**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

IARA DONADÃO PRETO

**Identificação do potencial biotecnológico de microrganismos
endofíticos na produção de compostos inseticidas e
biorremediação**

Piracicaba

2018

IARA DONADÃO PRETO

**Identificação do potencial biotecnológico de microrganismos
endofíticos na produção de compostos inseticidas e
biorremediação**

**Dissertação apresentada ao Centro de
Energia Nuclear na Agricultura da
Universidade de São Paulo para a obtenção
do título de Mestre em Ciências**

**Área de Concentração: Biologia na
Agricultura e no Ambiente**

Orientador: Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Piracicaba

2018

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Preto, Iara Donadão

Identificação do potencial biotecnológico de microrganismos endofíticos na produção de compostos inseticidas e biorremediação / Iara Donadão Preto; orientador João Lúcio de Azevedo. - - Piracicaba, 2018.

101 p. : il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Biodegradação 2. Bioprospecção 3. Biorremediação 4. Biotecnologia 5. Entomotoxina 6. Inseticidas 7. Metabólitos secundários 8. Microrganismos endofíticos 9. Milho 10. Relação planta-hospedeiro

CDU 606 : 579.64

Elaborada por:

Marília Ribeiro Garcia Henyei

CRB-8/3631

Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu querido orientador Prof. João Lúcio de Azevedo por manter sua porta sempre aberta.

Ao Prof. Fernando Luís Cònsoli por ter me recebido tão bem em seu Laboratório, pela grande contribuição na minha formação profissional e pessoal, por sua orientação, paciência e atenção sem as quais esse trabalho não seria possível.

Aos professores que contribuíram para minha formação. E todos que removem as barreiras no caminho da ciência e do conhecimento.

Aos meus amigos de laboratório Ana Flávia G., Bruna, Caio, Diandra, Fábio Dossi, Fábio Duarte, Pedro, Wanessa; pela companhia e boas conversas, em especial para meus orientadores particulares Ana Flávia C. e Luís Gustavo que tonaram o meu dia-a-dia muito mais produtivo e alegre.

Minha eterna gratidão aos meus pais, Antenor e Leonice, pela paciência infinita, apoio emocional e financeiro, e por nunca duvidarem do seu pequeno sanhaço. E à minha família por sempre me apoiarem.

À todos os meus amigos da vida por me sustentarem emocionalmente. À Juanita e ao João Gabriel pelas ótimas conversas de temas confusos. À Brunna e Karina por me manterem ligada por toda a vida com a pequena Iara. Às minhas amigas Aline, Jéssica, Marina D., Luciana e Marina N. por sempre me lembrarem de viver o agora. Ao Fábio Raya, meu biotecnologista favorito e parceiro na vida, por sempre me mostrar que sou capaz, engrandecer meus dias e ver junto comigo a magia da ciência nas menores coisas do cotidiano.

Agradeço à CAPES; pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

RESUMO

PRETO, I. D. **Identificação do potencial biotecnológico de microrganismos endofíticos na produção de compostos inseticidas e biorremediação**. 2018. 101 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.

Microrganismos endofíticos apresentam grande diversidade genética e metabólica, com enorme potencial biotecnológico para aplicações em diferentes áreas. A bioprospecção desses microrganismos possibilita a obtenção de novos bioprodutos agrícolas. Endofíticos podem ser aplicados, por exemplo, para a biorremediação de áreas contaminadas ou para o controle de insetos pragas pela produção de compostos entomotóxicos. Apesar de sua importância, ainda existem poucos estudos voltados à bioprospecção da microbiota endofítica em regiões tropicais. Assim, o presente trabalho pretendeu verificar a diversidade de microrganismos endofíticos cultiváveis em milho e a comparar a diversidade de metabólitos desses endofíticos ao de isolados de *Citrus*. Também foi explorado o potencial dos diferentes endófitos em degradar os principais inseticidas (lufenuron, spinosad, chlorpyrifos ethyl, lambda-cyhalothrin e deltamethrin) utilizados em lavouras de milho para o controle de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae), para exploração dos mesmos em programas de biorremediação. Finalmente, foi avaliado o potencial entomotoxida dos extratos orgânicos dos endofíticos estudados até a identificação das moléculas ativas. Foram isolados 30 microrganismos endofíticos de milho (27 bactérias e 3 fungos), os quais foram comparados aos endófitos de citros do acervo do Laboratório de Genética de Microrganismos "Prof. João Lúcio de Azevedo". Dos isolados obtidos, sete apresentaram capacidade de metabolização dos cinco inseticidas testados, sendo a maioria deles capaz de metabolizar pelo menos um dos inseticidas testados. Ensaio de bioatividade dos extratos orgânicos do cultivo dos endofíticos contra lagartas de *S. frugiperda*, levaram à identificação de extratos que induziram 100% de mortalidade de lagartas do terceiro ínstar. O isolamento e a caracterização da molécula ativa do extrato produzido pelo isolado LGM-CR-JM-02 - *Streptomyces badius*, permitiu a identificação da valinomicina ($CL_{50} = 4,38 \mu\text{g/mL}$) como molécula ativa. Assim, demonstramos que a comunidade de endofíticos pode reunir grande diversidade biológica e, principalmente, metabólica, sendo uma excelente oportunidade para exploração de microrganismos com potencial para biorremediação e produção de compostos com atividade inseticida.

Palavras-chave: Microrganismo endofítico. Bioprospecção. Biorremediação. Entomotoxina.

ABSTRACT

PRETO, I. D. Identification of biotechnological potential of endophytic microorganisms in the production of insecticidal compounds and bioremediation. 2018. 101 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2018.

Endophytes are microorganisms with great genetic and metabolic diversity, and with a huge biotechnological potential for applications in different areas. The bioprospection of these microorganisms makes possible to obtain new agricultural bioproducts. Endophytes may be applied, for example, to bioremediation of contaminated areas or to the control of pest insects with entomotoxic compounds. Despite its importance, there are few studies focused on the bioprospection of endophytic microbiota in tropical regions. Thus, we investigated the biological diversity of culturable endophytes from maize and compared the diversity of metabolites endophytes from maize and Citrus produced. We also explored the potential of different endophytes to grow in minimum medium containing one of the main insecticides (lufenuron, spinosad, chlorpyrifos ethyl, lambda-cyhalothrin and deltamethrin) applied in maize crops to control the caterpillars *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae) as the only source of carbon in order to evaluate their potential use in bioremediation programs. Finally, we evaluated the entomotoxic potential of the organic extracts of the endophytes and the fractions up to the identification of the active molecules. In total, thirty maize endophytes (27 bacteria and 3 fungi) and five endophytes isolated from citrus that were deposited at the collection of the Laboratory of Genetics of Microorganisms "Prof. João Lúcio de Azevedo" were investigated. Seven out of 35 endophytes tested metabolized the five insecticides used, and most of them were able to metabolize at least one of the tested insecticides. Bioactivity assays of the organic extracts produced from cultured endophytes were fed to third instars of *S. frugiperda* causing 100% mortality. The isolation and characterization of the active molecule produced by one of these isolates (LGM-CR-JM-02 - *Streptomyces badius*) led to the identification of valinomycin ($LC_{50} = 4.38 \mu\text{g} / \text{mL}$) as the active molecule. Thus, we demonstrated that endophytes can gather great biological and metabolic diversities, demonstrating endophytes are an excellent opportunity for the identification of microorganisms with potential for bioremediation and production of compounds with insecticidal activity.

Keywords: Endophytic microorganism. Bioprospecting. Bioremediation. Entomotoxin.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	111
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
3. UM OLHAR RÁPIDO NA DIVERSIDADE BIOLÓGICA E MATABÓLICA DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS DO MILHO	25
3.1. Introdução	27
3.2. Material e Métodos	29
3.2.1. Isolados	29
3.2.1.1. Isolamento de microrganismos endofíticos	29
3.2.1.2. Cultivo de microrgaismos endofíticos	29
3.2.2. Identificação molecular	30
3.2.2.1. Construção de árvore filogenética	31
3.2.3. Identificação metabólica	32
3.2.3.1. Fermentação e extração	32
3.2.3.2. Análise dos metabólitos	32
3.3. Resultados	33
3.3.1. Caracterização molecular	33
3.3.1.1. Árvores filogenéticas	36
3.3.2. Análise comparativa da diversidade e da intensidade de metabólitos	39
3.4. Discussão	44
3.5. Conclusões	47
4. UTILIZAÇÃO DE INSETICIDAS PARA O CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS DE MILHO – SÃO ELES POTENCIAIS BIORREMEDIADORES?	55
4.1. Introdução	57
4.2. Material e Métodos	59
4.2.1. Ensaio de capacidade crescimento em meio com inseticida	59

4.2.2.	Curva de crescimento.....	59
4.2.2.1.	<i>Pré-inóculo</i>	59
4.2.2.2.	<i>Cultivo</i>	60
4.3.	Resultados	60
4.3.1.	Capacidade de crescimento	60
4.3.2.	Curvas de crescimento.....	62
4.4.	Discussão	63
4.5.	Conclusões	64
5.	BIOPROSPECÇÃO DE COMPOSTOS DE ATIVIDADE INSETICIDA	69
5.1.	Introdução	71
5.2.	Material e Métodos	74
5.2.1.	Produção de extratos de microrganismos endofíticos para ensaios biológicos	74
5.2.2.	Atividade inseticida.....	74
5.2.2.1.	<i>Criação de Spodoptera frugiperda (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)</i>	74
5.2.2.2.	<i>Ensaio in vivo</i>	75
5.2.2.3.	<i>Determinação de concentrações letais médias</i>	75
5.2.3.	Isolamento dos compostos ativos.....	76
5.2.3.1.	<i>Identificação molecular dos compostos</i>	77
5.3.	Resultados	78
5.3.1.	Atividade inseticida <i>in vivo</i>	78
5.3.2.	Determinação da curva resposta à valinomicina	91
5.4.	Discussão	93
5.5.	Conclusão	95
6.	CONSIDERAÇÕES GERAIS	101

