquidos retidos, foram recolhidos e submetidos aos ensaios antimicrobianos. Todos perderam a atividade antagonista, enquanto os controles, líquidos metabólicos não dialisados, mantiveram-se ativos (Figura 4).



**Figura 3** - Halos de inibição de metabólitos dos fungos endofíticos. A: Halos de *Trichoderma* sp. (StC1 2.4) contra *Aspergillus flavus*; B e C: Halos de *Colletotrichum* spp. (MgCF40a 3.4 e MgF20)\*3.1\*) contra *Bacillus subtilis*.



**Figura 4** - Comprovação da perda de atividade anti-microbiana dos líquidos metabólicos dialisados (d após o código) em contraste aos não dialisados contra os microrganismos-teste.



Com base nos resultados das diálises pôde-se inferir que os metabólitos extracelulares bioativos produzidos por estas oito linhagens possuem peso molecular menor que 12.000 daltons, porém, não foi possível saber exatamente quais substâncias apresentam atividades antibióticas. Com este objetivo, estudos químicos de algumas dessas linhagens estão em andamento e novos testes antimicrobianos com estas e outras linhagens-teste serão realizados.

Por fim, pretende este trabalho ser uma contribuição para a compreensão das interações endófitos/plantas e abrir novas perspectivas sobre o potencial biotecnológico dos microrganismos endofíticos de plantas da Amazônia, praticamente inexplorada neste campo, porém, como constatado, com grandes potencialidades.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Amazonas e à Universidade Federal de São Carlos pelo convênio com a Pós-graduação em Genética e Evolução. À Dra. Charlotte Taylor do Missouri Botanical Garden, pela identificação do material botânico de *Palicourea longiflora*. Ao Dr. Itamar Soares de Melo da EMBRAPA, à Marinês Rodrigues e ao Prof. Januário Santos do Departamento de Microbiologia da UFAM, pelas linhagens de microrganismos testadores cedidas. À Dra. Suzilei França da UNAERP e ao Prof. Isaac Leews da FAGED/UFAM pelo abstract. Ao Dr. Webber, do Laboratório de Botânica da UFAM, pela ajuda na localização de *P. longiflora*. À CAPES pelo apoio financeiro.

