



Universidade Estadual de Campinas  
Faculdade de Engenharia de Alimentos  
Departamento de Ciência de Alimentos

Caracterização taxonômica de actinomicetos  
endofíticos produtores de antibióticos isolados de  
cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.)

**Takeshi Matsuura**

Orientador: Dr. Gilson Paulo Manfio

Co-orientador: Dra. Valéria Maia de Oliveira

Tese apresentada à Faculdade  
de Engenharia de Alimentos da  
Universidade Estadual de  
Campinas para obtenção do  
Título de Doutor em Ciências de  
Alimentos.

Campinas, SP  
2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

M429c Matsuura, Takeshi  
Caracterização taxônomica de actinomicetos endofíticos produtores de antibióticos isolados de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum* Schum.) / Takeshi Matsuura. – Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Gilson Paulo Manfio  
Co-orientador: Valéria Maia de Oliveira  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Actinomicetos. 2.Taxonomia. 3.Endofíticos. 4.Isolamento.  
5.Cupuaçu. I.Manfio, Gilson Paulo. II.Oliveira, Valéria Maia de. III.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV.Título.

CARS-FEA

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Gilson Paulo Manfio (Orientador)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Paula Trovatti Uetanabaro (Titular)

---

Dr<sup>a</sup> Lara Durães Sette (Titular)

---

Dr<sup>a</sup> Marta Cristina Teixeira Duarte (Titular)

---

Dr<sup>a</sup> Suzete Aparecida Lanza Destéfano (Titular)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Helena Teixeira de Godoy (Suplente)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Janete Magali de Araújo (Suplente)

“O maior de todos os perigos para a maioria de nós,  
não é que nosso objetivo seja muito alto e nós deixemos de alcançá-lo,  
mas que seja muito baixo e nós consigamos alcançá-lo”.

Michelangelo Buonarroti  
(1475 - 1564)

A G R A D E Ç O a Deus, por me permitir sonhar...

D E D I C O aos meus pais, Fusae e Nobuji Matsuura, à minha irmã, Miharu M. Matsuura, pelo apoio e incentivos.

O F E R E Ç O à minha esposa, Ani Beatriz Jackisch Matsuura, pelo amor, amizade e incentivos para ultrapassar mais esta etapa de minha vida.

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Gilson Paulo Manfio pela orientação, amizade e paciência durante a realização deste trabalho;

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), Departamento de Ciência de Alimentos, representada pela Coordenação e Secretaria do Curso de Doutorado em Ciência de Alimentos, por toda ajuda durante o desenvolvimento do curso;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da Bolsa de Estudo;

À Pró-Reitoria para Pesquisa e Pós-graduação - Departamento de Pós-Graduação da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), pela orientação técnica na concessão da Bolsa de Estudo;

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gláucia Maria Gleibe de Oliveira, minha eterna gratidão pelos muitos incentivos à minha formação científica e acadêmica;

Aos professores Januário Gama dos Santos e Paulo César Montenegro, do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Amazonas pelo apoio na realização deste Curso;

Ao Instituto Biológico, Setor de Bacteriologia, pela oportunidade de poder executar parte do trabalho;

Aos professores do Curso de Doutorado em Ciência de Alimentos pelos ensinamentos transmitidos;

Aos queridos amigos Ana Paula, Aline, Cleber, Fabiana, Fernanda, Lara e Valéria pelos momentos alegres e companheirismo;

Aos demais amigos que foram à energia extra necessária para ultrapassar mais esta etapa de minha vida;

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

## SUMÁRIO

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>vi</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>ix</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>x</b>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<b>xi</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>xii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>xiii</b>
<b>1 Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Objetivos</b> .....	<b>2</b>
2.1 Objetivos específicos .....	2
<b>3 Revisão de Literatura</b> .....	<b>3</b>
3.1 Cupuaçuzeiro .....	3
3.2 Actinomicetos .....	5
3.2.1 <i>Actinomicetos Endofíticos</i> .....	7
3.3 Aplicações biotecnológicas dos actinomicetos endofíticos .....	10
3.3.1 <i>Produção de antibióticos e outros metabólitos secundários</i> .....	10
3.3.2 <i>Fixação biológica de nitrogênio</i> .....	12
3.3.3 <i>Controle biológico</i> .....	13
<b>4 Material e Métodos</b> .....	<b>15</b>
4.1 Cultivo e amostragem de plantas de cupuaçu .....	15
4.2 Isolamento de actinomicetos endofíticos .....	15
4.3 Caracterização de atividade antimicrobiana .....	16
4.4 Caracterização taxonômica convencional .....	17
4.5 Caracterização molecular .....	18
4.5.1 <i>Extração de DNA genômico</i> .....	18
4.5.2 <i>Amplificação do rDNA 16S</i> .....	18
4.5.3 <i>Análise de restrição do rDNA 16S (ARDRA)</i> .....	19
4.5.4 <i>Seqüenciamento de rDNA 16S</i> .....	19
4.5.5 <i>Análise filogenética</i> .....	20

<b>5</b>	<b>Resultados e Discussão</b>	<b>21</b>
5.1	Isolamento de actinomicetos endofíticos	21
5.2	Caracterização de atividade antimicrobiana	22
5.3	Caracterização taxonômica e identificação dos actinomicetos	27
5.3.1	<i>Análise de Restrição do rDNA Amplificado (ARDRA)</i>	29
5.3.2	<i>Sequenciamento do rDNA 16S e Análise filogenética</i>	34
<b>6</b>	<b>Conclusões</b>	<b>40</b>
<b>7</b>	<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>41</b>
<b>8</b>	<b>Apêndice</b>	<b>51</b>
8.1	Meios de Culturas	51
8.1.1	<i>Ágar Amido-Caseína (AC)</i>	51
8.1.2	<i>Ágar Extrato de Levedura-Extrato de Malte (ISP 2)</i>	51
8.1.3	<i>Ágar Extrato de Levedura-Extrato de Malte modificado (ISP 2A)</i>	52
8.1.4	<i>Ágar Farinha de Aveia (ISP 3)</i>	52
8.1.5	<i>Ágar Müeller-Hinton (MH)</i>	52
8.1.6	<i>Ágar Peptona-Extrato de levedura-Ferro (ISP 6)</i>	52
8.1.7	<i>Ágar Rafinose-Histidina (RH)</i>	53
8.1.8	<i>Ágar Sabouraud (SAB)</i>	53
8.1.9	<i>Ágar Sais Inorgânicos-Amido (ISP 4)</i>	53
8.1.10	<i>Ágar Soja-Trypticaseína (CASOY)</i>	53
8.1.11	<i>Ágar Tirosina (ISP 7)</i>	54
8.1.12	<i>Meio 1 (M1)</i>	54
8.2	Soluções	54
8.2.1	<i>Solução I</i>	54
8.2.2	<i>Solução II</i>	55
8.2.3	<i>Solução de traços de sais</i>	55

## LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Ágar Amido-Caseína
CASOY	Caldo Soja-Trypticaseína
CCT	Coleção de Cultura Tropical
DAUFPE	Departamento de Antibióticos da UFPE
ISP	International <i>Streptomyces</i> Project
M1	Meio 1
RH	Ágar Rafinose -Histidina
SAB	Ágar Sabouraud
UFC	Unidades formadoras de colônias

## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Cupuaçuzeiro ( <i>Theobroma grandiflorum</i> ) em cultivo racional.....	3
Figura 3.2. Cupuaçu na planta (A) e fruto aberto com polpa exposta (B).....	4
Figura 3.3. Arranjo das sementes de cupuaçu quando envoltas pela polpa.....	4
Figura 5.1. Ensaio de atividade antifúngica contra <i>Candida albicans</i> (A) e <i>Aspergillus flavus</i> (B).....	24
Figura 5.2. Perfis de ARDRA de linhagens selecionadas obtidos com as enzimas <i>Alu</i> I (A), <i>Dde</i> I (B), <i>Hae</i> III (C) e <i>Rsa</i> I (D).....	29
Figura 5.3. Perfis de ARDRA de linhagens representantes dos perfis majoritários obtidos com as enzimas <i>Msp</i> I (A), <i>Sau</i> 3A I (B) e <i>Taq</i> I (C).....	30
Figura 5.4. Relação filogenética entre <i>Streptomyces</i> endofíticos de plântulas de cupuaçuzeiro baseada na análise de seqüências de rDNA 16S (método de distância, Neighbour-Joining; valores de <i>bootstrap</i> >70% indicados nos ramos).....	37

## LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1. Isolamento dos actinomicetos conforme material amostrado e condição de isolamento.....	21
Tabela 5.2. Caracterização da atividade antibiótica apresentada pelos actinomicetos endofíticos, em meio sólido e em meio líquido.....	23
Tabela 5.3. Características macro e micromorfológicas dos actinomicetos isolados. ....	27
Tabela 5.4. Compilação dos perfis de restrição apresentados pelos actinomicetos endofíticos testados. ....	31
Tabela 5.5. Similaridade das seqüências de rDNA 16S obtidas para os isolados selecionados com seqüências de organismos relacionados da base de dados GenBank.....	34

## RESUMO

Plântulas de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) cultivadas a partir de sementes na Universidade Federal do Amazonas (Manaus, AM) foram amostradas com 15, 30, 45 e 60 dias após germinação para análise da microbiota bacteriana endofítica associada. Após esterilização de superfície de folhas e raízes, seguido de plaqueamento nos meios (ISP 2 com amido, ágar amido-caseína e ágar rafinose-histidina) e incubação a 30°C, foram isoladas 52 linhagens de actinomicetos endofíticos. Destas, sete foram isoladas de folhas (13,5%) e 45 de raízes (86,5%). Atividade antimicrobiana avaliada em cultivos em meio sólido foi detectada em 23 linhagens (44,2%), as quais foram antagonicas para *Bacillus subtilis* (21,7%), *Escherichia coli* (17,4%), *Staphylococcus aureus* (39,1%), *Candida albicans* (30,4%) e *Aspergillus flavus* (17,4%). Em contraste, apenas seis linhagens (11,5%) mostraram atividade antimicrobiana contra *Candida albicans* quando incubadas em meio líquido. As linhagens de actinomicetos endofíticos isoladas de raízes apresentaram maior taxa de atividade antimicrobiana (87%) que os isolados de folhas (13%). A identificação clássica mostrou que a grande maioria dos isolados (42 linhagens, 80,8%) pertence ao gênero *Streptomyces*. A análise de restrição de rDNA amplificado (ARDRA) com *Alu* I, *Dde* I, *Hae* III, *Rsa* I, *Msp* I, *Sau*3A I e *Taq* I revelou a existência de 17 perfis distintos dentre estes isolados. Os dados derivados das análises de seqüências de rDNA 16S sugerem a provável existência de novas espécies de *Streptomyces* dentre as linhagens isoladas de cupuaçu.

## ABSTRACT

Cupuaçu seeds (*Theobroma grandiflorum*) planted at the Universidade Federal do Amazonas (Manaus, AM, Brazil) were harvested after 15, 30, 45 and 60 days after germination and subjected to the isolation of endophytic bacteria. Fifty two endophytic actinomycetes were isolated from surface-sterilized leaves and roots using ISP 2 medium supplemented with starch, Starch-Casein and Raffinose-Histidine Agar, after incubation at 30° C. From these, seven isolates (13.5%) were obtained from leaves and 45 (86.5%) from roots. Antimicrobial activity in solid media was detected in 23 strains (44.2%), which were antagonistic for *Bacillus subtilis* (21.7%), *Escherichia coli* (17.4%), *Staphylococcus aureus* (39.1%), *Candida albicans* (30.4%) and *Aspergillus flavus* (17.4%), whereas only six isolates (11.5%) showed activity against *Candida albicans* when grown in liquid medium. Endophytic actinomycetes isolated from roots showed higher antimicrobial activity (87%) compared to isolates from leaves (13%). Taxonomic characterization showed that the majority of isolates recovered, 42 strains (80.8%), belonged to the genus *Streptomyces*. Restriction analysis of 16S rDNA fragments (ARDRA) using *Alu* I, *Dde* I, *Hae* III, *Rsa* I, *Msp* I, *Sau*3A I and *Taq* I enzymes revealed the presence of 17 different clusters among these isolates. Phylogenetic analyses of 16S rDNA sequences suggest the existence of novel taxa amongst the endophytic streptomyces strains recovered from cupuaçu seedlings.

## 1 INTRODUÇÃO

O cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) é uma árvore que produz o cupuaçu, um dos frutos da região amazônica mais promissores para a indústria alimentícia. O fruto é muito apreciado pelo seu sabor exótico e agradável ao paladar, podendo ser consumido na forma de sucos, bombons, geléias e chocolate (cupulate).

A grande relevância industrial do cupuaçu determinou a realização do estudo das populações microbianas associadas à planta, no sentido de se conhecer os principais grupos microbianos colonizadores de diferentes órgãos (raízes e folhas) e investigar a produção de compostos bioativos pelos isolados.

Os actinomicetos são bactérias Gram-positivas com grande diversidade morfológica. Vários gêneros deste grupo contêm espécies de grande importância biotecnológica, devido à capacidade em produzir uma grande diversidade de metabólitos secundários bioativos, principalmente antibióticos. Estima-se que, dos antibióticos hoje descritos, aproximadamente 60% são originários de actinomicetos, principalmente de linhagens do gênero *Streptomyces*.

Os actinomicetos ocorrem em uma grande diversidade de hábitat, onde o solo é o mais comum, podendo também ser encontrados em associação com outros organismos, como no interior de tecidos de plantas saudáveis (endofíticos). Dados de estudos anteriores demonstraram que actinomicetos podem ser isolados de diferentes órgãos de gramíneas, leguminosas e outras plantas de cultivo agrícola, além de espécies arbóreas (*Citrus*). Assim, devido à importância deste grupo de bactérias para a indústria biotecnológica, optamos por direcionar o estudo para o isolamento seletivo de actinomicetos de cupuaçuzeiro.

## **2 OBJETIVOS**

Como objetivo geral do trabalho, pretendemos estudar a ocorrência de actinomicetos endofíticos em plântulas de cupuaçuzeiro, caracterizar a diversidade de espécies presentes nas raízes e folhas e investigar a produção de metabólitos secundários com atividade antimicrobiana pelos isolados.