1. INTRODUÇÃO

Microrganismos endofíticos habitam tecidos vegetais sem causar efeitos negativos à planta hospedeira. A colonização e distribuição dos microrganismos endofíticos são influenciadas por fatores bióticos e abióticos aos quais o hospedeiro está exposto^{1,2}. Esses organismos apresentam uma relação íntima com a planta, recebendo grande variedade e quantidade de nutrientes, além de abrigo. Em retorno, substâncias do metabolismo secundário dos endofíticos podem influenciar positivamente o crescimento, a imunidade, e a resistência do hospedeiro às condições ambientais adversas e à herbivoria²⁻⁴. Microrganismos endofíticos são muito diversos, representados principalmente por fungos e bactérias. Apresentam densidade variável dependendo da espécie e fase de desenvolvimento do hospedeiro. Os metabólitos produzidos por esses microrganismos também se alteram dependendo da associação hospedeiro-endófitos^{1,2,5,6}.

Existe um grande interesse pelos metabólitos produzidos pelos microrganismos endofíticos para utilização em sistemas de produção agrícola. Isso ocorre pelo potencial biotecnológico e a possibilidade do isolamento, cultivo e produção em larga escala e seus compostos⁷⁻⁹. Para a obtenção de novas moléculas ou isolados é aplicada a técnica de bioprospecção, onde existe grande interesse por nichos ecológicos pouco explorados. Dado que a maior parte das pesquisas envolvendo endófitos é conduzida em regiões temperadas, e nem sempre seus resultados são eficientes para aplicação na agricultura tropical, a qual é a mais afetada por pragas agrícolas¹. Desta maneira, regiões tropicais são uma ótima opção de ambiente para exploração de microrganismos e potenciais compostos bioativos⁷.

No Brasil, o milho, *Zea mays* (L.) (Poales, Poaceae), uma das principais *commodities* agrícolas do país, tem como sua principal praga a lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)¹⁰. Essa praga polífaga é responsável pela perda de 400 milhões de dólares anualmente no Brasil¹¹. Mesmo com a disponibilidade de plantas geneticamente modificadas de milho, ainda se faz uso intenso de inseticidas sintéticos em áreas de cultivo de milho Bt¹². O uso intensivo desses produtos, sem as devidas medidas para o manejo da resistência a inseticidas, tem levado à perda da eficiência e gerado problemas de contaminação do solo e das reservas de água¹¹.

A interação milho - *Spodoptera frugiperda* é sujeita a diversos fatores de seleção que podem também pressionar a microbiota associada ao milho, levando à seleção da microbiota endofítica com capacidade de contribuir com compostos bioativos em resposta à herbivoria e/ou de metabolização dos inseticidas orgânicos que entram em contato com a planta e/ou são acumulados no solo. Com base nessas informações, esse trabalho teve por objetivos i) isolar, identificar e caracterizar microrganismos endofíticos associados ao milho; ii) observar o potencial de utilização dos principais inseticidas aplicados no controle de *S. frugiperda* por endófitos do milho; iii) isolar e identificar compostos com atividade inseticida.

Referências

1. Azevedo, J. L.; Maccheroni Junior, W.; Pereira, J. O.; de Araújo, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Eletronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 3, 2000. <http://www.ejb.org/content/vol3/issue1/full/4>.
2. Eljounaidi, K.; Lee, S. K.; Bae, H. Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases – Review and future prospects. **Biological Control**, Atlanta, v. 103, p. 62–68, 2016.
3. Gonzalez, F. et al. New opportunities for the integration of microorganisms into biological pest control systems in greenhouse crops. **Journal of Pest Science**, Heidelberg, v. 89, p. 295–311, 2016.
4. Yadav, A. Exploring the potential of endophytes in agriculture: a minireview. **Advances in Plants & Agricultural Research**, Edmond, v. 6, n. 4, 2017. doi: 10.15406/apar.2017.06.00221.
5. Müller, C. A.; Obermeier, M. M.; Berg, G. Bioprospecting plant-associated microbiomes. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 235, p. 171–180, 2016.
6. Stępniewska, Z.; Kuźniar, A. Endophytic microorganisms - Promising applications in bioremediation of greenhouse gases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 97, p. 9589–9596, 2013.
7. Strobel, G. D. B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural product. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v. 67, p. 491–402, 2003.
8. O’Callaghan, M. Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 100, p. 5729–5746, 2016.
9. Frank, A.; Saldierna Guzmán, J.; Shay, J. Transmission of bacterial endophytes. **Microorganisms**, Basel, v. 5, n. 4, 2017. doi: 10.3390/microorganisms5040070.
10. Gallo, D. et al. Pragas das plantas e seu controle. In: _____. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. p. 839–845.

11. Cruz, I.; Figueiredo, M. L. C.; Silva, R. B.; Foster, J. E. Efficiency of chemical pesticides to control. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 9, p. 107–122, 2010.
12. Farias, J. R. et al. Dominance of Cry1F resistance in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on TC1507 Bt maize in Brazil. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 72, p. 974–979, 2016.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A microbiota endofítica é constituída por um grupo de microrganismos composto principalmente por fungos e bactérias, que habitam o interior de plantas sem causar sintomas negativos. Passam seu ciclo inteiro, ou parte dele, no interior de tecidos vegetais, invadindo-os por meio de aberturas naturais, como os estômatos, ou por microferimentos na superfície de folhas, pelo atrito com partículas sólidas presentes no ambiente e/ou nas raízes, ocasionados pelo contato das mesmas durante o seu crescimento com as partículas do solo¹⁻⁵. Endófitos estão presentes em todas as plantas vasculares já analisadas e podem colonizar todos os tecidos da planta hospedeira, em maior ou menor densidade^{2,4,6-8}. Trata-se de uma comunidade que apresenta distribuição e densidade dinâmica, e que é influenciada por fatores como a estrutura físico-química do solo, as condições ambientais, a fase de desenvolvimento e o estado fisiológico da planta hospedeira^{2,4,6,7}. Sua transmissão entre plantas pode ocorrer de forma vertical ou horizontal. A transmissão vertical acontece em relações unicamente positivas, mutualísticas e/ou obrigatórias, indicando maior proximidade na relação. Relações de mutualismo (simbiose obrigatória) são raras, ocorrendo normalmente via transmissão vertical da planta mãe, às suas sementes¹. A diversidade de espécies encontradas em uma semente é muito menor do que aquela em plantas adultas, indicando que a maior parte dos microrganismos na planta vem diretamente pelo seu contato com o ambiente, sendo, assim, transmitida horizontalmente. Isso ocorre porque a colonização de uma planta por um endófito está mais relacionada à fase de desenvolvimento e ao ambiente ao qual a planta está exposta do que à sua espécie^{1,2}.

As respostas bioquímicas e fisiológicas envolvidas nas interações endófitos - hospedeiro ainda são pouco entendidas. Os mecanismos pelos quais toda a comunidade endofítica existe e reage ao seu entorno ainda é pouco esclarecida, assim como sua diversidade genética e metabólica. Ainda existem muitas lacunas dessa relação a serem preenchidas^{9,10}. O que se sabe é que, normalmente, os endófitos se utilizam de grande variedade e quantidade de nutrientes disponíveis na planta hospedeira, enquanto usufruem do ambiente intercelular dos tecidos do hospedeiro como abrigo. Em retorno, eles produzem substâncias que podem aumentar o crescimento e a resistência da planta às condições ambientais e aos

patógenos e herbívoros. Essas características surgiram ou se intensificaram com a evolução da interação microrganismos - plantas hospedeiras, onde ocorreu inicialmente a redução na capacidade de síntese de enzimas pelos microrganismos, seguido do aumento da dependência dos nutrientes cedidos pela planta e maior produção de metabólitos secundários benéficos^{1,2,6,11}. Contudo, é muito complicado estabelecer um limite entre os microrganismos endofíticos e os patogênicos. Existe uma relação íntima entre eles, onde pequenas modificações genéticas podem levar uma linhagem patogênica a desempenhar papel na proteção de seu hospedeiro. Adicionalmente, também há casos em que um microrganismo é benéfico a uma planta hospedeira, enquanto apresenta patogenicidade a outras⁵.

Bioprospecção é definida como a busca e descoberta de novos produtos de origem biológica para a comercialização e aplicação em áreas farmacológicas, industriais, agrícolas e comerciais¹². Os endófitos se destacam na bioprospecção em relação aos outros microrganismos por fazerem parte de um nicho biológico ainda pouco explorado e muito diverso⁹. Alguns dos produtos que os microrganismos endofíticos podem fornecer são: enzimas de interesse industrial, metabólitos secundários como fitormônios, antibióticos, moléculas de *quorum-sensing* e compostos orgânicos voláteis (VOCs). Adicionalmente, os isolados podem ser utilizados diretamente para a sua aplicação como promotor de crescimento da planta ou como auxiliar na proteção do hospedeiro contra estresse abiótico e patógenos. Finalmente, também podem ser explorados na biorremediação de áreas contaminadas^{4,2,12,8}.