## BIBLIOGRAFIA CITADA

- Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W. 1996. *Introductory Mycology*. 4th edition. John Wiley & Sons INC, USA. 869p.
- Araújo, W. L. 1996. *Isolamento, Identificação e Caracterização Genética de Bactérias Endofíticas de Porta-Enxertos de Cítricos*. Dissertação de Mestrado, ESALQ. Piracicaba, São Paulo. 111p.
- Azevedo, J.L. 1997. Fungos – Genética e Melhoramento de Fungos na Biotecnologia. *Biotecnologia, Ciência; Desenvolvimento*, 1:12-15.
- Azevedo, J.L. 1998. Microrganismos Endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.) *Ecologia Microbiana*. Ed. EMBRAPA, Jaguariúna-SP. p.117-137.
- Azevedo, J. L.; Costa, S. O. P. 1973. *Exercícios Práticos de Genética*. Companhia Editora Nacional – EDUSP, São Paulo-SP. 288 p.
- Bach, E.E.; Kimati, H. 1999. Purification and Characterization of Toxins from Wheat Isolates of *Drechslera tritici-repentis*, *Bipolaris bicolor*, and *Bipolaris sorokiniana*. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 5(2): 184-199.
- Baldani, V.L.D. 1996. *Efeito da Inoculação de Herbaspirillum spp. no Processo de Colonização e Infecção de Plantas de Arroz, e Ocorrência e Caracterização Parcial de uma Nova Bactéria Diazotrófica*. Tese de Doutorado, UFRJ. Seropédica, Rio de Janeiro. 238p.
- Belota, E.L. 1994. *Interação de Bactérias Diazotróficas e Fungos Micorrízicos Arbusculares na Cultura da Mandioca (Manihot esculenta Crants)*. Tese de Doutorado, UFRJ. Itaguaí, Rio de Janeiro. 281p.
- Belém-Pinheiro, M. L. 2000. *Contribuição ao Estudo Fitoquímico do Gênero Strychnos da Flora Amazônica*. Tese de Doutorado, UFC. Fortaleza, Ceará. 260p.
- Benvivino, A.; Tabacchioni, S.; Chiarini, L.; Carusi, M.V.; Del-Gallo, M.; Visca, P. 1994. Phenotypic Comparison Between Rhizosphere and Clinical Isolates of *Burkholderia cepacia*. *Microbiology*, 140: 1069-1077.
- Castellani, A. 1939. Viability of Mold Culture of Fungi in Distilled Water. *J. Trop. Med. Hyg.*, 42: 225.
- Clay, K. 1988. Fungal Endophytes of Grasses: a Defensive Mutualism Between Plants and Fungi. *Ecology*, 69: 10-16.
- Coenye, T.; Gillis, M.; Vandamme, P. 2000. *Pseudomonas antimicrobica* Attafuah and Bradbury 1990 is a Junior Synonym of *Burkholderia gladioli* (Severini 1913) Yabuuchi et al. 1993. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(6): 2135-2139.
- Cordeiro Neto, F.; Dietrich, S. M. C. 1992. Phytoalexin Induction by Leaf-Surface Fungi of Tropical Rubiaceae. *Ciência e Cultura*, 44(45): 342-344.
- Demain, A. 1992. Microbial Secondary Metabolism: a New Opportunity for Industry. *Ciba Foundation Symposium*. 3-23.
- D'Mello, J. P. F.; Macdonald, A. M. C. 1997. Mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 69: 155-166.
- Duarte, M. L. R.; Albuquerque, F. C.; Corrêa, M. P. F. 1995. Variações Morfológicas e Fisiológicas em Isolamentos de *Colletotrichum guaranicola*. *Fitopatologia Brasileira*, 20: 141-144.
- Etchegary, A. 1998. Biossíntese de Antibióticos Peptídicos em Microrganismos. In: Melo, I. S.; Azevedo, J. L. (Eds.) *Ecologia Microbiana*. Ed. EMBRAPA, Jaguariúna-SP. p. 393-419.
- Fahey, J. W. 1988. Endophytic Bacteria for the Delivery of Agrochemicals to Plants. In: Cutler, H. O. (Ed.) *Biologically Active Natural Products. Potential Use in Agriculture*. American Chemical Society Symposium Ser, Washington. p.120-128.
- Fungaro, M. H. P. 2001. PCR na Micologia – Diagnóstico e Análise de Variabilidade. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, 14: 12-16.
- Galvão, R. M. S.; 1998. *Variabilidade Genética Detectada por RAPD em Glomerella cingulata, um dos fungos endofíticos mais frequentes, isolados de Theobroma grandiflorum, Pueraria phaseoloides e Scleria pterota*. Dissertação de Mestrado, UFSCar/UFAM. Manaus, Amazonas. 151p.
- Gillis, M.; Van V. T.; Bardin, R.; Goor, M.; Hebbard, P.; Willems, A.; Segers, P.; Kersters, K.; Heulin, T.; Fernandez M. P. 1995. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N<sub>2</sub>-fixing isolates from rice in Vietnam. *International journal of Systematic Bacteriology*, 45(2): 274-289.