### **2.1 Objetivos específicos**

- Isolar actinomicetos endofíticos de raízes e folhas de plântulas de cupuaçuzeiro em diferentes estágios de desenvolvimento, empregando diferentes meios seletivos;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos actinomicetos endofíticos isolados contra microrganismos patogênicos veiculados por alimentos e deterioradores de alimentos;
- Avaliar a diversidade dos isolados empregando o método de caracterização e tipagem molecular por análise de restrição de fragmentos de rDNA 16S (ARDRA);
- Identificar linhagens representativas em nível de gênero e/ou espécie através da análise filogenética de seqüências de rDNA 16S.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Cupuaçuzeiro

O cupuaçuzeiro (Figura 3.1), conhecido cientificamente como *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schum, é uma árvore frutífera pertencente à família Sterculiaceae. A planta adulta pode alcançar até 8 m de altura em cultivo racional ou até 18 m em bioma de mata nativa. As plantas da espécie podem alcançar 80 anos de vida e são hermafroditas (VILLACHICA, 1996).



Figura 3.1. Cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) em cultivo racional.

O fruto, o cupuaçu (Figura 3.2), é um dos mais promissores da flora amazônica. Apresenta, em geral, formato oblongo, com 30 a 40 sementes (Figura 3.3), polpa amarela ou esbranquiçada, com sabor ácido e cheiro agradável. A composição para cada 100 g de polpa é: 14,7 g de carboidratos, 1,76 g de proteínas, 1,6 g de lipídios, 23 mg de cálcio, 26 mg de fósforo, 2,6 mg de ferro, 33 mg de vitamina C, 30 mg de vitamina A e 0,04 mg de vitamina B1, com valor energético de

72 calorias. A casca do fruto é usada, em mistura com outros resíduos da agroindústria de frutas, como adubo orgânico (CALZAVARA; MULLER; KAHWAGE, 1981).

A polpa e a semente de cupuaçu apresentam multiplicidade de usos. A polpa é usada na elaboração de refrescos e na produção industrial de sorvete, néctar, bombom e iogurte, entre outros. As sementes contêm 48% de gordura comestível, semelhante à manteiga de cacau, a qual serve como matéria-prima para produção do cupulate, um alimento com valor nutritivo e sabor semelhante ao chocolate, com a vantagem de apresentar baixos teores de cafeína e teobromina. A gordura extraída das sementes também tem larga aplicação na indústria de cosméticos (CALZAVARA; MULLER; KAHWAGE, 1981).



Figura 3.2. Cupuaçu na planta (A) e fruto aberto com polpa exposta (B).



Figura 3.3. Arranjo das sementes de cupuaçu quando envoltas pela polpa.

Em função do valor comercial das sementes e frutos *in natura*, a cultura do cupuaçuzeiro ganhou, nos últimos anos, um impulso mais forte em todos os estados do Brasil e no exterior, principalmente Estados Unidos e Japão (MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR, 2003).

### 3.2 Actinomicetos

Os actinomicetos são bactérias Gram-positivas, cuja característica principal é a formação de filamentos ramificados ou hifas em algum ponto do ciclo de vida em diversos taxa, persistindo como um micélio estável ou fragmentando-se em bacilos ou cocos (HOLT *et al.*, 1994). Ocorrem em uma grande diversidade de hábitat e são capazes de crescer em uma vasta variedade de substratos. O solo é o habitat mais comum para os actinomicetos. Estima-se que se encontram numa proporção de aproximadamente um milhão de células por grama de solo. São também encontrados em água doce e marinha, tecidos animais e vegetais. A ubiqüidade dos actinomicetos em ambientes naturais é relacionada à diversidade metabólica e à evolução de mecanismos específicos de dispersão (MCCARTHY; WILLIAMS, 1990). Embora a maioria seja saprófita estrito, alguns formam associações parasíticas ou simbióticas com plantas ou animais (GOODFELLOW; WILLIAMS, 1983).

Os actinomicetos estão taxonomicamente classificados dentro do domínio Bactéria, na divisão Actinobacteria, classe Actinobacteria e ordem Actinomycetales (GARRITY; BELL; LILBURN, 2003). O gênero *Streptomyces*, família Streptomycetaceae, contém hoje o maior número de espécies, em parte devido à sua importância como fonte de novos compostos bioativos (KIM *et al.*, 2004).

Segundo Lechevalier e Lechevalier (1970), a identificação em nível de gênero requer a caracterização da micromorfologia e de componentes químicos de parede e membranas. As estruturas morfológicas utilizadas para diferenciar gêneros são: presença de micélio aéreo e/ou micélio vegetativo; formação de conídios isolados, aos pares, em cadeias curtas ou longas; presença de esporângios contendo esporos móveis ou não; formação de esporângio multilocular; e presença

de esclerócio (LECHEVALIER, 1989). Contudo, a morfologia é útil para a identificação de diversos gêneros, mas não para todos.

Considerando-se os componentes químicos celulares, a determinação dos aminoácidos presentes nas pontes peptídicas da cadeia do peptidoglicano e açúcares no hidrolisado celular são as características mais utilizadas. A análise química de marcadores celulares com fins taxonômicos é denominada quimiotaxonomia. Para a identificação de diversos grupos de actinomicetos, a análise conjunta de dados quimiotaxonômicos e morfológicos pode ser necessária (GOODFELLOW, 1989).

O uso de seqüências de rRNA para análise da filogenia e identificação representou uma revolução em sistemática bacteriana (BARRY; POWELL; GANNON, 1990). A análise filogenética de seqüências do rDNA 16S pode ser empregada para identificação de actinomicetos em nível de gênero e, em alguns casos, de espécie (GOODFELLOW; O'DONNELL, 1994).

Stackebrandt, Rainey e Ward-Rainey (1997) propuseram uma nova estrutura de classificação para os actinomicetos, baseando-se na análise do rDNA 16S, com a proposta da Classe Actinobacteria.

Segundo Vandamme *et al.* (1996), a integração de diferentes informações (fenotípica, genotípica e filogenética), conhecida como classificação polifásica, permite uma definição mais coerente dos grupos taxonômicos em bacteriologia. A aplicação da taxonomia polifásica tem gerado profundas modificações na sistemática bacteriana, especialmente no que diz respeito a grupos de importância industrial, como os actinomicetos, para os quais a taxonomia tradicional baseada na forma e bioquímica dos microrganismos apresenta grandes limitações (GOODFELLOW; ISIK; YATES, 1999).

Dentre as várias técnicas moleculares, o sequenciamento continua sendo a forma mais eficiente e rápida para a identificação de microrganismos. No entanto, a análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA) vem se destacando por permitir uma diferenciação eficiente de taxa e redução dos custos de sequenciamento. Nos últimos anos, o ARDRA tem sido umas das técnicas

moleculares mais empregada nos estudos de filogenia e taxonomia de actinomicetos (SARACCHI; QUARONI; CORBETTA, 2004; KURABACHEW *et al.*, 2003; HOPPE-SEYLER *et al.*, 2003; De BAERE *et al.*, 2002; HALL; LEWIS-EVANS; DUERDEN, 2001; HARVEY *et al.*, 2001; HALL *et al.*, 2001; ROY; SIROIS, 2000; HALL *et al.*, 1999; VANEECHOUTTE *et al.*, 1995).

### **3.2.1 Actinomicetos Endofíticos**

A maioria das informações sobre microrganismos endofíticos teve sua origem com os fungos e, posteriormente, abrangeu bactérias e actinomicetos. A redefinição de microrganismos “endofíticos” ou “endófitos”, foi proposta por Wilson (1995) como sendo: “fungos ou bactérias que, por todo ou parte do seu ciclo de vida, invadem o tecido de plantas vivas e causam infecção não-aparente ou assintomática inteiramente dentro de tecidos de plantas, mas não causam sintomas de doenças”.

Em geral, o isolamento de microrganismos endofíticos é realizado com a aplicação de métodos de esterilização de superfície dos órgãos da planta, geralmente através de imersão em substâncias químicas germicidas. Após a esterilização, os órgãos são fragmentados ou triturados, e plaqueados.

Apesar do conhecimento sobre a ocorrência de bactérias endofíticas em diferentes plantas, pouco ainda se conhece sobre os mecanismos de colonização e transferência, identidade, diversidade e níveis populacionais em diferentes tecidos. As bactérias endofíticas provavelmente desenvolvem uma íntima relação com a planta hospedeira através de processos co-evolutivos e podem influenciar a fisiologia da planta de formas ainda desconhecidas (MISAGHI; DONNDELINGER, 1990).

Segundo Quispel (1988), os microrganismos endofíticos encontram-se em um ambiente hostil nos tecidos da planta hospedeira e necessitam se proteger contra os mecanismos de defesa, incluindo enzimas e reações locais de hipersensibilidade.

Segundo Kobayashi e Palumbo (2000), os endofíticos entram nos tecidos das plantas principalmente pela raiz. Entretanto, partes aéreas das plantas, tais como estômatos, flores e cotilédones, também podem servir para sua entrada. As bactérias endofíticas normalmente residem nos espaços intercelulares, sendo raramente encontradas intracelularmente e nos tecidos vasculares sem causar

sintomas de doenças (BACON; HINTON, 1997). Acredita-se que, em geral, os microrganismos endofíticos se originem da rizosfera ou da microbiota do filoplano, embora bactérias endofíticas de cana-de-açúcar tenham sido observadas existindo predominantemente no interior do tecido da planta, mas não no solo (DÖBEREINER, 1993; HALLMANN *et al.*, 1997).

Uma comparação entre a comunidade endofítica e da rizosfera, mostrou que as populações de endofíticos representam um subgrupo de bactérias da rizosfera (MCINROY; KLOEPPER, 1995; LILLEY *et al.*, 1996; GERMIDA *et al.*, 1998; SESSITSCH *et al.*, 2002). Entretanto, bactérias que não foram encontradas na rizosfera foram encontradas na planta e, provavelmente, esses microrganismos já estavam presentes como infecções latentes dentro de tecidos das plantas (SESSITSCH *et al.*, 2002).

Vários mecanismos têm sido sugeridos como rota de transmissão de bactérias endofíticas, sendo que a mais comum parece ser a infecção via semente (MCINROY; KLOEPPER, 1995). Contudo, outros mecanismos propostos incluem a degradação local da celulose (QUADT-HALLMANN; HALLMANN; KLOEPPER, 1997) e via lesões nas junções laterais da raiz (GOUGH *et al.*, 1997).

Interações entre plantas e actinomicetos endofíticos têm sido mais extensivamente estudadas para o gênero *Frankia*, que contém espécies fixadoras de nitrogênio simbióticas de plantas não-leguminosas. Estes actinomicetos são capazes de induzir a nodulação em raízes de diversas plantas não-leguminosas (actinorrízicas) importantes em sucessões ecológicas e biorremediação (BENSON; SILVESTER, 1993).

O isolamento de actinomicetos endofíticos parece começar com Mundt e Hinkle (1976), que descreveram o isolamento de 19 gêneros de bactérias do interior de sementes e óvulos de diversas plantas, incluindo actinomicetos dos gêneros *Corynebacterium*, *Nocardia* e *Streptomyces*. O gênero mais encontrado foi *Corynebacterium*, com 35 isolados, seguido de *Nocardia* e *Streptomyces*, ambos com apenas um isolado.

O primeiro trabalho a tratar exclusivamente de actinomicetos endofíticos só foi publicado em 1992, por Sardi e colaboradores, que relataram o isolamento de 499 actinomicetos endofíticos de raízes de 28 diferentes espécies de plantas, incluindo bactérias dos gêneros *Streptomyces* (482 isolados), *Streptoverticillum* (2 isolados), *Nocardia* (4 isolados), *Micromonospora* (1 isolado) e *Streptosporangium* (1 isolado). Nove isolados não puderam ser classificados. Esses autores sugeriram que a presença de estreptomicetos no interior das raízes teria um papel importante no desenvolvimento saudável da planta.

Algum tempo depois, Petrolini *et al.* (1995) e Petrolini *et al.* (1996) descrevem o isolamento dos gêneros *Actinoplanes* e *Streptomyces*, respectivamente, como endofíticos de raízes de mais de 110 espécies de plantas. Outros trabalhos se seguiram, incluindo Matsumoto *et al.* (1998), que citaram o predomínio de *Microbispora* em folhas caídas de várias plantas nativas do Japão; Caruso *et al.* (2000), que demonstraram a presença de *Streptomyces*, *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Kitasatospora*, *Micromonospora* e nocardioformes como endofíticos de plantas do gênero *Taxus*; enquanto Araújo, Silva e Azevedo (2000) relataram a grande incidência do gênero *Microbispora*, seguido por *Streptomyces* e *Streptosporangium* em folhas e raízes de milho (*Zea mays*).

Recentemente, Taechowisan, Peberdy e Lumyong (2003) relataram o isolamento de *Streptomyces*, *Microbispora*, *Nocardia* e *Micromonospora* de folhas, raízes e caules de 36 espécies de plantas da Tailândia. Coombs e Franco (2003) descreveram a predominância de *Streptomyces* em raízes de centeio, e um menor número de gêneros *Microbispora*, *Micromonospora* e *Nocardioides*; enquanto Tian *et al.* (2004) reportaram o isolamento de grande número de *Streptomyces* e alguns *Streptoverticillum* em folhas e raízes de arroz.

Em plantas de Cerrado do interior do estado de São Paulo, Uetanabaro (2004) descreveu o isolamento de actinomicetos raros do gênero *Microbispora* a partir de folhas de *Tocoyena formosa*.

Através de métodos independentes de cultivo, Sessitsch *et al.* (2002) citam a presença de *Streptomyces* em caule e raízes de batata, enquanto que Conn e

Franco (2004) descrevem a presença de *Mycobacterium*, *Streptomyces* e *Kitasatospora* em raízes de centeio.

Observa-se que diferentes espécies de bactérias têm sido isoladas de uma mesma planta e esta biodiversidade pode estar relacionada com fatores intrínsecos da planta e condições sazonais.

### **3.3 Aplicações biotecnológicas dos actinomicetos endofíticos**

Os actinomicetos endofíticos representam uma fonte ainda inexplorada de recursos genéticos para biotecnologia. A produção de antibióticos de uso clínico, obtenção de enzimas de aplicação industrial, fixação de nitrogênio em plantas não-leguminosas e controle biológico representam algumas áreas de aplicação potencial.