Além da solubilização de fósforo, no geral, as substâncias que auxiliam na promoção de crescimento de plantas produzidas pelos endófitos são: ácido indol-3-acético (IAA), 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC), giberelinas (GAs), etileno, auxinas e sideróforos^{11,13-18}. Exemplos dessa natureza são os endófitos isolados de *Lonicera japonica* Thunb. (Dipsacales, Caprifoliaceae), que produziram moléculas promotoras de crescimento *in vitro* e aumentaram o crescimento do trigo *in vivo* (comprimento de raiz e caule, peso úmido e seco, teor de clorofila)¹³, e a linhagem LK11 de *Sphingomonas* sp., que produz IAA e giberelinas, e quando inoculada em plantas de tomate aumenta o crescimento em relação a plantas não inoculadas¹⁸. Antibióticos como ecomicina, pseudomicina, munumbicina e xiamicina também já foram isolados de endófitos de diversas plantas.

Esses antibióticos podem ter diversas aplicações, tanto na saúde humana e animal, como também na agricultura¹¹. O fungo *Pestalotiopsis microspora* (Speg.) G.C. Zhao & N. Li (Xylariales, Sporocadaceae) endofítico da árvore de noz moscada, *Torreya taxifolia* Arn. (Pinales, Cephalotaxaceae), produz compostos fungicidas como as pironas pestalopirona e hidroxipestalopirona⁹. Diversas bactérias endofíticas da família *Pseudomonadaceae* produzem pseudomicinas, lipopeptídeos com atividade fungicida descrita a vários fungos patogênicos de plantas e de seres humanos⁹. Isolado da árvore australiana *Grevillea pteridifolia* Knight (*Proteales*, *Proteaceae*), o actinomiceto NRRL 30566 produziu kakadumicinas, novos antibióticos de amplo espectro, ativos principalmente contra bactérias Gram-positivas⁹.

A produção e o consumo de alimentos têm sido crescente, tornando necessário o uso contínuo de produtos sintéticos no controle de insetos pragas, fitopatógenos e daninhas. A aplicação em larga escala desses produtos acaba levando à contaminação de áreas e solos agrícolas¹⁹. Para a recuperação dessas áreas é necessária a aplicação de processos que atenuem ou corrijam o impacto dos agentes contaminantes, para assim voltarem a ser áreas com funcionalidade ecológica ou agrícola²⁰.

A biorremediação é uma opção para a recuperação dessas áreas contaminadas por produtos sintéticos¹¹. Biorremediação é um processo que aplica agentes biológicos para minimizar a concentração de poluentes, com o objetivo de estabilizar e reduzir os riscos em um local^{11,20}. Quando comparados aos métodos químicos e físicos de remediação, os processos de biorremediação apresentam como vantagens o seu menor custo e o uso de recursos ecologicamente corretos²⁰. Na biorremediação são aplicados diversos métodos que podem degradar, imobilizar, mineralizar, transformar ou remover os agentes contaminantes. Esses métodos podem ser aplicados *in situ*, com o tratamento no mesmo local da contaminação, ou *ex situ*, com a retirada do material contaminado para tratamento em outro local. A escolha do melhor método de biorremediação leva em consideração a natureza do agente poluente, o tipo de ambiente, a localização e o nível de contaminação²⁰.

Biorremediações *ex situ* consideram também a geografia e geologia do local contaminado. Tendo como exemplos o uso de biorreatores, onde o material contaminado é colocado em recipientes e através de reações biológicas é convertido em produtos de menor risco. O processo de compostagem por empilhamento (*biopile*) e sistemas *Windrow* e *Land farming*, que aplicam tratamentos parecidos,

onde o solo poluído é escavado e depositado sobre o solo sadio com nutrientes, irrigação e aeração, formando um sistema de bioestimulação da microbiota que atuará nos poluentes. Já na biorremediação *in situ* temos a atenuação natural, que também é chamada de biorremediação intrínseca, onde é feito apenas o monitoramento das concentrações de poluentes e espera-se que a microbiota nativa diminua a contaminação²⁰. Outros métodos são as bioestimulações, com adição de fluxo de ar (bioventilação) ou remoção de vapores (*bioslurping*) dos locais contaminados, que são aplicadas para melhorar as condições e atividade dos microrganismos nativos. Com a identificação de microrganismos com atividade biorremediadora, pode-se adicioná-los aos diferentes processos citados, aumentando a capacidade da microbiota presente^{8,20}.

Em todas essas opções de métodos de biorremediação, microrganismos são os principais agentes de descontaminação, desempenhando processos diretos de bioacumulação, biodegradação ou biotransformação de substâncias tóxicas²⁰. Contudo, a microbiota pode atuar também de forma indireta, como ocorre na fitorremediação. Fitorremediação é a técnica de biorremediação que usa plantas e suas interações para atenuar poluentes em locais contaminados²⁰. Nesse método, microrganismos endofíticos auxiliam no crescimento da planta, na tolerância das raízes aos contaminantes e na degradação de poluentes bioacumulados pelas plantas^{8,11,20}. Microrganismos endofíticos também podem ser aplicados na biorremediação de forma direta⁸, dado que a maior parte desses microrganismos apresenta, além da simbiose, fases de vida livre no ambiente⁵. O interesse na exploração de microrganismos para biorremediação é devido à sua grande diversidade, o que possibilita respostas de tolerância e de degradação a uma grande gama de toxinas⁸.

Um exemplo de biorremediação por microrganismo endofítico é o da bactéria *Paenibacillus* sp., que foi isolada da planta medicinal/daninha erva-de-touro - *Tridax procumbens* L. (Asterales, Asteraceae). Essa bactéria apresentou resistência aos metais pesados Cu, Zn, As e Pb, capacidade de remoção de Cu e Zn do meio, e produção de substâncias promotoras de crescimento de plantas²¹. Bactérias endofíticas, principalmente *Bacillus* sp, isoladas das plantas *Pteris vittata* L. e *Pteris multifida* Poir. (Polypodiales, Pteridaceae) apresentaram tolerância e capacidade de oxidação e redução de diferentes formas de arsênico²². Já as bactérias metanotróficas *Methylocella palustris* Dedysh et al., 2000 e

Methylocapsa acidiphila Dedysh, 2002 (Rhizobiales, Beijerinckiaceae), endofíticos do musgo *Sphagnum* spp., possuem capacidade de oxidar o gás metano em dióxido de carbono, o qual é então redirecionado para uso na fotossíntese da planta hospedeira⁸. As bactérias *Bacillus cereus* Frankland & Frankland, 1887 (Bacillales, Bacillaceae), *Staphylococcus pasteurii* Chesneau et al., 1993 (Bacillales, Staphylococcaceae) e *Pseudomonas* sp. foram isoladas de plantas crescendo em solo contaminado por resíduos de lama asfáltica e demonstraram capacidade de degradação de hidrocarbonetos (petróleo, óleo diesel e gasolina) em um período de 48 a 72 h¹⁰.

A identificação de novos compostos com atividade inseticida é importante para o combate de espécies pragas, incluindo aquelas que já adquiriram resistência, além de permitir a substituição de produtos que causam problemas ambientais. Nesse cenário, os endófitos podem colaborar impedindo a herbivoria através do espessamento da parede celular da planta hospedeira, da produção de metabólitos secundários próprios ou pela indução da produção de metabólitos pelas plantas^{3,11}. Os metabólitos secundários de endofíticos são comercialmente interessantes, pois podem ser produzidos em larga escala através de fermentações, e os custos de produção de produtos de origem microbiana são menores que os de produtos sintéticos, o que reduz o custo final significativamente⁹.

Os primeiros registros de atividade inseticida por endófitos são do início dos anos 80⁴. Atualmente, mesmo sendo conhecidos inúmeros deles produtores de compostos ativos, bioinseticidas ainda representam uma porção pequena no mercado de inseticidas. Um exemplo de composto inseticida vem do fungo *Nodulisporium* sp., produtor de ácidos nodulisporícos que possuem atividade acaricida e inseticida^{9,23}. Exemplos adicionais incluem o produto comercial Mycostop (Kemira Agro Oy), um biofungicida baseado no actinomiceto *Streptomyces griseoviridis* Anderson, 1956 (Actinomycetales, Streptomycetaceae) cepa K61²⁴, os fungos *Acremonium* spp. e *Epichloë typhina* (Pers.) Tul. & C. Tul (Hypocreales, Clavicipitaceae), que produzem os alcaloides peramina e ergovalina, ativos no controle dos pulgões *Rhopalosiphum padi* Linnaeus (1758) (Hemiptera, Aphididae) e *Schizaphis graminum* Rondani (1852) (Hemiptera, Aphididae)²⁵. Os principais compostos microbianos aplicados no controle de artrópodes são as espinosinas e avermectinas. Espinosinas são um grupo de inseticidas produzidos pela fermentação de *Saccharopolyspora spinosa* Mertz & Yao (1990) (Actinomycetales,

Pseudonocardaceae), apresentam alta atividade aos organismos alvo e baixo efeito adverso ao meio ambiente^{26,27}. As espinosinas A e D são as mais aplicadas dessa família de produtos naturais. Normalmente são usadas em conjunto levando o nome de spinosad²⁶. A bactéria *Streptomyces avermitilis* (Burg, 1979) Kim e Goodfellow (2002) (Actinomycetales, Streptomycetaceae) produz as avermectinas, substâncias que apresentam atividade vermífida e inseticida^{26,28}. São muito aplicadas em animais e seu uso foi de grande importância para a medicina veterinária²⁶.