- Glienke-Blanco, C.; 1999. Guignardia citricarpa *Kiely*: Análise genética cariótica e interação com o hospedeiro. Tese de Doutorado. ESALQ. Piracicaba, São Paulo. 200p.
- Gorniak, S. J.; Palermo-Neto, J.; Souza-Spinosa, H. 1989. Effects of a *Palicourea marcgravii* Leaf Extract on Some Dopamine-Related Behaviors of Rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 28: 329-335.
- Guimarães, V. C. 1998. Isolamento de fungos endofíticos do hospedeiro Paulinia cupana H.B.K. var. sorbilis (Mart) Ducke e análise da variabilidade genética, detectada por marcadores RAPD, no endófito Glomerella cingulata. Dissertação de Mestrado, UFSCar/UFAM. Manaus, Amazonas. 115p.
- Hallmann, J.; Sikora, R.A. 1996. Toxicity of Fungal Endophyte Secondary Metabolites to Plant Parasitic Nematodes and Soil-Borne Plant Pathogenic Fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 102: 155-162.
- Hanlin, R.T.; Menezes, M. 1996. Gêneros ilustrados de ascomicetos. UFRPe. Recife-PE. 274p.
- Hong Lu; Zou, W.X.; Meng, J. C.; Hu, J.; Tan, R. X.. 2000. New Bioactive Metabolites Produced by *Colletotrichum* sp., an Endophytic Fungus in *Artemisia annua*. *Plant Science*, 151: 67-73.
- Kawamoto, S. O.; Lorbeer, J. W. 1976. Protection of Onion Seedling from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* by Seed and Soil Infestation with *Pseudomonas cepacia*. *Plant Dis.*, 60: 189-191.
- Kleinkauf, H.; Von Dohren, H. 1990. Biosynthesis of Peptide Antibiotics. *European Journal of Biochemistry*, 192: 1-15.
- Krukoff, B.A. 1972. American Species of *Strychnos*. *Lloydia*, 35(3): 193-271.
- Li, J.Y.; Strobel, G.A. 2001. Jesterone and Hydroxy-Jesterone Antioomycete Cyclohexenone Epoxides From the Endophytic Fungus *Pestalotiopsis jesteri*. *Phytochemistry*, 57(2): 262-265.
- Li, J.Y.; Harper, J. K.; Grant, D. M.; Tombe, B. O.; Bashyal, B.; Hess, W. M.; Strobel, G. A. 2001. Ambuic Acid, a Highly Functionalized Cyclohexenone with Antifungal Activity from *Pestalotiopsis* spp. and *Monochaetia* sp. *Phytochemistry*, 56(5): 463-468.
- Mallozi, M.A.B.; Corrêa, B. 1998. Fungos Toxigênicos e Micotoxinas. *Boletim Técnico*. Instituto de Biologia. Campinas-SP. 12: 26p.
- Martins-Cordeiro, M. P.; Melo, I. S. 1998. Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. e *Verticillium dahliae* Kleb. *Scientia Agricola*. 55(1): 1-7.
- Matssura, T. 1998. Ocorrência de Actinomicetos Endofíticos Produtores de Antibióticos Isolados de Folhas e Raízes de Feijão Caupi (*Vigna unguiculata*). Dissertação de Mestrado, UFPe. Recife, Pernambuco. 69p.
- Murray, F. R.; Latch, G. C. M.; Scott, D. B. 1992. Surrogate transformation of perennial ryegrass, *Lolium perenne*, using genetically modified *Acremonium* endophyte. *Molecular General Genetics*, 233: 1-9.
- Pavan, C.; Moreira-Filho, C. 1998. Nitrogen-fixing bacteria in agronomy, and in biodiversity. *Biotechnology, Ciência & Desenvolvimento*, 4: 1-3.
- Peppler, H. J.; Reed, G. 1987. Enzymes in food on feed processing. In: Rehm, H.J.; Reed, G.; Kennedy, J. F. (Eds). *Biotechnology*. Vol. 7a. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH. p. 547-603.
- Pereira, J.O.; Azevedo, J.L.; Petrini, O. 1993. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a first report. *Mycologia*, 85: 362-364.
- Pereira, J.O. 1993. *Fungos Endofíticos dos Hospedeiros Tropicais*. Tese de Doutorado, ESALQ. Piracicaba, São Paulo. 104p.
- Petrini, O. 1991. Fungal endophyte of tree leaves. In: Andrews, J.; Hirano, S. S. (Eds). *Microbial Ecology of Leaves*. New York. Springer Verlag. p.179-197.
- Quetin-Leclercq, J.; Angenot, L.; Bisset, N. G. 1990. South american *Strychnos* species, ethnobotany (except curare) and alkaloid screening. *Journal of Ethnopharmacology*, 28: 1-52.
- Reiter, B.; Glieder, A.; Talker, D.; Schwab, H. 2000. Cloning and characterization of EstC from *Bukrholderia gladioli*, a Novel-type esterase related to plant enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(6): 778-785.
- Rodrigues, K. F.; Samuels, G. J. 1990. Preliminary study of endophytic fungi in a tropical palm. *Mycological Research*, 94: 827-830.
- Rodrigues, K. F.; Samuels, G. J. 1992. *Idriella* species endophytic in palms. *Mycotaxon*, 43: 271-276.
- Rodrigues, K. F.; Hesse, M.; Werner, C. 2000. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by endophytic fungi from *Spondias mombin*. *Journal Basic Microbial*, 40(4): 261-267.
- Rodrigues, K.f.; Dias-Filho, M.B. 1996. Fungal endophytes in the tropical grasses *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *B. humidicola*. *Pesq. Agropec. Bras*, 31(12): 905-909.
- Singh, S.b.; Zink, D.; Polishook, J.; Vaentino, D.; Shafiee, A.; Silverman, K.; Felock, P.; Teran, A.; Vilella, D.; Hazuda, D.j.; Lingham, R.b., 1999. Structure and absolute stereochemistry of HIV-1 integrase inhibitor integric acid, a novel eremophilane sesquiterpenoid produced by a *Xylaria* sp. *Tetrahedron Letters*, 40: 8775-8779.
- Souza, L. P.; Astolfi Filho, S.; Pereira, J.O. 2001. Diversidade bacteriana endofítica de diferentes plantas tropicais. *Resumos da 7ª Reunião Especial da SBPC*. Manaus-AM.
- Stadler, M.; Baumgatner, M.; Grothe, T.; Muhlbauer, A.; Seip, P.; Wollweber, H. 2001. Concentricol, a taxonomically significant triterpenoid from *Daldinia concentrica*. *Phytochemistry*, 56(8): 787-793.
- Stamford, T. L. M.; Araújo, J. M.; Stamford, N. P. 1998. Atividade enzimática de microrganismos isolados do Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). *Ciênc. Tecnol. Aliment*. 18(4): 382-385.
- Stierle, A.; Strobel, G.; Stierle, D. 1993. Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreane*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew. *Science*, 260: 214-216.
- Strobel, G. A.; Miller, R. V.; Martinez-miller, C.; Condrón, M. M.; Teplow, D. B.; Hess, W. M.. 1999. Cryptocandin, a potent antimycotic from the Endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. *Microbiology*. 17: 417-423.