#### **3.3.1 Produção de antibióticos e outros metabólitos secundários**

A primeira definição sobre antibióticos foi elaborada por Waksman (1945), que os definiu como: “substâncias químicas produzidas por microrganismos, possuidoras de capacidade de matar ou inibir o crescimento de bactérias e outros microrganismos”. Atualmente, uma definição mais abrangente sobre antibióticos é a proposta por Lancini, Parenti e Gallo (1995): “metabólitos microbianos de baixo peso molecular (massa molecular em torno de alguns milhares) que, em baixas concentrações (menos de 1 mg/mL), inibem o crescimento de outros microrganismos”.

Os actinomicetos têm sido especialmente pesquisados pela indústria farmacêutica por sua capacidade de produção de metabólitos secundários com estrutura química diversa e atividade biológica, sendo muitos deles utilizados para tratamento de doenças humanas (BALTZ, 2001; NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003; VAKULENKO; MOBASHERY, 2003). A produção de 2/3 dos antibióticos de ocorrência natural tem como origem os actinomicetos. Estava estimado que dos 6.000 antibióticos de origem microbiana caracterizados, cerca de 60% deles eram produzidos por actinomicetos, enquanto que o restante eram metabólitos de fungos e de outros grupos de bactérias (QUEENER; DAY, 1986). Embora a ordem Actinomycetales compreenda muitos gêneros, vale ressaltar que o gênero

*Streptomyces* é responsável por 90% dos compostos com grande aplicação prática na medicina humana e veterinária, na agricultura e na indústria de alimentos (OKAMI; HOTTA, 1988).

Nos últimos anos, os actinomicetos endofíticos do gênero *Streptomyces* tem sido fonte de novos antibióticos com atividade antimicrobiana contra bactérias, fungos ou protozoários. Bieber *et al.* (1998) identificaram a alnumicina, uma nova naftoquinona com atividade antibacteriana isolada de um *Streptomyces* endofítico de nódulos de raízes de *Alnus glutinosa*. As munumbicinas, por sua vez, têm atividade antibacteriana, antifúngica e antimalárica e foram obtidas de *Streptomyces* spp. endofítico do caule de *Kennedia nigriscans* (CASTILLO *et al.*, 2002). As kakadumicinas têm atividade antimalárica e contra bactérias Gram-positivas e foram produzidas por um *Streptomyces* sp. endofítico de caule de *Grevillea pteridifolia* (CASTILLO *et al.*, 2003) e as coronamicinas são antibióticos peptídicos que têm atividade antifúngica e antimalárica, produzidas por um *Streptomyces* sp. endofítico de caule de *Monstera* sp. (EZRA *et al.* 2004).

A produção de antibióticos não é rigorosamente espécie-específica. O mesmo antibiótico pode ser produzido por organismos pertencentes a diferentes espécies ou gêneros, ou até mesmo ordens. O inverso também é verdadeiro, isto é, linhagens classificadas taxonomicamente como membros de uma mesma espécie podem produzir diferentes antibióticos. Entretanto, como regra geral, quanto mais distante os organismos são na escala taxonômica, menor será a probabilidade que estes venham a produzir o mesmo antibiótico (LANCINI; PARENTI; GALLO, 1995).

Atualmente, em valor de mercado, os antibióticos são os produtos microbianos biotecnológicos mais importantes, excluindo-se os produtos tradicionais, como bebidas alcoólicas e queijos. A produção mundial de antibióticos estava estimada em valores em torno de oito bilhões de dólares na década de 80 e dobrou na década de 90 (GLAZER; NIKAIDO, 1995).

Depois dos antibióticos, as enzimas extracelulares são as substâncias mais importantes produzidas pelos actinomicetos (VIGAL *et al.*, 1991). Atualmente, as enzimas de origem microbiana têm sido amplamente utilizadas no processamento de

alimentos, fabricação de detergentes, indústria têxtil e farmacêutica, substituindo gradualmente os processos químicos com a vantagem de não poluir o ambiente (STAMFORD *et al.*, 2001).

As enzimas de interesse industrial comumente produzidas pelos actinomicetos compreendem proteases, amilases, polissacaridases, invertases, celulasas, fenoloxidasas, lipases e esterases. No entanto, as sintetases vêm alcançando um local de destaque nas pesquisas ligadas a áreas da agricultura.

Os actinomicetos endofíticos são também promissores na produção de enzimas. Stamford *et al.* (2001) relataram o isolamento de uma espécie do gênero *Nocardiopsis* endofítico de folhas de *Zea mays* capaz de produzir uma  $\alpha$ -amilase termoestável. Posteriormente, Stamford *et al.* (2002) isolaram uma espécie do gênero *Streptosporangium* endofítico de tubérculos de *Pachyrhizus erosus* produtor de uma glicoamilase termoestável.

### **3.3.2 Fixação biológica de nitrogênio**

Apesar da fixação biológica do nitrogênio ser bem conhecida em outras bactérias, somente a pouco mais de uma década atrás é que evidências convincentes da fixação biológica do nitrogênio pelos actinomicetos de vida livre foram observadas. *Frankia* spp. são actinomicetos fixadores de nitrogênio encontrados no solo e como simbioses facultativos de plantas superiores (BENSON; SILVESTER, 1993). Normalmente, crescem muito lentamente, em torno de 14 dias, o que dificulta o seu isolamento.

As plantas noduladas por *Frankia* spp. são chamadas de plantas actinorrízicas (TORREY; TJEPKEMA, 1979) e compreendem cerca de 194 espécies de 24 gêneros. O termo “actinorrízico” refere-se às associações entre actinomicetos e angiospermas.

A primeira observação dos nódulos actinorrízicos em raízes foi estabelecida em 1964, por microscopia eletrônica, onde se revelou a estrutura procariótica dos microrganismos em *Alnus glutinosa* e *Myrica cerifera* (BECKING; DEBOER; HOUWINK, 1964; SILVER, 1964). No entanto, o primeiro isolamento de *Frankia* spp.

só foi conseguido por Callaham, Deltredici e Torrey, em 1978, após inúmeras tentativas.

As associações actinorrízicas são importantes, pois a simbiose propicia a fixação biológica do nitrogênio em não-leguminosas de regiões de clima muito frio, onde muitas plantas actinorrízicas crescem em solos pobres de vegetação e nutrientes (BENSON; SILVESTER, 1993).

### **3.3.3 Controle biológico**

A utilização de defensivos agrícolas no controle de doenças que atacam raízes de plantas eleva o custo de produção e pode implicar em poluição do solo e subsolo. Por outro lado, o uso de agentes de controle biológico para o combate a tais doenças torna-se cada vez mais importante, tanto pela economia que propicia, como pelo menor impacto ambiental e riscos de aplicação.

O controle biológico é baseado na interação entre os agentes de controle e os organismos-alvo, geralmente patógenos, que se distribuem no solo, rizosfera e rizoplano. Desta forma, a habilidade de um microrganismo em colonizar o sistema radicular de uma planta hospedeira é um importante critério para sua seleção como agente de biocontrole de doenças de raízes (FREITAS; GERMIDA, 1991).

Pouco se sabe sobre o papel das bactérias endofíticas em plantas saudáveis. Contudo, bactérias epifíticas e rizosféricas têm sido cada vez mais estudadas como agentes no biocontrole de doenças de plantas.

Alguns trabalhos referem-se à atividade dos actinomicetos endofíticos na proteção de plantas contra patógenos e na influência dos metabólitos desses microrganismos no crescimento e fisiologia vegetal (SHIMIZU *et al.*, 2001; NISHIMURA *et al.* 2002; EL-TARABILY, 2003).

Atualmente, microrganismos endofíticos têm sido usados para expressar e secretar produtos úteis à planta hospedeira sem a necessidade de integração de DNA estranho no genoma da planta. Com isso, as bactérias endofíticas apresentam múltiplas aplicações no melhoramento da produção na agricultura (ZINNIEL *et al.*, 2002).

Em termos ecológicos, o uso de microrganismos endofíticos específicos pode ser preferível ao uso de fertilizantes químicos não-específicos e herbicidas, considerando-se custo, tempo de efetividade e contribuições para sistemas agrícolas sustentáveis (FAHEY, 1988; ZINNIEL *et al.*, 2002). A realização destes estudos requer o isolamento, cultivo e caracterização da diversidade taxonômica, genética e metabólica dos microrganismos, conhecimento sem o qual o potencial para o desenvolvimento de associações efetivas entre microrganismos endofíticos e plantas fica bastante limitado (FAHEY, 1988).

A associação entre microrganismos endofíticos e planta hospedeira pode propiciar benefícios recíprocos (BACON; HINTON, 1997). Segundo McInroy e Kloepper (1995), uma vez dentro da planta, a bactéria escapa da competição com outros microrganismos que comumente ocorrem no filoplano e rizosfera, podendo adaptar-se à utilização dos metabólitos da planta para sua sobrevivência. Por outro lado, os microrganismos endofíticos podem conferir algumas características às plantas hospedeiras como, por exemplo, aumento da resistência da planta hospedeira em condições de estresse hídrico; aumento da eficiência de fixação de nitrogênio; produção de fitohormônios e outros compostos de interesse biotecnológico (enzimas, antibióticos e drogas antitumorais), além de proteger as plantas contra insetos, patógenos e mesmo herbívoros domésticos como ovelha e gado.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Cultivo e amostragem de plantas de cupuaçu**

Os ensaios foram realizados com sementes de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) do clone IR-C-8501, fornecidas pelo Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Ocidental, EMBRAPA, Manaus (AM). As sementes (30) foram plantadas em canteiros de uma área experimental do Campus do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, individualmente, em profundidade de aproximadamente cinco cm. O cultivo foi irrigado, uma vez ao dia, sempre após o meio-dia. Após 15 dias de germinação (crescimento extra-solo), as plântulas foram coletadas e levadas ao laboratório para processamento. Repetiu-se a coleta das plântulas quando estas completaram 30, 45 e 60 dias de idade. A irrigação foi sempre suspensa nas 48 horas que precederam a coleta.

### **4.2 Isolamento de actinomicetos endofíticos**

Em laboratório, as plântulas tiveram duas folhas e duas raízes selecionadas e submetidas ao processo de esterilização de superfície, segundo a metodologia descrita a seguir. As folhas foram submersas, sucessivamente, em solução de álcool etílico 70% por 1 minuto, seguido de imersão em solução de hipoclorito de cálcio a 2% por 5 minutos e solução de álcool etílico 70% por 1 minuto. Após este tratamento, as folhas foram lavadas duas vezes em água destilada esterilizada e cortadas em 12 pequenos fragmentos de aproximadamente 5 mm de comprimento, onde quatro fragmentos foram inoculados em placas de Petri contendo os meios de cultura ISP 2 acrescido de amido (ISP 2A, Apêndice, item 8.1.3), Ágar Amido-Caseína (AC, Apêndice, item 8.1.1) e Ágar Rafinose-Histidina (RH, Apêndice, item 8.1.7), contendo 50 µg/mL do antifúngico cicloheximida. As placas foram incubadas a 30° C por até 30 dias. O mesmo procedimento descrito para as folhas foi efetuado para as raízes.

As linhagens obtidas no isolamento foram transferidas para novas placas de Petri contendo o meio ISP 2A e, conforme a necessidade, purificadas pela técnica de “spread-plate”. As culturas puras foram preservadas em criotubos, contendo glicerol 20% e congeladas em ultrafreezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ , conforme modificação do método descrito por Zipel e Neigenfind (1988).

### 4.3 Caracterização de atividade antimicrobiana

A caracterização da atividade antimicrobiana foi realizada em cultivos em meio sólido e meio líquido, pela difusão do composto biativo em ágar, conforme a descrição a seguir. Os microrganismos-teste foram inoculados em meios de cultivo específicos e obedeceram a uma temperatura e período de incubação, conforme se observa abaixo:

- *Staphylococcus aureus* (CCT 1352): Ágar Müller-Hinton (Apêndice, item 8.1.5),  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas;
- *Listeria monocytogenes*: Ágar Müller-Hinton,  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas;
- *Bacillus cereus* (CCT 0198): Ágar Müller-Hinton,  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas;
- *Escherichia coli* (CCT 0547): Ágar Müller-Hinton,  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas;
- *Pseudomonas aeruginosa* (CCT 3971): Ágar Müller-Hinton,  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas;
- *Mycobacterium smegmatis* (DAUFPE-71): Ágar Soja-Trypticaseína (Apêndice, item 8.1.10),  $30^{\circ}\text{C}$  por 72 horas;
- *Candida albicans* (CCT 0776): Ágar Sabouraud (Apêndice, item 8.1.8),  $30^{\circ}\text{C}$  por 48 horas;
- *Aspergillus flavus* (CCT 4952): Ágar Sabouraud,  $30^{\circ}\text{C}$  por 72 horas.

Para os ensaios de cultivo em meio sólido, o teste de atividade antimicrobiana foi feito segundo a metodologia descrita por Ichikawa, Ishikura e Ozaki (1971). A metodologia também conhecida como “Método do Bloco de Gelose” consistiu em inocular 1 mL da suspensão do actinomiceto, na concentração de  $10^6$  a  $10^7$  UFC/mL, pela técnica de “spread-plate”, adicionando-se 15 mL do meio de

cultura ISP 2A na placa de Petri. Após cinco a sete dias de incubação a 30° C, blocos de gelose circulares de 6 mm de diâmetro foram transferidos para as placas de ensaio de atividade previamente inoculadas com os microrganismos-teste, utilizando uma suspensão de células padronizadas na concentração aproximada de  $1,2 \times 10^6$  UFC/mL, semeados pela técnica de “spread-plate”. As placas foram incubadas respeitando-se as características fisiológicas de cada microrganismo-teste, conforme descrito anteriormente. O teste foi realizado em triplicata para todas as linhagens. Após o período de incubação, a média dos diâmetros dos halos de inibição de cada bloco foi determinada.

Os ensaios em meio líquido foram realizados conforme a metodologia descrita por Waksman e Woodruff (1941). As linhagens foram cultivadas sob agitação a 180 rpm em 50 mL meio de cultivo líquido M1 (Apêndice, item 8.1.12) em Erlenmeyers de 250 mL com tampão de algodão, por 120 horas a 30° C. A concentração de células inoculada por frasco foi de  $10^6$  a  $10^7$  UFC /mL.