A lagarta *Spodoptera frugiperda* é uma praga polífaga, que ataca mono e dicotiledôneas²⁹, com grande destaque na cultura do milho³⁰. O controle químico dessa praga é tradicionalmente realizado via pulverizações de inseticidas orgânicos sintéticos. O uso de inseticidas orgânicos sintéticos ocorre até mesmo em culturas em que tecnologias mais modernas estão disponíveis, como a cultura do milho, que conta com plantas geneticamente modificadas com genes que codificam toxinas derivadas do entomopatógeno *Bacillus thuringiensis*^{31,32}. O uso extensivo e intensivo de inseticidas no controle desse inseto mantêm as populações sob constante pressão de seleção^{33,34}, o que tem levado ao surgimento de vários casos de resistência às tecnologias de controle disponíveis, incluindo as plantas Bt^{35–37}.

Referências

1. Frank, A.; Saldierna Guzmán, J.; Shay, J. Transmission of bacterial endophytes. **Microorganisms**, Basel, v. 5, n. 4, 2017. doi: 10.3390/microorganisms5040070.
2. Eljounaidi, K.; Lee, S. K.; Bae, H. Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases – Review and future prospects. **Biological Control**, Atlanta, v. 103, p. 62–68, 2016.
3. Gonzalez, F. et al. New opportunities for the integration of microorganisms into biological pest control systems in greenhouse crops. **Journal of Pest Science**, Heidelberg, v. 89, p. 295–311, 2016.
4. Azevedo, J. L.; Maccheroni Junior, W.; Pereira, J. O.; de Araújo, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 3, 2000. <http://www.ejb.org/content/vol3/issue1/full/4>.
5. Melo, I. S.; Azevedo, J. L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998.
6. Rodriguez, R. J.; White, J. F.; Arnold, A. E.; Redman, R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, London, v. 182, p. 314–330, 2009.
7. Araújo, W. L. et al. **Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: ESALQ, 2010.
8. Stępniewska, Z.; Kuźniar, A. Endophytic microorganisms - Promising applications in bioremediation of greenhouse gases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 97, p. 9589–9596, 2013.
9. Strobel, G. D. B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural product. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v. 67, p. 491–402, 2003.
10. de Oliveira, N. C. et al. Endophytic bacteria with potential for bioremediation of petroleum hydrocarbons and derivatives. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 11, p. 2977–2984, 2012.
11. Yadav, A. Exploring the potential of endophytes in agriculture: a minireview. **Advances in Plants & Agricultural Research**, Edmond, v. 6, n. 4, 2017. doi: 10.15406/apar.2017.06.00221.
12. Müller, C. A.; Obermeier, M. M.; Berg, G. Bioprospecting plant-associated microbiomes. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 235, p. 171–180, 2016.

13. Zhao, L. et al. Screening and characterization of endophytic *Bacillus* and *Paenibacillus* strains from medicinal plant *Lonicera japonica* for use as potential plant growth promoters. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 46, p. 977–989, 2015.
14. Dutta, D.; Puzari, K. C.; Gogoi, R.; Dutta, P. Endophytes: Exploitation as a tool in plant protection. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 57, p. 621–629, 2014.
15. Almeida, L. G. **Simbiontes de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae):** potencial biotecnológico para biorremediação e implicações na metabolização de inseticidas pelo hospedeiro. 2013. 105 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
16. Patel, M. V.; Patel, R. K. Indole-3-Acetic Acid (IAA) Production by Endophytic Bacteria Isolated From Saline Dessert, the Little Runn of Kutch. **CIBTech Journal of Microbiology**, Rajasthan, v. 3, p. 17–28, 2014.
17. Willems, A. et al. Transfer of several phytopathogenic *Pseudomonas* species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* subsp. nov., comb. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 42, p. 107–119, 1992.
18. Khan, A. L. et al. Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 52, p. 689–695, 2014.
19. O'Callaghan, M. Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 100, p. 5729–5746, 2016.
20. Azubuike, C. C.; Chikere, C. B.; Okpokwasili, G. C. Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 32, p. 1–18, 2016.
21. Govarthanan, M. et al. Bioremediation of heavy metals using an endophytic bacterium *Paenibacillus* sp. RM isolated from the roots of *Tridax procumbens*. **3 Biotech**, Heidelberg, v. 6, p. 1–7, 2016.
22. Zhu, L. J. et al. Characterization of arsenic-resistant endophytic bacteria from hyperaccumulators *Pteris vittata* and *Pteris multifida*. **Chemosphere**, Oxford, v. 113, p. 9–16, 2014.

23. Meinke, P. T.; Smith, M. M.; Shoop, W. L. Nodulisporic acid: its chemistry and biology. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 2, p. 655–674, 2002.
24. Burges, H. D. **Formulation of microbial biopesticides**. Berlin: Springer Science, 1998. doi:10.1007/978-94-011-4926-6.
25. Siegel, M. R. et al. Fungal endophyte-infected grasses: Alkaloid accumulation and aphid response. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 16, p. 3301–3315, 1990.
26. Kirst, H. A. The spinosyn family of insecticides: Realizing the potential of natural products research. **Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 63, p. 101–111, 2010.
27. Petroski, R. J.; Stanley, D. W. Natural compounds for pest and weed control. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 57, p. 8171–8179, 2009.
28. Burg, R. W. et al. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents : producing organism and fermentation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 15, p. 361–367, 1979.
29. Barros, E. M.; Torres, J. B.; Bueno, A. F. Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 39, p. 996–1001, 2010.
30. Gallo, D. et al. Pragas das plantas e seu controle. In: _____. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. p. 839–845.
31. Aldemita, R. R. et al. Trends in global approvals of biotech crops (1992-2014). **GM Crops & Food**, Austin, v. 6, p. 150–166, 2015.
32. International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops** : 2016. Ithaca, NY: ISAAA, 2016. (ISAAA Briefs, 52).
33. Li, G. et al. Frequency of Cry1F non-recessive resistance alleles in North Carolina field populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **PLoS One**, San Francisco, v. 11, p. 1–14, 2016.
34. Storer, N. P. et al. Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: Lessons from Puerto Rico. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 110, p. 294–300, 2012.
35. Farias, J. R. et al. Dominance of Cry1F resistance in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on TC1507 Bt maize in Brazil. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 72, p. 974–979, 2016.

36. Omoto, C. et al. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 72, p. 1727–1736, 2016.
37. Santos-Amaya, O. F. et al. Genetic basis of Cry1F resistance in two Brazilian populations of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Crop Protection**, Guildford, v. 81, p. 154–162, 2016.

3. UM OLHAR RÁPIDO NA DIVERSIDADE BIOLÓGICA E MATABÓLICA DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS DO MILHO

Resumo

Microrganismos endofíticos colonizam tecidos vegetais sem causar efeitos negativos ou doenças, podendo, ao contrário, produzir metabólitos secundários que beneficiam a planta hospedeira. A diversidade biológica e metabólica dos mesmos, são influenciadas por fatores bióticos e abióticos, sofrendo forte pressão de seleção dos tratos culturais adotados para plantas de interesse agrônômico. A bioprospecção dos microrganismos endofíticos é de grande interesse para a obtenção de produtos biotecnológicos com aplicação nas áreas farmacológicas, industriais e/ou agrícolas. Dessa forma, esse estudo teve por objetivo identificar a microbiota cultivável associada ao milho *Zea mays* (L.) (Poales, Poaceae), assim como determinar a diversidade de metabólitos produzidos por essa comunidade em comparação a de outros hospedeiros selecionados do acervo do Laboratório de Genética de Microrganismos "Prof. João Lúcio de Azevedo". Foram isolados 23 filotipos associados ao milho, sendo 21 de bactérias e 2 de fungos. Os filotipos de bactérias representaram quatro filos, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Bacteroidetes*; os de fungo, ambos da ordem *Pleosporales* (*Ascomycota*, *Dothideomycetes*). A análise metabolômica demonstrou a grande diversidade de metabólitos produzida, ressaltando a divergência metabólica do posicionamento sistemático das espécies analisadas. Em conclusão, o milho apresenta endófitos cultiváveis com diversidade biológica e metabólica com potencial para exploração biotecnológica.

Palavras-chave: Microrganismo endofítico. Diversidade metabólica. Diversidade Genética.

Abstract

Endophytic microorganisms colonize plant tissues without causing negative effects or diseases, producing secondary metabolites that benefit the host plant instead. The biological and metabolic diversity of the endophytes are influenced by biotic and abiotic factors, undergoing strong selection pressure by the cultural treatments adopted in agriculture. The bioprospecting of endophytes is of great interest for obtaining biotechnological products for application in pharmacological, industrial and/or agricultural areas. Thus, the objective of this study was to identify the culturable microbiota associated with maize *Zea mays* (L.) (Poales, Poaceae), as well as to determine the diversity of metabolites produced by this community in comparison to endophytes of other hosts selected from the collection of the Laboratory of Genetics of Microorganisms "Prof. João Lúcio de Azevedo". We isolated 23 filotypes associated with maize, 21 were bacteria and 2 were fungi. The bacterial phylotypes represented the phyla Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes and Bacteroidetes. Both fungi phylotypes belonged to the order Pleosporales (Ascomycota, Dothideomycetes). The metabolomic analysis demonstrated the great diversity of metabolites produced, highlighting the metabolic divergence of the systematic positioning of the analyzed species. In conclusion, maize presents endophytes with biological and metabolic diversity with potential for biotechnological exploration.