- Tokarnia, C. H.; Dobereiner, J.; Silva, M. F. 1979. *Plantas Tóxicas da Amazônia a Bovinos e outros herbívoros*. Manaus-AM-Brasil, 94p.
- Trilli, V.; Michilini, V.; Montovani, V.; Pirt, S.J. 1978. Development of the agar disk method for the rapid selection of cephalosporin producers with improved yields. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 13(1): 7-13.
- Velásquez, J. & Pineda, J. 1995. Antagonismo "in vitro" de cinco aislamientos de *Trichoderma barziamum* vs. *Sclerotium rolfsii* Sacc. VII Jornada de Investigación -BIOAGRO (Edición especial) Barquisimeto, Venezuela. <http://pegasus.ucla.edu.ve/cc/resumen/agronomia/r60ag.htm>.
- Volksch, B.; Ullrich, M.; Fritsche, W. 1992. Identification and population dynamics of bacteria in leaf spots of soybean. *Microbial Ecology*, 24: 305-311.
- Wang, J.; Li, G.; Lu, H.; Zheng, Z.; Huang, Y.; Su, W. 2000. Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. *FEMS-Microbiology Letters*, 193: 249-253.
- Weber, O.b.; Baldani, J.i.; Dobereiner, J. 2000. Bactérias diazotróficas em mudas de bananeira. *Pesq. Agropec. Bras.*, 35(11): 2277-2285.
- Whitby, P. W.; Pope, L. C.; Carter, K. B.; Lipuma, J. J.; Stull, T. L. 2000. Species-specific PCR as a tool for the identification of *Burkholderia gladioli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(1): 282-285.
- Zou, W. X.; Meng, J. C.; Lu, H.; Chen, G. X.; Shi, G. X.; Zhang, T. Y.; Tan, R. X. 2000. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. *Journal of Natural Products*, 63(11): 1529-1530.

**RECEBIDO EM 14/11/2002**

**ACEITO EM 06/04/2004**