Após o período de crescimento, 10 µL do líquido metabólico foram inoculados em um disco de papel de filtro estéril com seis mm de diâmetro e este foi colocado sobre a superfície de placas de Petri previamente inoculadas com os microrganismos-teste ( $1,2 \times 10^6$  células/mL) por “spread-plate”. Após o período de incubação dos microrganismos-teste, a média do diâmetro dos halos de inibição, de ensaios em triplicata foi determinada.

#### **4.4 Caracterização taxonômica convencional**

As linhagens foram crescidas nos meios ISP 2, ISP 3 (Apêndice, item 8.1.4), ISP 4 (Apêndice, item 8.1.9) e incubadas a 30° C por até 21 dias e visualmente determinou-se à cor do micélio aéreo. A cor do micélio vegetativo foi determinada pela observação do verso da colônia.

A produção de pigmentos melanóides foi avaliada nos meios ISP 6 (Apêndice, item 8.1.6) e ISP 7 (Apêndice, item 8.1.11), após incubação a 30° C por 2 e 4 dias.

A determinação das características micromorfológicas das linhagens foram realizadas de acordo com a metodologia descrita em Shirling e Gottlieb (1966), Cross (1994) e Lechevalier (1989). As linhagens foram cultivadas nos meios ISP 2A, ISP 3 e ISP 4, sendo incubadas a 30° C por até 21 dias.

## 4.5 Caracterização molecular

### 4.5.1 Extração de DNA genômico

A extração do DNA genômico das linhagens isoladas foi realizada segundo Massana *et al.* (1997), com algumas modificações. Utilizou-se cerca de 50 mg de biomassa lavada com 1,5 mL de tampão NaCl 0,1 M + EDTA 0,1 M. O micélio foi desagregado mecanicamente com auxílio de um pistilo em 900 µL de tampão de lise (EDTA 40 mM; Tris-HCl 50 mM pH 8,0; sacarose 0,75 M; lisozima 1 mg/mL). Posteriormente, foi adicionado SDS 10% (concentração final de 1%) e proteinase K (concentração final de 0,5 mg/mL), incubando-se a 37 °C durante 30 minutos após adição do primeiro reagente e a 55 °C por 2 horas após adição do segundo reagente. O DNA foi extraído duas vezes com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos e a fase aquosa transferida para um novo tubo. Precipitou-se o DNA genômico com 0,1 volume de NaCl 5 M e 2 volumes de etanol 96% gelado, com incubação *overnight* a -20 °C. Centrifugou-se a 12.000 rpm por 15 minutos, lavou-se o sedimento e paredes do tubo com etanol 70% gelado e aplicou-se pulsos curtos de centrifugação. Secou-se o sedimento à temperatura ambiente. Ressuspendeu-se o sedimento em 20 a 50 µL de tampão TE pH 8,0 e estocou-se a -20° C.

### 4.5.2 Amplificação do rDNA 16S

Fragmentos de rDNA 16S foram amplificados a partir do DNA genômico pela reação em cadeia de polimerase (PCR), utilizando-se os *primers* p27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'; LANE, 1991) e p1401r (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGAAGG-3'; HEUER *et al.*, 1997). As reações de PCR continham 100 ng de DNA genômico, 0,2 mM de dNTP, 0,2 µM de cada primer, 2 U de *Taq* polimerase (Amersham Biosciences), 1X tampão de *Taq* polimerase

(Amersham Biosciences), em volume final de reação de 50 µL. As condições de amplificação consistiram de uma etapa inicial de desnaturação com um ciclo a 95° C por 2 minutos, seguido de uma etapa de anelamento e extensão com 30 ciclos a 94° C durante 1 minuto, 55° C por 1 minuto e 72° C por 3 minutos e um ciclo final de extensão a 72° C durante 3 minutos, em termociclador da marca Perkin Elmer, modelo GeneAmp 2400. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,2%, corados com brometo de etídio (10 µg/mL) e fotografados sob luz ultra-violeta (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATS, 1989). Produtos de amplificação foram armazenados a -20 °C.

#### **4.5.3 Análise de restrição do rDNA 16S (ARDRA)**

Cerca de 1 µg de produtos de amplificação de rDNA 16S foram clivados com as seguintes enzimas de restrição: *Alu* I (Amersham Biosciences), *Dde* I (Amersham Biosciences), *Hae* III (Amersham Biosciences) e *Rsa* I (Gibco BRL), segundo o protocolo dos fabricantes. Os perfis que congregaram um grande número de isolados foram novamente digeridos utilizando-se as enzimas *Msp* I (Amersham Biosciences), *Sau*3A I (Amersham Biosciences) e *Taq* I (Amersham Biosciences), conforme protocolo do fabricante. A eletroforese dos produtos de restrição foi realizada em gel de agarose 2,5% (1,5% agarose *Low Melting Point* e 1% agarose NA) a 80 V por duas horas e meia, corando-se com brometo de etídio (10 µg/mL) e fotografados sob luz ultravioleta (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATS, 1989).

#### **4.5.4 Seqüenciamento de rDNA 16S**

Para o seqüenciamento direto do gene rDNA 16S, foram utilizados 800 ng de produtos de PCR, purificados com o kit de purificação GFX™ (Amersham Biosciences) e eluídos em 30 µL de água deionizada. Os fragmentos de rDNA 16S foram seqüenciados pelo sistema automatizado ALF Express II (Amersham Biosciences), utilizando o kit de seqüenciamento Thermo Sequenase 7-deaza-dGTP com *primer* fluorescente marcado (Amersham Pharmacia Biotech), de acordo com as instruções do fabricante. Os *primers* utilizados no seqüenciamento do gene rDNA 16S foram: p10f (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; Lane *et al.*, 1985); p1100r (5'-

AGGGTTGCGCTCGTTG-3'; Lane, 1991), e p782r (5'-ACCAGGGTATCTAATCCTGT-3'; Lane, 1991).

#### **4.5.5 Análise filogenética**

As seqüências obtidas, de aproximadamente 1100 pb, foram inicialmente comparadas com seqüências de rDNA 16S de microrganismos presentes em base de dados pública (Genbank, <http://www.ncbi.nih.gov>) e alinhadas com as de maior similaridade utilizando o software Clustal X. As seqüências foram editadas utilizando o software BioEdit versão 5.0.9 e as análises filogenéticas foram efetuadas utilizando-se o software PAUP versão 4.0b10 (SWOFFORD, 1998), com o método de distância e algoritmo de construção de árvores Neighbour-Joining (NJ).

A robustez dos grupos foi avaliada por meio de *bootstrap* com 1000 repetições (FELSENSTEIN, 1989) no software PAUP. As árvores foram construídas utilizando-se o software TREEVIEW versão 1.6.6 (PAGE, 1996).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Isolamento de actinomicetos endofíticos

O processo de esterilização de superfície das plantas é um ponto crítico no isolamento dos actinomicetos endofíticos. A utilização do hipoclorito de cálcio mostrou ser eficiente na esterilização da superfície de folhas e raízes de *Theobroma grandiflorum*, uma vez que não se detectou o crescimento de microrganismos após o plaqueamento da água de lavagem destes órgãos.

Após um período de até 30 dias de incubação, colônias emergiram dos fragmentos de folhas e raízes, foram plaqueadas e purificadas. Os resultados deste isolamento são observados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Isolamento dos actinomicetos conforme material amostrado e condição de isolamento.

MEIO DE CULTIVO	ÓRGÃOS DA PLÂNTULA (Idade em dias)								TOTAL
	Folha				Raiz				
	15	30	45	60	15	30	45	60	
ISP 2A	1	1	0	1	1	0	3	5	<b>12</b>
AC	2	0	0	1	1	5	4	2	<b>15</b>
RH	0	0	1	0	1	7	5	11	<b>25</b>
<b>SUB-TOTAL</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>12</b>	<b>12</b>	<b>18</b>	<b>52</b>
<b>TOTAL</b>	<b>7</b>				<b>45</b>				

De acordo com estes dados, verificou-se uma variação no número total de isolados nos três meios testados, sendo que o meio RH se apresentou como o melhor para o isolamento de actinomicetos endofíticos em plântulas de cupuaçu, com 25 (48,1%) isolados. Os meios ISP 2A e AC também mostraram eficiência para o isolamento, obtendo-se 12 (23,1%) e 15 (28,8%) actinomicetos endofíticos, respectivamente.

A escolha correta dos meios de cultivo é um dos principais critérios para o isolamento de actinomicetos endofíticos. Apesar de Holt *et al.* (1994) terem observado que os meios de cultivo contendo amido são mais eficientes no isolamento dos actinomicetos em geral, isto não foi observado neste trabalho.

Pode-se observar também que a freqüência de isolamento de actinomicetos endofíticos das raízes foi maior do que das folhas. E que o fator idade da planta foi um fator preponderante no isolamento de actinomicetos endofíticos da raiz de cupuaçuzeiro. De um modo geral, verifica-se que quanto mais jovem a planta, menor a freqüência de isolamento de actinomicetos endofíticos na raiz, mas que na folha não ocorre alterações significativas. No entanto, McInroy e Kloepper (1995) verificaram que ocorria uma diminuição na população de bactérias endofíticas encontradas em hastes de milho com a maturidade da planta. Segundo estes autores, estas variações podem estar relacionadas com fatores ambientais, tais como variações sazonais e características do solo onde foram crescidos, e/ou fatores intrínsecos da planta, que podem estar relacionados a mecanismos fisiológicos que ocorrem com a maturação da planta, os quais podem viabilizar ou inviabilizar a colonização dos actinomicetos.

## **5.2 Caracterização de atividade antimicrobiana**

Convencionou-se a classificação da atividade antimicrobiana como:

- Inerte (-): ausência de halo de inibição;
- Baixa (+): diâmetro do halo de inibição entre 7 a 10 mm;
- Moderada (+ +): diâmetro do halo de inibição entre 11 a 14 mm;
- Alta (+ + +): diâmetro do halo de inibição superior a 14 mm.

A atividade antimicrobiana em meio sólido e em meio líquido foi testada nas 52 linhagens e a Tabela 5.2 mostra somente o resultado das linhagens que apresentaram atividade antimicrobiana para os microrganismos-teste utilizados.

Tabela 5.2. Caracterização da atividade antibiótica apresentada pelos actinomicetos endofíticos, em meio sólido e em meio líquido.

ISOLADO	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA (Meio Sólido)					ATIVIDADE ANTIMICROBIANA (Meio Líquido)
	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. flavus</i>	<i>C. albicans</i>
TM 3	-	-	-	++	-	+
TM 8	+	-	-	-	-	-
TM 9	+	-	-	-	+	-
TM 14	+	-	-	-	-	-
TM 16	+	-	-	-	-	-
TM 19	+	-	-	-	+	-
TM 20	+	-	-	-	+	-
TM 22	-	-	-	++	-	+
TM 23	-	+	-	-	-	-
TM 24	-	-	-	++	-	++
TM 26	-	-	-	++	+	+
TM 33	-	-	-	++	-	+
TM 40	-	+	-	-	-	-
TM 42	-	+	-	-	-	-
TM 47	-	+	++	-	-	-
TM 49	-	-	+	-	-	-
TM 50	-	-	+	-	-	-
TM 52	+	-	-	-	-	-
TM 54	++	-	-	-	-	-
TM 62	-	-	+	-	-	-
TM 65	+	-	-	++	-	-
TM 68	-	-	-	++	-	+
TM 70	-	+	-	-	-	-

Nenhuma das linhagens testadas foi capaz de inibir o crescimento de *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Mycobacterium smegmatis*. No meio sólido foi detectada atividade antimicrobiana baixa a moderada, mas com um amplo espectro de ação, ou seja, atividade sobre bactérias e fungos. Vinte e três (44,2%) linhagens mostraram antibiose contra os microrganismos-teste utilizados, dos quais nove (39,1%) mostraram atividade contra *Staphylococcus aureus*, cinco (21,7%) contra *Bacillus cereus*, quatro (17,4%) contra *Escherichia coli*, sete (30,4%) contra *Candida albicans* e quatro (17,4%) contra *Aspergillus flavus*. Vale ressaltar que, de um modo geral, estes actinomicetos endofíticos apresentaram mais atividade antifúngica (Figura 5.1) que antibacteriana.

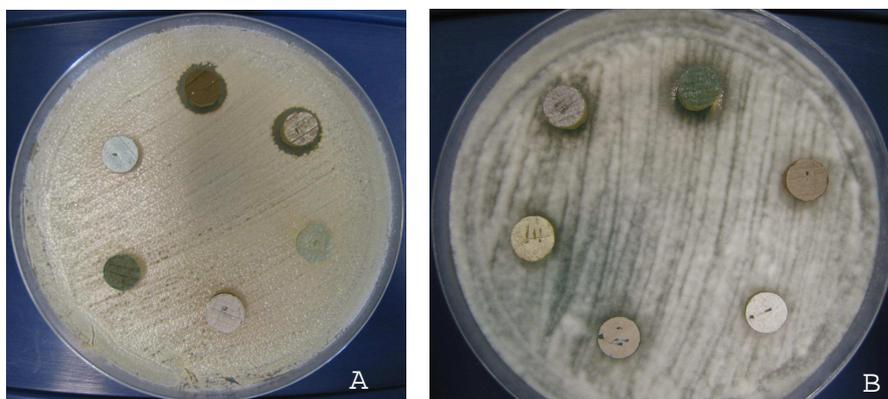


Figura 5.1. Ensaio de atividade antifúngica contra *Candida albicans* (A) e *Aspergillus flavus* (B).

Observou-se também que 10 (43,5%) dos actinomicetos isolados de plantas com 60 dias de idade foram o grupo bioativo de maior detecção da atividade antimicrobiana em meio sólido (Bloco de Gelose), seguido das linhagens isoladas de plantas com 30 dias, 45 dias e 15 dias, com 30,4%, 17,4% e 8,7% das atividades antimicrobianas, respectivamente. De um modo geral, estas linhagens são produtoras de antibióticos com atividade antimicrobiana contra bactérias (Gram-positiva e Gram-negativa) e fungos testados.