Keywords: Endophytic microorganism. Metabolic diversity. Genetical diversity.

3.1. Introdução

Microrganismos endofíticos habitam o interior de plantas sem causar patologias. Podem colonizar qualquer tecido vegetal e, de forma geral, vivem associados ao espaço intercelular ou no sistema vascular. Esses microrganismos podem ser passados entre as gerações pelas sementes dos hospedeiros e/ou invadir o hospedeiro pelas raízes ou folhas, como ocorre, respectivamente, com microrganismos da microbiota presente na rizosfera e no filoplano. Na relação planta hospedeira – microrganismo endofítico ocorrem trocas de diversas substâncias, onde a planta cede diversos nutrientes e abrigo, enquanto o endófito produz metabólitos secundários que podem aumentar o crescimento e a resistência da planta às condições adversas do ambiente, influenciando, inclusive, a resposta a patógenos e herbívoros¹⁻⁷.

A origem evolutiva e o processo de adaptação de microrganismos ao modo de vida endofítico ainda não são bem conhecidos^{8,9}. Contudo, os primeiros fósseis com indicações de plantas associadas a microbiota endofítica datam de mais de 400 milhões de anos, período em que as plantas colonizaram a Terra^{2,10}. Para a relação entre endófitos e gramíneas, existe a hipótese de evolução conjunta. A interação teria ocorrido durante o Eoceno, há cerca de aproximadamente 56 a 34 milhões de anos, com o surgimento das gramíneas, que teriam evoluído a partir de plantas semelhantes a bambus. Essas plantas já estavam colonizadas por microrganismos descendentes de fungos saprófitos presentes em materiais vegetais em decomposição⁹. Outra hipótese é a de que o surgimento da colonização de fungos endofíticos tenha ocorrido à partir da transferência e adaptação de patógenos de insetos, onde os microrganismos seriam inoculados nas plantas durante a alimentação. Existe também a possibilidade de que a colonização dos tecidos vegetais teria sido seguida por um período de adaptação⁸, ou que, para alguns organismos, as características que possibilitaram a relação mutualística surgir antes da evolução do endofitismo, uma pré-adaptação com o desenvolvimento de mutualismo defensivo¹¹.

A variação na densidade e diversidade dos endófitos depende de fatores abióticos aos quais a planta está exposta, como a estrutura físico-química do solo e as alterações das condições ambientais, e por fatores biológicos do hospedeiro, como a fase de desenvolvimento e o estado fisiológico^{1,6,2,12}. A capacidade de colonização e a produção de metabólitos pelos endófitos também são alteradas por esses fatores, tornando complicado estabelecer os processos bioquímicos e fisiológicos envolvidos na interação hospedeiro-endofítico, assim como definir os limites entre microrganismos endofíticos e patogênicos^{7,13,14}.

A grande diversidade e a pouca exploração dos microrganismos endofíticos possibilita a bioprospecção da interação planta-endofítico para a obtenção de novos produtos que tenham aplicação biotecnológica nas áreas farmacológicas, industriais e/ou agrícolas^{13,15,16}. Com a obtenção de produtos para atuação na biorremediação, produção de enzimas, fitormônios, antibióticos, compostos orgânicos voláteis (VOCs), promotores de crescimento de plantas, metabólitos de defesa contra patógenos, herbivoria e estresse a fatores abióticos^{6,1,15,16}.

A comunidade de bactérias endofíticas descritas para o milho é majoritariamente composta por membros do Filo *Proteobacteria*, preponderantemente pelos gêneros *Enterobacter* spp. (γ -*Proteobacteria*) e *Burkholderia* spp. (β -*Proteobacteria*)¹⁷. Já os fungos endofíticos mais comuns em milho pertencem aos gêneros *Fusarium* (*Sordariomycetes*, *Hypocreales*), *Aspergillus* (*Eurotiomycetes*, *Eurotiales*) e *Penicillium* (*Eurotiomycetes*, *Eurotiales*)⁷. Contudo, a variedade de espécies muda de acordo com os diferentes tratos culturais empregados, mesmo quando os outros fatores bióticos e abióticos são conservados¹⁷.

O ambiente de interação do milho com sua maior praga, a lagarta do cartucho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera, Noctuidae), e a necessidade de aplicação de medidas de controle, podem, em conjunto, exercer pressão de seleção na comunidade de microrganismos endofíticos associada ao milho. Essa pressão pode levar ao surgimento de microrganismos que apresentam diversidade biológica e metabólica e com características desejáveis para a sua exploração biotecnológica¹⁸. Essa possibilidade torna a interação planta-endofíticos um ambiente de alto interesse para a bioprospecção. O objetivo deste estudo foi: i) isolar, identificar e caracterizar metabolicamente microrganismos endofíticos do milho *Zea mays* L. (Poales, Poaceae); ii) identificar e caracterizar microrganismos

endofíticos selecionados do acervo do Laboratório de Genética de Microrganismos "Prof. João Lúcio de Azevedo"; iii) Comparar a diversidade genética e metabólica dos grupos de microrganismos endofíticos.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Isolados

3.2.1.1. Isolamento de microrganismos endofíticos

Para o isolamento foram selecionadas plantas de milho 30F35HR – Pioneer híbrido da Dupont, cultivadas na área experimental do Departamento de Genética da ESALQ – USP, durante o mês de julho de 2016. Foram recolhidas, aleatoriamente, quatro folhas de diferentes plantas. As folhas foram lavadas e cortadas em retângulos grandes, desinfetadas com solução aquosa de hipoclorito de sódio a 4%¹² e separadas em dois grupos para aplicação de métodos distintos de isolamento. Um grupo foi submetido ao processo de trituração das folhas, no qual 1,2 g de folha foi macerado em 3 mL de solução tampão PBS (para 1000 mL, 8g NaCl, 0,2g KCl, 1,44g Na₂HPO₄, 0,24g KH₂PO₄, pH 7,4). O macerado obtido foi sujeito a diluição seriada de 10⁻¹ à 10⁻⁶ utilizando a solução tampão inicialmente utilizada. O outro grupo seguiu o isolamento por fragmentação, onde as folhas foram cortadas em quadrados de 1cm² ¹². O material triturado e os fragmentos obtidos foram inoculados em placas de Petri contendo meio ISP2 (4 g de levedura, 4 g de dextrose e 10 g de malte, 1 litro de água deionizada, pH 7.3)¹⁹ adicionado do fungicida comercial Betonyl (0,05g por litro) e incubados em BOD a 28°C durante 7 dias. Foram utilizadas cinco placas com cinco fragmentos de folha em cada no método de fragmentação e 21 placas no método por trituração, sendo 3 placas para cada diluição (10⁻¹ a 10⁻⁶). As colônias obtidas foram caracterizadas morfológicamente e três isolados de cada tipo morfológico foram re-isolados por purificação por estria de esgotamento¹² até a obtenção de culturas puras.

3.2.1.2. Cultivo de microrgaismos endofíticos

Um grupo de microrganismos, 6 bactérias e 1 fungo, foram selecionados do acervo do Laboratório de Genética de Microrganismos "Prof. João Lúcio de Azevedo" do Departamento de Genética da ESALQ - USP, Piracicaba-SP. O fungo (LGM-SO-FTR-01) foi isolado da cana-de-açúcar *Saccharum officinarum* L.

(Poales, Poacea), as bactérias LGM-CR-JM-01, LGM-CR-JM-02 de *Citrus reticulata* Blanco e LGM-CS-JM-01, LGM-CS-JM-02, LGM-CS-JM-03, LGM-CS-JM-04 de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (Sapindales, Rutacea).

O material retirado do acervo foi transferido do armazenamento em óleo mineral para placas de Petri contendo meio BDA (infusão de 200g de batata, 20g de dextrose e 20g de ágar para 1L de meio, pH 6,0)¹² para fungos, e meio ISP2 para bactérias. O material plaqueado foi incubado a 28°C até a obtenção do crescimento dos isolados. As placas foram vedadas com filme plástico e mantidas refrigeradas a 4°C por até um mês. Para períodos mais longos de armazenamento foi feito o congelamento, assim como indicado por Araújo (2010).

3.2.2. Identificação molecular

Todos os microrganismos isolados e selecionados do acervo foram cultivados em 4 mL de meio líquido, sendo utilizado o meio ISP2¹⁹ para bactérias e BD¹² para os fungos. O material foi cultivado por 72 h em condições controladas de temperatura (28°C) e agitação constante (120 rpm). Ao término do período de cultivo, alíquotas de 1 mL de cada amostra foram centrifugadas (2000 g x 5 min) e as células recuperadas e utilizadas para a extração de DNA genômico (gDNA). O gDNA das células das bactérias foi extraído segundo Sunnucks e Hales²⁰, enquanto o de fungos pelo método de Gilbert²¹.

O gene do 16S do RNA ribossômico (rRNA) foi selecionado como marcador molecular para a identificação das bactérias, utilizando-se dos iniciadores universais 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') de Lane²² e 1545r (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3') de Pantos²³ para as bactérias IIL-ZM-IDP-06, IIL-ZM-IDP-08, IIL-ZM-IDP-16 e IIL-ZM-IDP-23. Os iniciadores universais 8f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1491r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') descritos, respectivamente, por Turner²⁴ e Weisburg²⁵, foram utilizados para a amplificação de fragmento do 16S rDNA no restante das bactérias. A identificação molecular dos fungos foi feita baseando-se no espaçador interno transcrito (ITS - Internal Transcribed Spacer) do RNA ribossômico, utilizando-se dos iniciadores de WHITE²⁶, ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3').