O fato das outras 29 linhagens não apresentarem atividade antimicrobiana detectável, não significa que estas sejam incapazes de produzir antibióticos. Novos ensaios utilizando outros meios de cultivo para o crescimento dos actinomicetos e

outros microrganismos-teste poderão ser utilizados posteriormente, visando melhorar a detecção de antibiose.

Na caracterização de atividade antimicrobiana em meio líquido, observou-se que apenas 6 (11,5%) linhagens apresentaram atividade antagonista. As linhagens bioativas mostraram apenas atividade antifúngica, que variaram de baixa a moderada, contra a levedura *Candida albicans* (Tabela 5.2).

Na Tabela 5.2, observa-se que apesar das linhagens TM3, TM22, TM26, TM33 e TM68 terem apresentado atividade moderada no ensaio em meio sólido para *Candida albicans*, estas linhagens se mostraram com baixa atividade quando ensaiada em meio líquido. Detectou-se uma atividade antifúngica moderada para *Candida albicans* no ensaio em meio sólido pela linhagem TM65, mas esta se mostrou inerte no ensaio em meio líquido. A linhagem TM24 foi a única que manteve uma atividade antimicrobiana moderada para *Candida albicans* por esta técnica.

Observou-se que a maioria dos isolados produziu compostos bioativos com atividade antifúngica e isto pode ser devido às condições da planta com o meio ambiente, haja vista que a maioria das doenças do cupuaçuzeiro é causada por fungos e pode estar relacionado à susceptibilidade da planta a estes microrganismos (BENCHIMOL, 2000).

Estes resultados podem sugerir que a composição do meio líquido utilizado não tenha estimulado a biossíntese do antibiótico antifúngico ou que haveria a necessidade de aumentar o tempo de cultivo sob agitação, pois Sardi *et al.* (1992) isolaram actinomicetos endofíticos de diferentes plantas e observaram atividade antimicrobiana para *Fusarium oxysporum* após 10 dias de cultivo sob agitação em caldo PGC. Os actinomicetos endofíticos isolados por Araújo, Silva e Azevedo (2000) relataram atividade antifúngica para *C. albicans* com 72 horas de cultivos sob agitação em caldo ISP 3. No caso da linhagem TM65, pode-se sugerir que a formação de esporos pelo actinomiceto pode ser uma condição importante para produção do composto bioativo, já que se sabe que determinados antibióticos são produzidos somente quando o actinomiceto está em fase de esporulação. Sugerimos

que sejam testados outros meios líquidos para produção do antibiótico antifúngico biossintetizado.

Normansell (1986) relatou que o método de Ichikawa, Ishikura e Ozaki (1971), utilizando blocos de ágar, apresentava baixa resolução na detecção de antibióticos produzidos em pequenas concentrações. No entanto, no presente trabalho observou-se um amplo espectro de atividade antimicrobiana sobre os microrganismos-teste utilizados, contrário aos dados de Normansell (1986). Desta forma, não se recomenda o desuso deste método de triagem inicial de atividade, quando a utilização de métodos mais sensíveis de análise não for uma opção viável.

Apesar do ensaio de atividade antimicrobiana em meio líquido ser o mais comumente utilizado na determinação de atividade antimicrobiana, neste experimento esta estratégia mostrou-se limitada e de baixa sensibilidade. Fatores diversos podem afetar a biossíntese de metabólitos em condições de cultivo, tal como a produção sincronizada de metabólitos secundários durante a fase de esporulação, a qual é mais difícil de ocorrer em meio líquido, e a composição do meio de cultivo, além de outros. Os trabalhos de Bieber *et al.* (1998), Castillo *et al.* (2002) e Castillo *et al.* (2003) descrevem que *Streptomyces* spp. endofíticos são bons produtores de antibióticos antibacterianos. Enquanto que, Shimizu *et al.* (2000), Nishimura *et al.* (2002) e Ezra *et al.* (2004) isolaram *Streptomyces* endofíticos que são produtores de antibióticos antifúngicos. Nestes trabalhos, foram utilizados o Caldo Batata-Dextrose, Caldo soja-caseína, Caldo nutriente, entre outros. Observa-se que, em geral, não ocorre a utilização de um meio de cultivo líquido padrão para a detecção de atividade antimicrobiana entre os pesquisadores. Provavelmente, esta escolha se baseia em critérios como disponibilidade ou baixo custo dos reagentes, desta forma, resultados similares dificilmente serão alcançados.

### 5.3 Caracterização taxonômica e identificação dos actinomicetos

Visualmente determinou-se a cor do micélio aéreo dos actinomicetos endofíticos que variou de branco, bege e cinza, e do micélio vegetativo, de amarelo a preto.

A maioria das linhagens apresentou pigmento melanóide com coloração que variou de marrom a preto, enquanto que outras não produziram pigmento nos meios utilizados.

Dez linhagens (TM22, TM35, TM40, TM43, TM44, TM52, TM54, TM55, TM58 e TM69) não apresentaram estruturas típicas para identificação, necessitando a utilização de outros meios de cultivo para o seu crescimento.

A coloração apresentada pelo micélio aéreo, a pigmentação e a forma da cadeia de esporos dos actinomicetos endofíticos isolados é apresentada na Tabela 5.3.

Tabela 5.3. Características macro e micromorfológicas dos actinomicetos isolados.

ISOLADO	COLORAÇÃO DO MICÉLIO AÉREO	PRODUÇÃO DE PIGMENTOS	CADEIA DE ESPOROS*
TM 1	Cinza	Ausente	RA
TM 3	Branco	Ausente	RA
TM 4	Cinza	Ausente	S
TM 5	Bege	Ausente	S
TM 7	Cinza	Ausente	S
TM 8	Cinza	Marrom	S
TM 9	Cinza	Marrom	S
TM 10	Cinza	Marrom	S
TM 11	Cinza	Marrom	S
TM 12	Branco	Marrom	S
TM 13	Cinza	Marrom	S
TM 14	Cinza	Marrom	S
TM 15	Bege	Marrom	S

Tabela 5.3. Continuação.

ISOLADO	COLORAÇÃO DO MICÉLIO AÉREO	PRODUÇÃO DE PIGMENTOS	CADEIA DE ESPOROS*
TM 16	Cinza	Marrom	S
TM 17	Cinza	Preto	RF
TM 19	Cinza	Marrom	S
TM 20	Cinza	Marrom	S
TM 23	Cinza	Marrom	S
TM 24	Branco	Ausente	RF
TM 25	Branco	Ausente	RF
TM 26	Branco	Ausente	RF
TM 27	Branco	Ausente	S
TM 28	Branco	Ausente	S
TM 29	Cinza	Ausente	S
TM 30	Branco	Ausente	S
TM 31	Cinza	Ausente	S
TM 32	Cinza	Ausente	S
TM 33	Branco	Ausente	RF
TM 34	Cinza	Marrom	S
TM 42	Cinza	Ausente	S
TM 47	Branco	Ausente	S
TM 49	Branco	Ausente	S
TM 50	Cinza	Marrom	S
TM 56	Cinza	Marrom	S
TM 57	Cinza	Marrom	S
TM 59	Cinza	Marrom	S
TM 62	Cinza	Ausente	S
TM 63	Cinza	Marrom	S
TM 64	Branco	Ausente	RF
TM 65	Branco	Ausente	RF
TM 68	Branco	Marrom	S
TM 70	Cinza	Marrom	S

(\*) RA (*retinaculiaperti*) = enlaçado ; RF (*rectiflexibiles*) = reto flexível; S (*spirales*) = espiral

A caracterização da micromorfologia, acompanhada durante 21 dias, mostrou diversos tipos de cadeias de esporos. As linhagens observadas apresentaram micélio ramificado não fragmentado, o micélio aéreo apresentou esporóforos espiralados, enlaçados, retos e/ou flexíveis. Estas características macro e micromorfológicas são sugestivas para o gênero *Streptomyces*.

### 5.3.1 Análise de Restrição do rDNA Amplificado (ARDRA)

O ARDRA apresentou os seguintes perfis de restrição com as enzimas *Alu* I, *Dde* I, *Hae* III e *Rsa* I para as 50 linhagens de actinomicetos analisados (Figura 5.2).

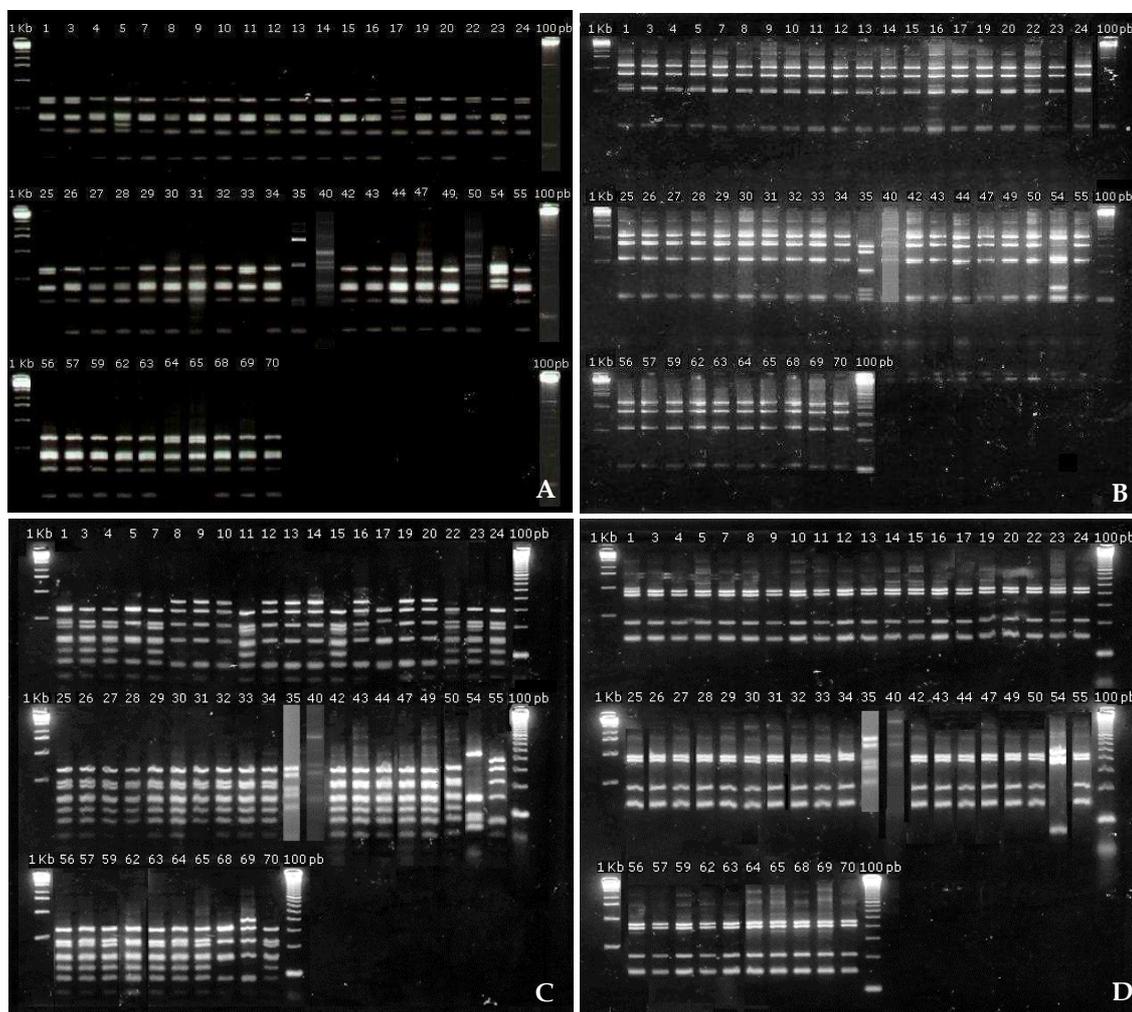


Figura 5.2. Perfis de ARDRA de linhagens selecionadas obtidos com as enzimas *Alu* I (A), *Dde* I (B), *Hae* III (C) e *Rsa* I (D).

Quando estes perfis foram analisados em conjunto (fase 1), observou-se 13 diferentes ribotipos dentre os actinomicetos analisados. Destes, dez formaram um perfil de restrição único e três perfis tiveram vários representantes.

Fragmentos de rDNA 16S de linhagens alocadas nos grupos de ARDRA que congregaram um grande número de isolados foram novamente digeridos utilizando-se as enzimas *Msp* I, *Sau*3A I e *Taq* I (fase 2), visando maior diferenciação interna destes grupos e os resultados são observados na Figura 5.3.