Os marcadores moleculares selecionados para a identificação de bactérias e fungos foram amplificados por meio de reação de polimerase em cadeia (PCR), utilizando 10-20 ng de gDNA, tampão da enzima (1x), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,32 µM de cada iniciador e 0,625U de Taq polimerase, em reação com volume final de 25 µL. A reação foi colocada em termociclador programado para executar a seguinte termociclagem: 95°C por 4 min (1 ciclo); 95°C por 1 min, 55°C por 1 min e 72°C por 2 min (35 ciclos); 72°C por 10 min (1 ciclo). Para confirmação da amplificação, o produto da reação foi revelado em gel de agarose a 1% contendo 0,4 µg/mL de brometo de etídio, via eletroforese em voltagem constante de 100 V em tampão TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH = 7,2) ²⁷. Parte do material obtido (10 µL do produto de PCR) foi submetido ao tratamento com as enzimas exonuclease (1U) e fosfatase alcalina (1U) para a eliminação de resíduos de iniciadores, dNTPs e produtos de fita simples. A reação foi incubada a 37°C por 30 min e depois a 80°C por 15 min. Os produtos purificados foram enviados para sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH), da Universidade de São Paulo. As sequências obtidas foram visualizadas no programa FinchTV v1.4.0 (Geospiza Inc.) e comparadas àquelas disponíveis junto ao banco de dados do EzTaxon-e (<https://www.ezbiocloud.net/>) e do NCBI “National Center for Biotechnology Information” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), com o uso da ferramenta BlastN.

3.2.2.1. Construção de árvore filogenética

As sequências obtidas para os diferentes marcadores moleculares, juntamente com o de sequências próximas selecionadas nos bancos de dados do NCBI e EzTaxon-e, foram alinhadas com a ferramenta ClustalW, disponível no programa MEGA7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versão 7.0²⁸, com a aplicação dos parâmetros padrões (Gap Opening Penalty: 15; Gap Extension Penalty: 6.66; DNA Weight Matrix: IUB; Transition Weight: 0,5)²⁹. Foi feita análise de preferência para obtenção do melhor modelo evolutivo para a reconstrução da árvore filogenética, seguindo os critérios de informação Akaike (AIC) e Bayesiano (BIC), assim como integrados no MEGA7. Assim, para as sequências de bactérias, a reconstrução da árvore filogenética pelo método de máxima verossimilhança (ML) foi obtida utilizando o modelo de *Kimura-2 parâmetros* (K2)³⁰, com correção *gamma* (+G=0,73) para os sítios heterólogos e correção do número de sítios invariáveis

(+I=0,35). Para as sequências de fungos, foi aplicado o modelo de *Kimura-2-parâmetros* (K2)³⁰ com correção *gamma* (+G=3,11) para a reconstrução da árvore filogenética pelo método de máxima verossimilhança (ML). A reconstrução das árvores para os isolados de bactérias e fungos obtidos foi realizada utilizando-se 500 iterações de *bootstrap*. Todos os morfotipos que compartilharam mais do que 99,998% de identidade nas análises par a par foram representados por um único filotipo na árvore, com a escolha aleatória do morfotipo representante.

3.2.3. Identificação metabólica

3.2.3.1. Fermentação e extração

Os extratos foram produzidos a partir do cultivo de estoque dos endófitos descrito no tópico 3.2.1.2. Para as bactérias, uma colônia isolada foi selecionada; para os fungos, um cubo de 1 cm² de meio colonizado foi utilizado. O material foi transferido para frascos com 50 mL de meio líquido ISP2 sob agitação constante (120 rpm) a 28°C por 7 dias. Após esse período, os meios de cultivo foram filtrados para a remoção da porção celular e coleta do filtrado. O filtrado foi utilizado para a extração orgânica por partição líquido-líquido utilizando acetato de etila como solvente. Após a adição do solvente orgânico, a amostra foi agitada vigorosamente e então mantida em repouso para a separação das fases. O processo foi repetido duas vezes para aumentar a eficiência de extração. A fase aquosa foi descartada e a orgânica foi submetida à rota-evaporação para a concentração das amostras. O sedimento obtido foi recuperado em metanol, transferido para frascos de coloração âmbar e mantido a -20°C até sua utilização.

3.2.3.2. Análise dos metabólitos

O material obtido após extração orgânica (tópico 2.2.3.1.) foi submetido a análises em espectrômetro de massas Xevo^{TM} TQ-S (Waters Corporation) acoplado a um sistema de cromatografia líquida Acquity^{TM} Ultra High Performance Liquid Chromatography (UPLCTM - Waters) equipado com uma coluna Hypersil GOLD (Thermo Scientific) (50 x 2.3 mm, 1.9 µm), detector de arranjo de diodos (DAD) e coletor automático (auto-sampler). O material foi analisado no espectrômetro de massas por ionização nos modos positivo (ESI+) e negativo (ESI-) por *eletrospray* com voltagem capilar de 3,3kV e voltagem do spray de 70V. A temperatura de

dessolvatação foi de 350°C, utilizando argônio como gás de colisão. Os extratos brutos foram injetados na concentração de 200 µg.mL⁻¹ no volume de 10 µL por injeção. Foi aplicado o fluxo de 200 µL.min⁻¹. Como fase móvel foi utilizada solução aquosa de 0,1% de ácido fórmico como a fase A e solução metanólica de 0,1% de ácido fórmico como a fase B, com gradiente de eluição inicial a 50% da fase B, aumentando para 95% dentro de 5 min e se mantendo nessa concentração durante 2 min.

Os dados foram coletados através do MarkerLynx 4.1. (Waters®) e os valores da relação massa/carga e do tempo de retenção obtidos foram processados para a exclusão de metabólitos que não apareceram em duas das três repetições biológicas. Os valores resultantes foram convertidos na razão massa/carga (m/z) / tempo de retenção (rt) e submetidos a análises adicionais utilizando-se das ferramentas disponíveis no programa MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca/>)³¹⁻⁴¹. Os dados obtidos das análises em ESI+ e ESI- foram analisados separadamente, passando pelo processo de normalização de forma independente. O mesmo ocorreu quanto à origem das amostras, sendo os resultados dos endófitos do milho analisados separadamente daqueles obtidos dos citros. Os dados de ESI+ dos isolados de milho e citros e de ESI- de milho foram normalizados pela transformação dos dados pela raiz cúbica e escalonamento da amplitude, enquanto os dados de ESI- das bactérias de citros também sofreu transformação por raiz cúbica, porém, com auto-escalonamento. Após a normalização dos dados foi realizada a análise de Componentes Principais (PCA), da qual foram gerados os *heatmaps* e dendrogramas baseando-se nas similaridades dos perfis químicos e a variedade química produzida por esses endófitos.

3.3. Resultados

3.3.1. Caracterização molecular

A identificação putativa dos microrganismos com base na análise de fragmento do gene 16S do rRNA foi considerada válida quando a similaridade encontrada entre a sequência gerada e a presente nos bancos de dados (EzTaxon-e e Blast) foi maior que 97%.

Para os isolados do acervo do Laboratório de Genética de Microrganismos "Prof. João Lúcio de Azevedo" do Departamento de Genética da ESALQ - USP, Piracicaba-SP, foram identificados três (3) filotipos, cada um representado por dois isolados, todos compartilhando mais de 99% de similaridade com sequências-tipo depositadas no EZ-taxon, utilizando fragmento de aproximadamente 1400 pb do 16S rRNA para comparação (Tabela 3.1.).

Tabela 3.1. - Identificação putativa de bactérias endofíticas selecionados do acervo do Lab. Genética de Microrganismos "Prof. João Lúcio de Azevedo", a partir de análise de sequências do 16S rDNA (≈1400 pb), após buscas heurísticas nos bancos de dados do NCBI e do EzTaxon-e

Isolado	Correspondente mais próximo	Nº de acesso	Identidade
LGM-CR-01	<i>Streptomyces griseolus</i>	JOFC01000069	99,62%
LGM-CR-02	<i>Streptomyces badius</i>	AY999783	99,92%
LGM-CS-01	<i>Streptomyces hydrogenans</i>	AB184868	100%
LGM-CS-02	<i>Streptomyces griseolus</i>	JOFC01000069	99,42%
LGM-CS-03	<i>Streptomyces hydrogenans</i>	AB184868	99,93%
LGM-CS-04	<i>Streptomyces badius</i>	AY999783	99,93%

Um total de 23 isolados de endófitos de milho foram putativamente identificados a partir da comparação de aproximadamente 1400 pb. Foram identificados dois fungos: *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn e *Bipolaris papendorffii* (Aa) Alcorn (*Pleosporales*, *Pleosporaceae*) (Tabela 3.3.) e 21 bactérias (Tabela 3.2.). Dentre as bactérias foram identificadas 14 espécies em 11 gêneros. A espécie mais comum foi *Microbacterium testaceum* (Komagata & Lizuka, 1964) Takeuchi e Hatano, 1998 (*Actinomycetales*, *Microbacteriaceae*) (*Actinobacteria*), com cinco isolados. *Herbaspirillum aquaticum* (Dobritsa et al., 2010) (*Burkholderiales*, *Oxalobacteraceae*) (*Proteobacteria*), *Paenibacillus hunanensis* (Liu et al., 2010) (*Bacillales*, *Paenibacillaceae*) (*Firmicutes*) e *Chryseobacterium culicis* (Kämpfer et al., 2010) (*Flavobacteriales*, *Flavobacteriaceae*) (*Bacteroidetes*) contaram com dois isolados cada. Os demais isolados (10) resultaram na identificação putativa de espécies representadas por isolados únicos (Tabela 3.2.).