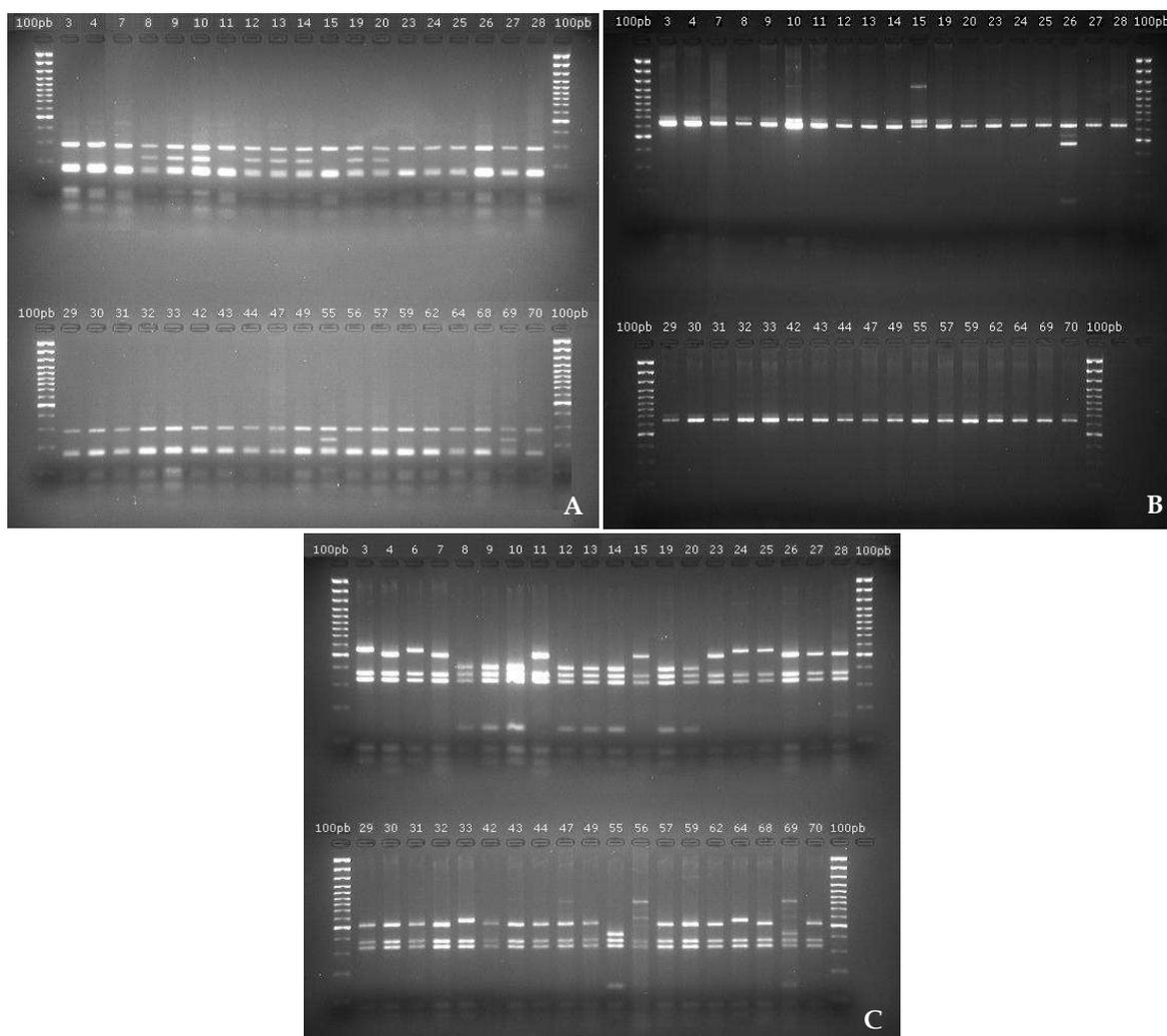


Figura 5.3. Perfis de ARDRA de linhagens representantes dos perfis majoritários obtidos com as enzimas *Msp* I (A), *Sau*3A I (B) e *Taq* I (C).

A Tabela 5.4 mostra o resultado da compilação dos perfis de restrição e os respectivos dados de isolamento das linhagens.

Tabela 5.4. Compilação dos perfis de restrição apresentados pelos actinomicetos endofíticos testados.

ISOLADO	AGRUPAMENTO (Fase 1)	AGRUPAMENTO (Fase 2)	ORIGEM		
			Planta / Órgão	Idade	Meio de Cultivo
TM 1	A A A A	—	P1 – Folha 2	15 dias	AC
TM 5	C B B A	—	P3 – Folha 1	15 dias	AC
TM 16	B C C A	—	P5 – Raiz 1	30 dias	RH
TM 17	D B B A	—	P6 – Raiz 1	30 dias	RH
TM 22	A C A A	—	P4 – Raiz 2	30 dias	AC
TM 35	E E E C	—	P7 – Raiz 1	45 dias	AC
TM 40	F F F D	—	P9 – Folha 2	45 dias	RH
TM 50	G B A A	—	P10 – Raiz 2	60 dias	RH
TM 54	H D D B	—	P11 – Raiz 2	60 dias	RH
TM 68	B B B A	—	P10 – Raiz 1	60 dias	ISP 2A
TM 3	A B A A ( ∇ )	a a a	P2 – Folha 2	15 dias	ISP 2A
TM 24	∇	a a a	P7 – Raiz 1	45 dias	AC
TM 25	∇	a a a	P7 – Raiz 2	45 dias	AC
TM 33	∇	a a a	P9 – Raiz 2	45 dias	RH
TM 64	∇	a a a	P12 – Raiz 2	60 dias	ISP 2A
TM 65	∇	—	P11 – Raiz 2	60 dias	RH
TM 4	B B A A ( )	a a b	P1 – Raiz 2	15 dias	ISP 2A
TM 7		a a b	P3 – Raiz 1	15 dias	RH
TM 11		a a b	P4 – Raiz 1	30 dias	RH
TM 15		a b b	P4 – Raiz 2	30 dias	RH
TM 23		a a b	P4 – Raiz 1	30 dias	AC
TM 26		a c b	P8 – Raiz 1	45 dias	RH
TM 27		a a b	P8 – Raiz 2	45 dias	RH
TM 28		a a b	P9 – Raiz 1	45 dias	AC
TM 29		a a b	P9 – Raiz 1	45 dias	ISP 2A

Tabela 5.4. Continuação.

ISOLADO	AGRUPAMENTO (Fase 1)	AGRUPAMENTO (Fase 2)	ORIGEM		
			Planta / Órgão	Idade	Meio de Cultivo
TM 30		a a b	P9 – Raiz 1	45 dias	ISP 2A
TM 31		a a b	P9 – Raiz 1	45 dias	RH
TM 32		a a b	P9 – Raiz 1	45 dias	RH
TM 34		a a a	P7 – Raiz 2	45 dias	ISP 2A
TM 42		a a b	P10 – Raiz 1	60 dias	ISP 2A
TM 43		a a b	P12 – Raiz 1	60 dias	RH
TM 44		a a b	P12 – Raiz 2	60 dias	AC
TM 47		a a a	P10 – Raiz 2	60 dias	ISP 2A
TM 49		a a b	P10 – Raiz 2	60 dias	RH
TM 56		a – a	P12 – Raiz 2	60 dias	RH
TM 57		a a b	P12 – Raiz 2	60 dias	RH
TM 59		a a a	P11 – Folha 2	60 dias	AC
TM 62		a a b	P12 – Raiz 1	60 dias	RH
TM 63		—	P12 – Raiz 1	60 dias	RH
TM 70		a a b	P12 – Raiz 2	60 dias	RH
TM 8	B B C A (•)	b a c	P3 – Raiz 2	15 dias	AC
TM 9	•	b a c	P4 – Folha 2	30 dias	ISP 2A
TM 10	•	b b c	P4 – Raiz 1	30 dias	AC
TM 12	•	b a c	P4 – Raiz 1	30 dias	RH
TM 13	•	b a c	P4 – Raiz 2	30 dias	AC
TM 14	•	b a c	P4 – Raiz 2	30 dias	RH
TM 19	•	b a c	P6 – Raiz 2	30 dias	RH
TM 20	•	b a c	P6 – Raiz 2	30 dias	AC
TM 55	•	b a c	P12 – Raiz 2	60 dias	AC
TM 69	•	b a c	P11 – Raiz 2	60 dias	ISP 2A

– = digestão não realizada

Segundo os resultados apresentados nesta tabela, a nova digestão dos grupos majoritários forneceu um total de 17 perfis. De acordo com estes dados, verifica-se que a maioria das linhagens que apresentou perfil único foi isolada de raízes no meio de cultivo RH. Estas informações permitem inferir que as raízes de cupuaçuzeiro apresentam maior diversidade de actinomicetos, comparado com as folhas, e que o meio RH é o mais propício para o isolamento. A princípio, observa-se que a idade da planta não é um parâmetro que afeta a ocorrência de linhagens de perfil único.

Podemos observar que os ribotipos com perfil ABAA, tendo 6 isolados, não mostraram diferença mesmo com as enzimas *Msp* I, *Sau3A* I e *Taq* I, e por isso infere-se que representam um mesmo isolado. Este resultado não pode ser estendido para a linhagem TM65, pois a mesma não foi digerida com estas novas enzimas.

Por outro lado, as linhagens com perfil BBAA, com 24 isolados, apresentaram quatro novos ribotipos frente às novas enzimas testadas, onde se pode sugerir que existem pelo menos quatro grupos taxonomicamente distintos. Assim sendo, as linhagens TM28, TM29, TM30, TM31 e TM32 são um mesmo isolado, pois são originados da mesma planta e do mesmo órgão. O mesmo pode ser extrapolado para as linhagens TM42 e TM49, e para as linhagens TM43, TM44, TM57, TM62 e TM70 que também foram isoladas das raízes da mesma planta. Embora as linhagens restantes deste perfil tenham sido isolados de plantas diferentes ainda assim são possivelmente um mesmo isolado. Seguindo-se este raciocínio, as linhagens TM34, TM47, TM56, TM59 são um mesmo isolado, mas distinto dos demais. O mesmo ocorrendo para a linhagem TM15 e para linhagem TM26.

O perfil BBKA representado por 10 isolados, apresentou dois novos ribotipos após a segunda digestão (fase 2), sendo a linhagem TM10 a única diferente dentre os outros nove ribotipos.

### 5.3.2 Sequenciamento do rDNA 16S e Análise filogenética

Foram escolhidas 26 linhagens, com os ribotipos mais distintos, para o sequenciamento e análise filogenética de rDNA 16S. Foram obtidas seqüências de aproximadamente 1000 pb. A similaridade destas seqüências com as depositadas em bancos de dados são apresentadas na Tabela 5.5.

Tabela 5.5. Similaridade das seqüências de rDNA 16S obtidas para os isolados selecionados com seqüências de organismos relacionados da base de dados GenBank.

ISOLADO	SEQÜÊNCIAS DE rDNA 16S RELACIONADAS	SIMILARIDADE (%)
TM 1	<i>Streptomyces somaliensis</i>	97
	<i>S. albidoflavus</i>	97
	<i>S. canescens</i>	97
	<i>S. odorifer</i>	97
	<i>S. felleus ...</i>	97
TM 3	<i>S. somaliensis</i>	99
	<i>S. albidoflavus</i>	99
	<i>S. canescens</i>	99
	<i>S. odorifer</i>	99
	<i>S. felleus ...</i>	99
TM 4	<i>Streptomyces</i> sp. Z2	98
	<i>S. echinatus</i>	97
	<i>Streptomyces</i> sp. KN-0647 ...	96
TM 5	<i>Streptomyces</i> sp. KN-0647	99
	<i>Streptomyces</i> sp. S78	97
	<i>S. capoamus ...</i>	97
TM 8	<i>S. cinnabarinus</i>	98
	<i>Streptomyces</i> sp. SS	98
	<i>S. panayensis</i>	98
	<i>S. griseoruber</i>	98
	<i>S. galbus ...</i>	98
TM 9	<i>Streptomyces</i> sp. SS	98
	<i>S. panayensis</i>	98
	<i>S. cinnabarinus</i>	98
	<i>S. galbus ...</i>	98
TM 10	<i>Streptomyces</i> sp. SS	98
	<i>S. panayensis</i>	98
	<i>S. galbus</i>	98
	<i>Streptomyces</i> sp. LS-1	98
	<i>S. capoamus ...</i>	98
TM 11	<i>S. fimbriatus</i>	97
	<i>S. avermitilis</i>	97
	<i>S. ciscaucasicus</i>	97
	<i>S. viridochromogenes</i>	97
	<i>S. griseochromogenes ...</i>	97

Tabela 5.5. Continuação.

ISOLADO	SEQÜÊNCIAS DE rDNA 16S RELACIONADAS	SIMILARIDADE (%)
TM 12	<i>Streptomyces</i> sp. SS	98
	<i>S. panayensis</i>	97
	<i>S. galbus</i> ...	97
TM 13	<i>Streptomyces</i> sp. SS	98
	<i>S. panayensis</i>	98
	<i>Streptomyces</i> sp. LS-1	98
	<i>S. lincolnensis</i>	98
	<i>S. galbus</i> ...	98
TM 14	<i>Streptomyces</i> sp. SS	99
	<i>S. panayensis</i>	98
	<i>S. galbus</i> ...	98
TM 15	<i>S. fimbriatus</i>	98
	<i>S. avermitilis</i>	98
	<i>Streptomyces</i> sp. GE90852 ...	97
TM 16	<i>Streptomyces</i> sp. SS	97
	<i>S. panayensis</i>	97
	<i>S. galbus</i>	97
	<i>Streptomyces</i> sp. LS-1 ...	96
TM 17	<i>Streptomyces</i> sp. YNUCC0233	99
	<i>Streptomyces</i> sp. 050642	99
	<i>Streptomyces</i> sp. NT322 ...	96
TM 23	<i>S. fimbriatus</i>	98
	<i>S. avermitilis</i>	97
	<i>S. ciscaucasicus</i> ...	97
TM 24	<i>S. somaliensis</i>	99
	<i>S. albidoflavus</i>	99
	<i>S. canescens</i>	99
	<i>S. odorifer</i>	99
	<i>S. felleus</i> ...	99
TM 25	<i>S. seoulensis</i>	98
	<i>S. argillaceus</i>	97
	<i>S. kathirae</i> ...	97
TM 26	<i>S. somaliensis</i>	98
	<i>S. albidoflavus</i>	98
	<i>S. canescens</i>	98
	<i>S. odorifer</i>	98
	<i>S. felleus</i> ...	98
TM 27	<i>Streptomyces</i> sp. KN-0647	97
	<i>S. capoamus</i>	97
	<i>Streptomyces</i> sp. S78 ...	96
TM 28	<i>S. fimbriatus</i>	98
	<i>S. avermitilis</i>	97
	<i>Streptomyces</i> sp. GE90852 ...	97
TM 34	<i>S. fimbriatus</i>	98
	<i>S. avermitilis</i>	98
	<i>Streptomyces</i> sp. GE90852 ...	97

Tabela 5.5. Continuação.

ISOLADO	SEQÜÊNCIAS DE rDNA 16S RELACIONADAS	SIMILARIDADE (%)
TM 50	<i>Streptomyces</i> sp. GE90852	96
	<i>S. capoamus</i>	96
	<i>S. galbus</i>	96
	<i>S. fimbriatus</i>	96
	<i>S. hygrosopicus</i> ...	95
TM 56	<i>S. fimbriatus</i>	98
	<i>S. avermitilis</i>	98
	<i>Streptomyces</i> sp. GE90852	98
	<i>S. ciscaucasicus</i> ...	97
TM 57	<i>S. fimbriatus</i>	98
	<i>S. avermitilis</i>	98
	<i>Streptomyces</i> sp. GE90852 ...	97
TM 63	<i>Streptomyces</i> sp. GE90852	98
	<i>S. capoamus</i>	98
	<i>S. panayensis</i>	98
	<i>S. galbus</i>	98
	<i>S. fimbriatus</i> ...	98
TM 68	<i>Streptomyces</i> sp. GE90852	98
	<i>S. galbus</i>	97
	<i>S. capoamus</i>	97

Para a análise filogenética foi utilizado o segmento de posição 60 a 1040. *Kitasatosporia setae* foi utilizada como *outgroup*. A árvore filogenética resultante do método de distância (Neighbour-Joining) está apresentada na Figura 5.4.