Tabela 3.2. - Identificação putativa de bactérias endofíticas isoladas do milho (*Zea mays*) variedade 30F35HR – Pioneer híbrido da Dupont, a partir de análise de sequências do 16S rDNA (≈1400 pb) após buscas heurísticas nos bancos de dados do NCBI e do EzTaxon-e

Isolado	Correspondente mais próximo	Nº de acesso	Identidade
IIL-ZM-IDP-01	<i>Acidovorax wautersii</i>	jgi.1068022	97,97%
IIL-ZM-IDP-02	<i>Pseudomonas hunanensis</i>	JX545210	99,35%
IIL-ZM-IDP-03	<i>Rhizobium larrymoorei</i>	JADW01000071	99,85%
IIL-ZM-IDP-04	<i>Paenibacillus hunanensis</i>	EU741036	99,64%
IIL-ZM-IDP-05	<i>Chryseobacterium culicis</i>	jgi.1085887	99,93%
IIL-ZM-IDP-06	<i>Microbacterium testaceum</i>	X77445	99,87%
IIL-ZM-IDP-07	<i>Chryseobacterium culicis</i>	jgi.1085887	100%
IIL-ZM-IDP-08	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	APON01000005	99,15%
IIL-ZM-IDP-09	<i>Paenibacillus hunanensis</i>	EU741036	98,93%
IIL-ZM-IDP-10	<i>Herbaspirillum aquaticum</i>	NJGV01000018	99,93%
IIL-ZM-IDP-11	<i>Microbacterium testaceum</i>	X77445	99,70%
IIL-ZM-IDP-12	<i>Sphingomonas sanguinis</i>	BCTY01000091	99,40%
IIL-ZM-IDP-13	<i>Herbaspirillum aquaticum</i>	NJGV01000018	99,86%
IIL-ZM-IDP-14	<i>Pseudomonas oryzae</i>	BBIT01000012	99,14%
IIL-ZM-IDP-15	<i>Pedobacter suwonensis</i>	DQ097274	99,85%
IIL-ZM-IDP-16	<i>Microbacterium testaceum</i>	X77445	99,81%
IIL-ZM-IDP-17	<i>Bacillus aryabhattai</i>	EF114313	100%
IIL-ZM-IDP-18	<i>Bacillus subtilis subsp. inaquosorum</i>	AMXN01000021	99,71%
IIL-ZM-IDP-19	<i>Microbacterium testaceum</i>	X77445	99,85%
IIL-ZM-IDP-20	<i>Microbacterium testaceum</i>	X77445	99,71%
IIL-ZM-IDP-23	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	FMWB01000061	98,35%

Para o fungo LGM-SO-FTR-01, as sequências disponíveis indicaram como correspondente mais próximo *Sarocladium implicatum* (J.C. Gilman & E.V. Abbott) Giraldo, Gené & Guarro (*Hypocreales, incertae sedis*), com 99% de similaridade do gene ITS (≈500pb). *Implicatum* é formado por um complexo de espécies muito próximas e de complexa diferenciação⁴². O gênero *Sarocladium* sp. anteriormente fazia parte de *Acremonium* sp. e foi formado a partir de espécies reclassificadas⁴³. Os fungos IIL-ZM-IDP-21 e IIL-ZM-IDP-22 isolados do milho apresentaram alta similaridade com dois gêneros diferentes *Curvularia* (99%) e *Bipolaris* (100%), sendo ambos relatados como patógenos oportunistas de milho^{44,45}.

Tabela 3.3. - Identificação putativa de fungos endofíticos a partir de análise de sequências do ITS (≈500 pb) após buscas heurísticas no banco de dados do NCBI

Isolado	Correspondente mais próximo	Nº de acesso	Identidade
LGM-SO-FTR-01	<i>Sarocladium implicatum</i>	KT878353	99%
IIL-ZM-IDP-21	<i>Curvularia lunata</i>	KU221492	99%
IIL-ZM-IDP-22	<i>Bipolaris papendorffii</i>	KC592365	100%

3.3.1.1. Árvores filogenéticas

Foram construídas duas árvores filogenéticas dos isolados analisados, uma para os fungos (Figura 3.1) e outra para as bactérias (Figura 3.2). Os isolados de milho IIL-ZM-IDP-21 e IIL-ZM-IDP-22, putativamente identificados, respectivamente, como *Curvularia lunata* e *Bipolaris papendorffii*, resolveram em um mesmo ramo junto às sequências de seus correspondentes mais próximos, em um subclado contendo apenas espécies de *Curvularia* e bem separado do subclado contendo as demais espécies de *Bipolaris* (Figura 3.1). Mesmo o gênero *Cochliobolus*, descrito como sendo a forma assexual dos fungos *Bipolaris* sp⁴⁵, resolveu em ramo intermediário, se colocando entre os subclados contendo predominantemente espécies de *Bipolaris* ou *Curvularia* (Figura 3.1).

Figura 3.1. - Árvore filogenética de fungos endofíticos construída a partir das sequências da região ITS, método máxima verossimilhança (ML) e modelo *Kimura-2*-parâmetros (K2), distribuição *gamma* (+G). Os valores de bootstrap estão indicados nos ramos correspondentes. Indicação de 0,10 de substituição por posição de nucleotídeo na barra de escala

A árvore filogenética obtida para as bactérias incluiu todos os isolados analisados em quatro clados bem definidos, com cada um deles representando os Filos *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* e *Bacteriodetes* (Figura 3.2). Os isolados de actinobactérias foram agrupados em dois subclados representados pelas famílias *Streptomycetaceae*, contendo seis isolados representando três filotipos que resolveram em ramos bem definidos junto ao seu hit mais próximo, e *Microbacteriaceae*, contendo cinco isolados e um único filotipo. *Firmicutes* reuniu quatro filotipos, sendo dois deles pertencentes à família *Paenibacillaceae* e dois à família *Bacillaceae*. O filo com maior número de filotipos foi *Proteobacteria*, contando com filotipos bem definidos distribuídos nas classes α -*Proteobacteria* (2 filotipos), β -*Proteobacteria* (2 filotipos) e γ -*Proteobacteria* (4 filotipos). *Bacteriodetes* foi representado por dois filotipos, resolvendo em ramos muito bem definidos com as espécies-tipo mais próximas, *Pedobacter suwonensis* e *Chrysiobacterium culicis* (Figura 3.2).

Figura 3.2. - Árvore filogenética de bactérias endofíticas construída a partir das sequências da região 16S, pelo método de máxima verossimilhança (ML) e os parâmetros de *Kimura-2*-parâmetros (K2), distribuição *gamma* (+G) e evolutivamente invariável (+I). Os valores de *bootstrap* estão indicados nos ramos correspondentes. Indicação de 0,050 de substituição por posição de nucleotídeo na barra de escala. Código de acesso do GenBank do NCBI (National Centre for Biotechnology Information)

3.3.2. Análise comparativa da diversidade e da intensidade de metabólitos

Foram encontrados 13.124 íons (Tabela 3.4) na análise de metabólitos de bactérias endofíticas de milho. No modo positivo o isolado IIL-ZM-IDP-12 - *Sphingomonas sanguinis* apresentou a maior diversidade de íons (5.091) enquanto no modo negativo (9.283) foi observada para o isolado IIL-ZM-IDP-18 - *Bacillus subtilis subsp. inaquosorum*.

Tabela 3.4 - Quantidade de íons registrados para microrganismos isolados do milho (ZM) e citrus (CR ou CS), após análise de LC-MS/MS nos modos positivo e negativo

Isolados		Número de íons	
		Modo Positivo	Modo Negativo
IIL-ZM-IDP-01	<i>Acidovorax wautersii</i>	4.258	8.865
IIL-ZM-IDP-02	<i>Pseudomonas hunanensis</i>	4.534	8.590
IIL-ZM-IDP-03	<i>Rhizobium larrymoorei</i>	4.777	8.347
IIL-ZM-IDP-04	<i>Paenibacillus hunanensis</i>	4.374	8.750
IIL-ZM-IDP-05	<i>Chryseobacterium culicis</i>	4.317	8.807
IIL-ZM-IDP-06	<i>Microbacterium testaceum</i>	4.529	8.594
IIL-ZM-IDP-07	<i>Chryseobacterium culicis</i>	4.132	8.991
IIL-ZM-IDP-08	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	4.864	8.260
IIL-ZM-IDP-09	<i>Paenibacillus hunanensis</i>	4.063	9.060
IIL-ZM-IDP-10	<i>Herbaspirillum aquaticum</i>	4.471	8.653
IIL-ZM-IDP-11	<i>Microbacterium testaceum</i>	4.487	8.636
IIL-ZM-IDP-12	<i>Sphingomonas sanguinis</i>	5.091	8.033
IIL-ZM-IDP-13	<i>Herbaspirillum aquaticum</i>	4.661	8.462
IIL-ZM-IDP-14	<i>Pseudomonas oryzae</i>	4.747	8.376
IIL-ZM-IDP-15	<i>Pedobacter suwonensis</i>	4.550	8.574
IIL-ZM-IDP-16	<i>Microbacterium testaceum</i>	4.702	8.421
IIL-ZM-IDP-17	<i>Bacillus aryabhatai</i>	4.725	8.398
IIL-ZM-IDP-18	<i>Bacillus subtilis subsp. inaquosorum</i>	3.840	9.283
IIL-ZM-IDP-19	<i>Microbacterium testaceum</i>	4.715	8.408
IIL-ZM-IDP-20	<i>Microbacterium testaceum</i>	4.612	8.512
IIL-ZM-IDP-23	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	4.634	8.489
LGM-CR-01	<i>Streptomyces griseolus</i>	3.757	1.816
LGM-CR-02	<i>Streptomyces badius</i>	2.804	1.648
LGM-CS-01	<i>Streptomyces hydrogenans</i>	3.654	1.972
LGM-CS-02	<i>Streptomyces griseolus</i>	3.561	3.170
LGM-CS-03	<i>Streptomyces hydrogenans</i>	3.145	1.971
LGM-CS-04	<i>Streptomyces badius</i>	2.231	1.455