Na Figura 5.4, observa-se que as linhagens com perfil de restrição único que foram seqüenciadas (TM1, TM5, TM16, TM17, TM50 e TM68) não agruparam com nenhuma das espécies conhecidas do gênero *Streptomyces* utilizadas. Esta figura ainda mostra que as linhagens com perfil de restrição ABAA analisadas não formaram um agrupamento muito consistente, por outro lado, as linhagens com perfil BBAA e BBCA analisadas formaram grupos muito mais consistentes, com valores de bootstrap de 91 e 86%, respectivamente. As exceções são para as linhagens TM4, TM26, TM27 e TM63 (todas com perfil BBAA) que acabaram formando um grupo bem distinto daquele determinado no ARDRA.

Um fato curioso para estas linhagens endofíticas de cupuaçuzeiro é que a grande maioria dos isolados não teve similaridade conclusiva com as espécies utilizadas nesta análise. As linhagens que apresentaram uma similaridade mais significativa parearam com linhagens ainda desconhecidas contidas na base de dados do GenBank, tais como o isolado TM4 e *Streptomyces* sp. Z2 (94%); o isolado TM5 e *Streptomyces* sp. KN 0647 (99%); o isolado TM68 e *Streptomyces* sp. GE90852 (71%); o isolado TM17 e *Streptomyces* sp. YNUCC0233 (100%), e desta forma, infere-se que sejam novas espécies (Figura 5.4). Entretanto, estudos complementares de hibridização DNA-DNA precisam ser realizados para que o isolamento de novas espécies possa ser confirmado.

A linhagem TM1 no sequenciamento apresentou similaridade de 97% com algumas espécies de *Streptomyces*, no entanto, não mostrou nenhuma similaridade na árvore filogenética com as espécies sugeridas no sequenciamento, valor de *bootstrap* abaixo de 70%, o que pode indicar que seja uma nova espécie também.

Neste experimento, o sequenciamento do rDNA 16S não foi um método eficiente para a identificação de espécies do gênero *Streptomyces* isolados de plântulas de cupuaçuzeiro, sugerimos a utilização de outros marcadores moleculares como o gene *gyr* ou *rpo*.

Todas as linhagens que apresentaram ribotipos únicos pelo ARDRA (fase 1), quando seqüenciadas, a princípio, sugerem ser novas espécies. As quatro linhagens deste grupo (TM22; TM35; TM40 e TM54) que não foram seqüenciadas, devem ser

identificadas e analisadas filogeneticamente para obter o posicionamento taxonômico adequado, pois também podem ser novas espécies.

A princípio, observa-se que a caracterização clássica dos actinomicetos foi corroborada pelo sequenciamento do rDNA 16S das linhagens testadas, onde verificou-se que as mesmas pertenciam ao gênero *Streptomyces*.

Destaca-se a grande ocorrência do gênero *Streptomyces*, onde neste estudo foi isolado tanto de folhas quanto de raízes de plântulas de cupuaçuzeiro. Outros trabalhos mostram que este actinomiceto já foi isolado de outras plantas como gênero majoritário também, dentre os quais destaca-se o trabalho de Sardi *et al.* (1992), onde descrevem o isolamento de 499 actinomicetos, dos quais 482 isolados eram *Streptomyces*, de raízes de 28 espécies de plantas, e mais recentemente, Coombs e Franco (2003) observaram que 88% dos actinomicetos endofíticos de centeio (*Triticum aestivum* L.) pertenciam ao gênero *Streptomyces*.

A elevada incidência do gênero *Streptomyces* nos isolamentos de actinomicetos endofíticos pode ser devido a sua grande diversidade no solo, sua baixa exigência nutricional e sua capacidade em crescer mais rapidamente e abundantemente do que os demais actinomicetos nos meios de cultura. Enghusen (1956 *apud* WAKSMAN, 1959) explica que a ampla distribuição das espécies de *Streptomyces* se dá devido aos pequenos esporos (1 a 1,5 por 0,5 a 0,8  $\mu\text{m}$ ) e pela sua resistência a seca (3 anos ou mais).

Sugere-se que estudos sobre as características fisiológicas e metabólicas do cupuaçuzeiro sejam incentivados para determinar a existência de substância(s) que permita(m) esta grande inter-relação entre os actinomicetos endofíticos e a planta. Deve-se, desta forma, fomentar as pesquisas em áreas básicas como fisiologia, nutrição, genética, relação planta/hospedeiro, e realizar mais experimentos utilizando os actinomicetos endofíticos devido seu grande potencial biotecnológico.

## 6 CONCLUSÕES

A estratégia adotada para o isolamento de actinomicetos endofíticos de cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) foi bem sucedida, permitindo o isolamento de 52 isolados;

Para o isolamento de actinomicetos endofíticos de raízes de plântulas de cupuaçuzeiro o meio de cultivo Rafinose-Histidina Ágar (RH) mostrou-se muito eficiente, enquanto que os meios contendo amido na sua composição, Caseína-Amido Ágar (AC) e ISP 2 acrescido com Amido (ISP 2A), mostraram-se melhores no isolamento de actinomicetos endofíticos das folhas;

A incidência de actinomicetos endofíticos nas raízes de plântulas de cupuaçuzeiro sofre um aumento significativo durante o crescimento da planta, enquanto que nas folhas não ocorre alteração significativa;

Os actinomicetos endofíticos de plântulas de cupuaçuzeiro apresentaram atividade antifúngica e antibacteriana;

Os actinomicetos endofíticos presentes em folhas e raízes de plântulas de cupuaçuzeiro, até 60 dias de germinação, que foram seqüenciados, são pertencentes ao gênero *Streptomyces*;

O isolado TM1 pode representar uma nova espécie do gênero *Streptomyces*, assim como os isolados TM4, TM5, TM17 e TM68 que alinham com espécies de *Streptomyces* ainda desconhecidas.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, J. M. de; SILVA, A. C. da; AZEVEDO, J. L. de. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, n. 4, p. 447-451, 2000.

BACON, C. W.; HINTON, D. M. Isolation and culture of endophytic bacteria and fungi. In: HURST, C. J. (Ed.). **Manual of Environmental Microbiology**. Washington: American Society for Microbiology, 1997.

BALTZ, R. H. Genetic methods and strategies for secondary metabolite yield improvement in actinomycetes. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 79, p. 251-259, 2001.

BARRY, T.; POWELL, R.; GANNON, F. A general method to generate DNA probes for microorganisms. **Biotechnology**, v. 8, p. 233-236, 1990.

BECKING, J. H.; DeBOER, W. E.; HOUWINK, A. L. Electron microscopy of the endophyte of *Alnus glutinosa*. **Antonie Leeuwenhoek Journal of Microbiology and Serology**, v. 30, p. 343-376, 1964.

BENCHIMOL, R. L. **Doenças do cupuaçuzeiro causadas por fungos**. Belém: EMBRAPA, 2000. 50p.

BENSON, D.R.; SILVESTER, W.B. Biology of *Frankia* strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. **Microbiological Reviews**, v. 57, p. 293-319, 1993.

BIEBER, B.; NÜSKE, J.; RITZAU, M.; GRÄFE, U. Alnumycin a new naphthoquinone antibiotic produced by an endophytic *Streptomyces* sp. **The Journal of Antibiotics**, v. 51, n. 3, p. 381-382, 1998.

CALLAHAM, D.; DELTREDICI, P.; TORREY, J. G. Isolation and cultivation *in vitro* of the actinomycete causing root nodulation in *Comptonia*. **Science**, v. 199, p. 899-902, 1978.

CALZAVARA, B. B. G.; MÜLLER, C. H.; KAHWAGE, O. N. C. **Fruticultura Tropical: O cupuaçuzeiro**. v. 32. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1981.

CARUSO, M.; COLOMBO, A. L.; FEDELI, L.; PAVESI, A.; QUARONI, S.; SARACCHI, M.; VENTRELLA, G. Isolation of endophytic fungi and actinomycetes taxane producers. **Annals of Microbiology**, v. 50, p. 3-13, 2000.

CASTILLO, U. F.; HARPER, J. K.; STROBEL, G. A.; SEARS, J.; ALES, K.; FORD, E.; LIN, J.; HUNTER, M.; MARANTA, M.; GE, H.; YAVER, D.; JENSEN, J. B.; PORTER, H.; ROBINSON, R.; MILLAR, D.; HESS, W. M.; CONDRON, M. A. M.; TELOW, D. B. Kakadumicins, novel antibiotics from *Streptomyces* sp. NRRL 30566, an endophyte of *Grevillea pteridifolia*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 224, p. 183-190, 2003.

CASTILLO, U. F.; STROBEL, G. A.; FORD, E. J.; HESS, W. M.; PORTER, H.; JENSEN, J. B.; ALBERT, H.; ROBINSON, 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.

CONN, V. M.; FRANCO, C. M. M. Analysis of the endophytic actinobacterial population in the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) by terminal restriction fragment length polymorphism and sequencing of 16S rRNA clones. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 1787-1794, 2004.

COOMBS, J. T.; FRANCO, C. M. M. Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5603-5608, 2003.

CROSS, T. Growth and examination of actinomycetes - some guidelines. In: HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

DE BAERE, T.; MENDONÇA, R.; CLAEYS, G.; VERSCHRAEGEN, G.; MIJS, W.; VERHELST, R.; ROTTIERS, S.; SIMAEY, L. V.; DE GANCK, C.; VANEECHOUTTE, M. Evaluation of amplified rDNA restriction analysis (ARDRA) for the identification of cultured mycobacteria in a diagnostic laboratory. **BMC Microbiology**, v. 2, n. 4, p. 1-12, 2002.

DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: endophytic N<sub>2</sub> fixing bacteria. **Ciência e Cultura**, v. 44, p. 310-313, 1993.

EL-TARABILY, K. A. An endophytic chitinase-producing isolate of *Actinoplanes missouriensis*, with potential for biological control of root of lupin caused by *Plectosporium tabacinum*. **Australian Journal of Botany**, v. 51, p. 257-266, 2003.

EZRA, D.; CASTILLO, U. F.; STROBEL, G. A.; HESS, W. M.; PORTER, H.; JENSEN, J. B.; CONDRON, M. A. M.; TEFLOW, D. B.; SEARS, J.; MARANTA, M.; HUNTER, M.; WEBER, B.; YAVER, D. Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp. **Microbiology**, v. 150, p. 785-793, 2004.

FAHEY, J. W. Endophytic bacteria for the delivery of agrochemicals to plants. In: CUTLER, H. O. (Ed.). **Biologically active natural products. Potential use in agriculture**. Washington: American Chemical Society, 1988.

FELSENSTEIN J. Phylip-phylogeny inference package. **Cladistics**, v. 5, p. 164-166, 1989.

FREITAS, J. R. de; GERMIDA, J. J. *Pseudomonas cepacia* and *Pseudomonas putida* as winter wheat inoculants for biocontrol of *Rhizoctonia solani*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 780-784, 1991.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. **Taxonomic Outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2 ed. New York: Springer-Verlag, 2003.

GERMIDA, J. J.; SICILIANO, S. D.; DE FREITAS, J. R.; SEIB, A. M. Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 26, p. 43-50, 1998.

GLAZER, A. N.; NIKAIDO, H. **Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology**. Washington: Freeman, 1995.

GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T. Ecology of actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, v. 37, p. 189-216, 1983.

GOODFELLOW, M. The actinomycetes I - Suprageneric classification of actinomycetes. In: WILLIAMS, S. T.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. v. 4. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989. p. 2333-2339.

GOODFELLOW, M.; O'DONNELL, A. G. Chemosystematics: current state and future prospects. In: GOODFELLOW, M.; O'DONNELL, A. G. (Ed.). **Chemical Methods in Prokaryotic Systematics**. Chichester: John Wiley & Sons, 1994.

GOODFELLOW, M.; ISIK, K.; YATES, E. **Actinomycetes systematics: An unfinished synthesis**. Orlando: Academic, 1999.

GOUGH, C.; GALERA, C.; VASSE, J.; WEBSTER, G.; COCKING, E.C.; DÉNARIÉ, J. Specific flavonoids promote intercellular root colonization of *Arabidopsis thaliana* by *Azorhizobium caulinodans*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 10, p. 560-570, 1997.

HALL, V.; LEWIS-EVANS, T.; DUERDEN, B. I. Identification of *Actinomyces*, propionibacteria, lactobacilli and bifidobacteria by amplified 16S rDNA analysis. **Anaerobe**, v. 7, p. 55-57, 2001.

HALL, V.; O'NEILL, G. L.; MAGEE, J. T.; DUERDEN, B. I. Development of amplified 16S ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Actinomyces* species and comparison with pyrolysis-mass spectrometry and conventional biochemical tests. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 2255-2261, 1999.

HALL, V.; TALBOT, P. R.; STUBBS, S. L.; DUERDEN, B. I. Identification of clinical isolates of *Actinomyces* species by amplified 16S ribosomal DNA restriction analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p. 3555-3562, 2001.

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

HARVEY, I.; CORMIER, Y.; BEAULIEU, C.; AKIMOV, V. N.; MÉRIAUX, A.; DUCHAINE, C. Random amplified ribosomal DNA restriction analysis for rapid identification of thermophilic actinomycete-like bacteria involved in hypersensitivity pneumonitis. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 24, p. 277-284, 2001.

HEUER H.; KRSEK M.; BAKER P.; SMALLA K.; WELLINGTON E.M. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3233-3241, 1997.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

HOPPE-SEYLER, T. S.; JAEGER, B.; BOCKELMANN, W.; NOORDMAN, W. H.; GEIS, A.; HELLER, K. J. Identification and differentiation of species and strains of *Arthrobacter* and *Microbacterium barkeri* isolated from smear cheeses with amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and pulsed field gel electrophoresis (PFGE). **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, p. 438-444, 2003.

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

KIM, B.-J.; KIM, C.-J.; CHUN, J.; KOH, Y.-H.; LEE, S.-H.; HYUN, J.-W.; CHA, C.Y.; KOOK, Y.-H. Phylogenetic analysis of the genera *Streptomyces* and *Kitasatospora* based on partial RNA polymerase  $\beta$ -subunit gene (*rpoB*) sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 593-598, 2004.

KOBAYASHI, D. Y.; PALUMBO, J. D. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: BACON, C. W.; WHITE, J. F. **Microbial Endophytes**. New York: Marcel Dekker, 2000.

KURABACHEW, M.; ENGER, Ø.; SANDAA, R.-A.; LEMMA, E.; BJORVATN, B. Amplified ribosomal DNA restriction analysis in the differentiation of related species of mycobacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 55, p. 83-90, 2003.

LANCINI, G.; LORENZETTI, R. **Biotechnology of antibiotics and other bioactive microbial metabolites**. New York: Plenum, 1993.

LANCINI, G.; PARENTI, F.; GALLO, G. G. **Antibiotics: A Multidisciplinary Approach**. New York: Plenum, 1995.

LANE D. J.; PACE B.; OLSEN G. J.; STAHL, D. A.; SOGIN, M. L.; PACE, N. R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America**, v. 82, p. 6955-6959, 1985.

LANE, D. J. 16S/23S RNAr sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York: John Wiley & Sons, 1991. pp. 115-175.

LECHEVALIER, H. A. A practical guide to generic identification of actinomycetes. In: WILLIAMS, S. T., SHARPE, M. E. & HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. v. 4. Baltimore: Williams & Wilkins, 1989. p. 2344-2347.

LECHEVALIER, M. P.; LECHEVALIER, H. A. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 20, p. 435-443, 1970.

LILLEY, A. K.; FRY, J. C.; BAILEY, M. J.; DAY, M. J. Comparison of aerobic heterotrophic taxa isolated from four root domains of mature sugar beet (*Beta vulgaris*). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 21, p. 231-242, 1996.

MASSANA, R.; MURRAY, A. E.; PRESTON, C. M.; DELONG, E. F. Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic archaea in the Santa Barbara channel. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 50-56, 1997.

MATSUMOTO, A.; TAKAHASHI, Y.; MOCHIZUKI, M.; SEINO, A.; IWAI, Y. & OMURA, S. Characterization of actinomycetes isolated from fallen leaves. **Actinomycetologica**, v. 12, n. 1, p. 46-48, 1998.

McCARTHY, A. J.; WILLIAMS, S. T. Methods for studying the ecology of actinomycetes. In: GRIGOROVA, R.; NORRIS, J. R. **Methods in Microbiology: Techniques in microbial ecology**. v. 22. London: Academic, 1990.

McINROY, J. C.; KLOPPER, J. W. Survey of indigeous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, v. 173, p. 337-342, 1995.

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR. Projeto Potencialidades Regionais – Estudo de viabilidade econômica: Cupuaçu. Brasília: Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, 2003.

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

MUNDT, J. O.; HINKLE, N. F. Bacteria within ovules and seeds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 32, p. 694-698, 1976.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NISHIMURA, T.; MEGURO, A.; HASEGAWA, S.; NAKAGAWA, Y. An endophytic actinomycete, *Streptomyces* sp. AOK-30, isolated from mountain Laurel and its antifungal activity. **Journal of General Plant Pathology**, v. 68, p. 390-397, 2002.

NORMANSELL, I. D. Isolation of *Streptomyces* mutants improved for antibiotic production. In: GUNSALUS, I. C. (Editor). **The Bacteria: A treatise on structure and function**. v. 9. London: Academic, 1986.

OKAMI, Y.; HOTTA, K. Search and Discovery of new antibiotics. In: GOODFELLOW, M.; WILLIAMS, S. T.; MORDARSKI, M. (Ed.) **Actinomycetes in Biotechnology**. New York: Academic, 1988. p. 33-67.

PAGE, R. D. M. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applications in the Biosciences**, v. 12, p. 357-358, 1996.

PETROLINI, B.; QUARONI, S.; SARACCHI, M.; SARDI, P.; FEDELI, L. *Actinoplanes* strains isolated from roots: morphological investigations. **Actinomycetes**, v. 6, n. 2, p. 1-10, 1995.

PETROLINI, B.; QUARONI, S.; SARACCHI, M.; SARDI, P. Studies on the streptomycetes population inhabiting plant roots. **Actinomycetes**, v. 2, n. 1, p. 56-65, 1996.

QUADT-HALLMANN, A.; HALLMANN, J.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in cotton: location and interaction with other plant-associated bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1144-1154, 1997.

QUEENER, S. W.; DAY, L. E. **Antibiotic-producing Streptomyces**. v. 9. London: Academic, 1986.

QUISPEL, A. Bacteria-plant interactions in the symbiotic nitrogen fixation. **Physiologia Plantarum**, 74: 783-790, 1988.

ROY, D.; SIROIS, S. Molecular differentiation of *Bifidobacterium* species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of shorts regions of the *ldh* gene. **FEMS Microbiology Letters**, v. 191, p. 17-24, 2000.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor, 1989.

SARACCHI, M.; QUARONI, S.; CORBETTA, C. Variability on *Catellatospora* spp. strains isolated from plant materials. **Annals of Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 13-24, 2004.

SARDI, P.; SARACCHI, M.; QUARONI, S.; PETROLINI, B.; BORGONOV, G. E.; MERLI, S. Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized roots. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 2691-2693, 1992.

SESSITSCH, A.; REITER, B.; PFEIFER, U.; WILHELM, E. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and *Actinomycetes*-specific PCR of 16S RNAr genes. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 39, p. 23-32, 2002.

SHIMIZU, M.; FUJITA, N.; NAKAGAWA, Y.; NISHIMURA, T.; FURUMAI, T.; IGARASHI, Y.; ONAKA, H.; YOSHIDA, R.; KUNOH, H. Disease resistance of tissue-cultured seedlings of rhododendron after treatment with *Streptomyces* sp. R-5. **Journal of General Plant Pathology**, v. 67, p. 325-332, 2001.

SHIMIZU, M.; NAKAGAWA, Y.; SATO, Y.; FURUMAI, T.; IGARASHI, Y.; ONAKA, H.; YOSHIDA, R.; KUNOH, H. Studies on endophytic actinomycetes (I): *Streptomyces* sp. Isolated from Rhododendron and its antifungal activity. **Journal of General Plant Pathology**, v. 66, p. 360-366, 2000.

SHIRLING, E. B.; GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 16, n. 3, p. 313-340, 1966.

SILVER, W. S. Root nodule symbiosis. I. Endophyte of *Myrica cerifera*. **Journal of Bacteriology**, v. 87, p. 416-421, 1964.

STACKEBRANDT, E.; RAINEY, F. A.; WARD-RAINEY, N. L. Proposal for a new hierarchic classification system *Actinobacteria* classis nov.. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 479-491, 1997.

STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; COELHO, L. C. B. B.; ARAÚJO, J. M. Production and characterization of a thermostable  $\alpha$ -amylase from *Nocardiopsis* sp. endophyte from yam bean. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 137-141, 2001.

STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; COELHO, L. C. B. B.; ARAÚJO, J. M. Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. Endophyte of maize leaves. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 105-109, 2002.

SWOFFORD, D. L. **PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods)**. Sunderland: Sinauer Associates. 1998.

TAECHOWISAN, T.; PEBERDY, J. F.; LUMYONG, S. Isolation of actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 381-385, 2003.

TIAN, X. L.; CAO, L. X.; TAN, H. M.; ZENG, Q. G.; JIA, Y. Y.; HAN, W. Q.; ZHOU, S. N. Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from rice and their antipathogenic activities *in vitro*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 303-309, 2004.

TORREY, J. G.; TJEPKEMA, J. D. Symbiotic nitrogen fixation in actinomycete-nodulated plants. **Botanical Gazette**, v. 140 (Suppl.), p. 1-2, 1979.

UETANABARO, A. P. T. **Taxonomia e triagem da atividade antimicrobiana e antitumoral de actinomicetos raros isolados de *Tocoyena formosa* (Cham. et Sch.) K. Shun.** 2004. 130 p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

VAKULENKO, S. B.; MOBASHERY, S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 430-450, 2003.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 2, p. 407-438, 1996.

VANEECHOUTTE, M.; RIEGEL, P.; BRIEL, D. D.; MONTEIL, H.; VERSCHRAEGEN, G.; ROUCK, A. D.; CLAEYS, G. Evaluation of the applicability of amplified rDNA-restriction analysis (ARDRA) to identification of species of the genus *Corynebacterium*. **Research in Microbiology**, v. 146, p. 633-641, 1995.

VIGAL, T.; GIL, J. F.; DAZA, A.; GARCIA-GONZALES, M. D.; MARTIN, J. F. Cloning, characterization and expression of an  $\alpha$ -amylase gene from *Streptomyces griseus* IMRU 3570. **Molecular General Genetics**, v. 225, p. 278-288, 1991.

VILLACHICA, H. **Frutales y Hortalizas Promissorios de la Amazonia**. Lima: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), 1996.

WAKSMAN, S. A. Standardization of streptomycin. **Science**, v. 102, p. 40-41, 1945.

WAKSMAN, S. A. **The Actinomycetes: Nature, occurrence, and activities**. v. 1. Baltimore: Williams & Wilkins, 1959.

WAKSMAN, S. A.; WOODRUFF, H. B. *Actinomyces antibioticus* a new soil organism antagonistic to pathogenic and non-pathogenic bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 42, p. 231-249, 1941.

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

ZINNIEL, D. K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N. B.; FENG, Z.; KUCZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C. A.; ARUNAKUMARI, A.; VIDAVER, A. K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2198-2208, 2002.

ZIPEL, M.; NEIGENFIND, M. Preservation of streptomycetes. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 34, p. 7-14, 1988.

## 8 APÊNDICE

### 8.1 Meios de Culturas

Todos os meios de cultura foram preparados utilizando componentes de qualidade certificada (Difco e Merck) e foram esterilizados em autoclave a 121° C durante 15 minutos.

#### 8.1.1 Ágar Amido-Caseína (AC)

Amido.....	10,0 g
Caseína .....	0,3 g
Nitrato de potássio .....	2,0 g
Cloreto de sódio.....	2,0 g
Fosfato hidrogeno dipotássico.....	2,0 g
Sulfato de magnésio.....	0,05 g
Carbonato de cálcio.....	0,02 g
Sulfato ferroso .....	0,01 g
Ágar .....	25,0 g
Água destilada .....	1000 mL
	pH 7,2 ± 0,2

#### 8.1.2 Ágar Extrato de Levedura-Extrato de Malte (ISP 2)

Extrato de levedura.....	4,0 g
Extrato de malte.....	10,0 g
Dextrose .....	4,0 g
Ágar .....	20,0 g
Água destilada .....	1000 mL
	pH 7,3

### 8.1.3 Ágar Extrato de Levedura-Extrato de Malte modificado (ISP 2A)

Amido.....	10,0 g
Extrato de levedura.....	4,0 g
Extrato de malte.....	10,0 g
Dextrose .....	4,0 g
Ágar .....	20,0 g
Água destilada .....	1000 mL
	pH 7,3

### 8.1.4 Ágar Farinha de Aveia (ISP 3)

Farinha de aveia .....	20,0 g
Solução de traços de sais .....	1,0 mL
Ágar .....	18,0 g
Água destilada .....	1000 mL
	pH 7,2

### 8.1.5 Ágar Müeller-Hinton (MH)

Extrato de carne .....	2,0 g
Hidrolisado ácido de caseína.....	17,5 g
Amido.....	1,5 g
Ágar .....	17,0 g
Água destilada .....	1000 mL
	pH 7,3 ± 0,1

### 8.1.6 Ágar Peptona-Extrato de levedura-Ferro (ISP 6)

Ágar peptona-ferro.....	36,0 g
Extrato de levedura.....	1,0 g
Água destilada .....	1000 mL
	pH 7,1 ± 0,1

### 8.1.7 Ágar Rafinose-Histidina (RH)

Rafinose.....	10,0 g
L-histidina .....	1,0 g
Sulfato de magnésio.....	0,5 g
Sulfato ferroso .....	0,01 g
Ágar .....	25,0 g
Água destilada .....	1000 mL
	pH 7,2 ± 0,2

### 8.1.8 Ágar Sabouraud (SAB)

Peptona .....	10,0 g
Glicose.....	40,0 g
Ágar .....	15,0 g
Água destilada .....	1000 mL
	pH 5,6 ± 0,2

### 8.1.9 Ágar Sais Inorgânicos-Amido (ISP 4)

Solução de traços de sais.....	2,0 mL
Solução I.....	500 mL
Solução II.....	500 mL
Ágar .....	20,0 g
	pH 7,2 ± 0,2

### 8.1.10 Ágar Soja-Trypticaseína (CASOY)

Peptona de caseína.....	15,0 g
Peptona de soja.....	5,0 g
Cloreto de sódio.....	5,0 g
Ágar .....	15,0 g
Água destilada.....	1000 mL
	pH 7,3 ± 0,2

### 8.1.11 Ágar Tirosina (ISP 7)

Glicerol .....	15,0 g
L-tirosina.....	0,5 g
L-asparagina.....	1,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anidro) .....	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0,5 g
NaCl.....	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O .....	0,01 g
Solução de traços de sais.....	1,0 mL
Ágar .....	20,0 g
Água destilada.....	1000 mL
	pH 7,3 ± 0,1

### 8.1.12 Meio 1 (M1)

Glicose.....	10,0 g
Farinha de soja.....	10,0 g
Cloreto de sódio.....	1,0 g
Carbonato de cálcio.....	5,0 g
Água destilada.....	1000 mL
	pH 7,2 ± 0,2

## 8.2 Soluções

### 8.2.1 Solução I

Amido.....	20,0 g
Água destilada .....	500 mL

### 8.2.2 Solução II

Fosfato hidrogeno dipotássico.....	2,0 g
Sulfato de magnésio .....	2,0 g
Cloreto de sódio.....	2,0 g
Sulfato de amônio.....	4,0 g
Carbonato de cálcio.....	4,0 g
Água destilada.....	500 mL

### 8.2.3 Solução de traços de sais

Sulfato ferroso .....	0,1 g
Cloreto manganoso .....	0,1 g
Sulfato de zinco .....	0,1 g
Água destilada.....	100 mL