Para as bactérias endofíticas de *Citrus* a quantidade de íons obtidos foi menor em todos os isolados. Os maiores valores foram para os dois isolados de *Streptomyces griseolus*, com 3.757 íons (LGM-CR-01) no modo positivo e 3.170 (LGM-CS-02) no modo negativo (Tabela 3.4).

Nos dendrogramas gerados a partir do PCA das bactérias endofíticas, tanto no modo positivo como negativo, foi observada maior variação entre os diferentes isolados do que entre as repetições, sendo então representada apenas uma repetição de cada isolado nas figuras.

Figura 3.3. - Dendrograma gerado a partir de PCA dos metabólitos de bactérias endofíticas de milho após análise de LC-MS/MS em a) modo positivo (+) e b) modo negativo (-)

No geral, foi verificada grande diversidade nos agrupamentos quando comparados os perfis metabólicos dos isolados quando utilizando os perfis obtidos em modo positivo e negativo (Figura 3.3). Adicionalmente, para a maioria dos casos, os agrupamentos formados pela proximidade filogenética dos isolados não foi repetida quando os agrupamentos foram conduzidos pela similaridade dos perfis metabólitos nos modos positivo e negativo (Figuras 3.3 e 3.4).

Os isolados IIL-ZM-IDP-05 e IIL-ZM-IDP-07 - *Chryseobacterium culicis* foram os únicos a se manterem próximos em ambos os perfis metabólitos analisados, enquanto os isolados IIL-ZM-IDP-04 e IIL-ZM-IDP-09, de *Paenibacillus hunanensis*, e IIL-ZM-IDP-10 e IIL-ZM-IDP-13, de *Herbaspirillum aquaticum*, resolveram em clados distantes de seu relativo quando comparados os seus perfis metabólitos em modo positivo (Figura 3.3a). Os isolados IIL-ZM-IDP-06, IIL-ZM-IDP-11, IIL-ZM-IDP-16, IIL-ZM-IDP-19 e IIL-ZM-IDP-20 da *Microbacteriaceae* *Microbacterium testaceum* e IIL-ZM-IDP-17 e IIL-ZM-IDP-18 de *Bacillaceae* acabaram apresentando perfis distintos em modo negativo, resolvendo em grupos separados (Figura 3.3b). Os três isolados de *Pseudomonadaceae* apresentaram diferenças no conjunto de metabólitos em ambos os modos positivo e negativo, apresentando até 15% de dissimilaridade (Figura 3.3).

Em modo positivo (Figura 3.3. a), os cinco isolados de *Microbacterium testaceum* (IIL-ZM-IDP-06, IIL-ZM-IDP-11, IIL-ZM-IDP-16, IIL-ZM-IDP-19 e IIL-ZM-IDP-20) formaram um subclado próprio, indicando a maior similaridade metabólica entre esses isolados em relação aos demais. Nesse grupo, o isolado IIL-ZM-IDP-06 resolveu isoladamente em um ramo mais externo, enquanto os demais isolados formaram dois subgrupos mais internos, com IIL-ZM-IDP-19 e 16 formando um desses subgrupos, e IIL-ZM-IDP-11 e 20, o outro. Apesar da maior proximidade genética de *Microbacteriaceae* a *Paenibacillaceae* e *Bacillaceae* (Figura 3.2), apenas os isolados de *Bacillaceae* (IIL-ZM-IDP-17 e IIL-ZM-IDP-18) apresentaram certa similaridade metabólica àqueles de *Microbacteriaceae*, resolvendo conjuntamente em um grande clado com isolados pertencentes as duas famílias citadas e aos gêneros *Sphingomonas*, *Pseudomonas* e *Pedobacter* (Figura 3.3 a). *Paenibacillaceae* (IIL-ZM-IDP-04 e IIL-ZM-IDP-09), por outro lado, agruparam-se com inúmeros outros isolados dos filos *Proteobacteria* e *Bacterioidetes* em um clado distinto.

Em modo negativo, os isolados de *M. testaceum* (Figura 3.3. b) se reuniram em clados e ramos bem distintos, mostrando a maior diversidade de metabólitos detectados. Assim, os isolados IIL-ZM-IDP-19 e IIL-ZM-IDP-16 resolveram em um subclado distinto dos demais (IIL-ZM-IDP-11, IIL-ZM-IDP-20 e IIL-ZM-IDP-06), os quais ficaram próximas a *Bacillus subtilis subsp. inaquosorum* (IIL-ZM-IDP-18), *Sphingomonas sanguinis* (IIL-ZM-IDP-12) e *Pedobacter suwonensis* (IIL-ZM-IDP-15). *Sphingomonas sanguinis* e *Pedobacter suwonensis* se colocaram ainda mais distantes filogeneticamente de *M. testaceum* (Figura 3.2).

No modo positivo temos a distribuição de ao menos um exemplar de cada filo para cada um dos dois grandes clados formados no dendrograma (Figura 3.3 a). No modo negativo (Figura 3.3. b) temos três clados, o primeiro contém isolados de todos os filos, o segundo é composto exclusivamente por *Proteobacteria* e o último ramo por um isolado de *Proteobacteria* e o restante de *Firmicutes*.

Figura 3.4. - Heatmap gerado a partir de PCA dos metabólitos de bactérias endofíticas de milho após análise metabólica por LC-MS/MS em a) modo positivo (+) e b) modo negativo (-)

Os *heatmaps* construídos a partir das análises de PCA dos metabólitos das bactérias endofíticas de milho permitem identificar grupos de metabólitos característicos de cada isolado, assim como os isolados que apresentam conjunto de metabólitos mais semelhantes uns aos outros (Figura 3.4).

Os valores de importância da variável na projeção (VIP - *Variable Importance in Projection*) nos modelos de análise parcial dos quadrados mínimos (PLS – Partial Least Square) dos quinze (15) metabólitos de maior significância indicam a forte contribuição dos mesmos na explicação dos modelos de agrupamento obtidos, todos com VIP superiores a 3,0 (Figura 3.5).

Figura 3.5. - Metabólitos mais informativos da análise parcial dos quadrados mínimos, produzidos por bactérias endofíticas cultiváveis do milho, obtidas nas análises de LC-MS realizada nos modos a) positivo (+) e b) negativo (-)

As bactérias endofíticas de *Citrus* foram analisadas separadamente daquelas obtidas para o milho. Nesse grupo, o distanciamento do perfil metabólico obtido para os diversos isolados correspondeu ao posicionamento dos mesmos obtido na

análise filogenética, sendo formados grupos para os diferentes isolados de *S. griseolus* (LGM-CR-01 e LGM-CS-02), *S. badius* (LGM-CR-02 e LGM-CS-04) e *S. hydrogenans* (LGM-CS-01 e LGM-CS-03) (Figuras 3.2 e 3.6).

Figura 3.6. - Dendrograma gerado a partir de PCA dos metabólitos de bactérias endofíticas de *Citrus*, em a) modo positivo (+) e b) modo negativo (-)

3.4. Discussão

Os mecanismos que levam a variação na diversidade de endófitos em uma mesma planta ainda não são bem conhecidos¹³, bem como a capacidade de colonização de espécies de plantas diferentes e a concentração desses microrganismos nos tecidos do hospedeiro⁷. Sabe-se que as alterações no ambiente em que a planta hospedeira se encontra levam a seleção de grupos distintos de endófitos¹. Por isso já eram esperadas as diferenças observadas entre os endófitos isolados de milho e aqueles provenientes de *Citrus* e de cana-de-açúcar.

O isolado LGM-SO-FTR-01 identificado como o fungo *Sarocladium implicatum* (99%) foi inicialmente classificado como *Acremonium* sp., mas análises moleculares recentes transferiram várias espécies para o gênero *Sarocladium*⁴². Contudo as divisões entre os dois gêneros não foi solucionada, havendo incertezas quanto ao posicionamento sistemático de algumas espécies^{42,43}. Os dois gêneros possuem espécies endofíticas, de importância médica e fitopatogênicas. Existem registros da produção de compostos de interesse por esses gêneros^{42,46}, como cerulenina⁴⁸ e

alcaloides (peramina e ergovalina)^{6,47}. Indicando assim um organismo de grande interesse para a bioprospecção.

Bipolaris papendorfii e *Curvularia lunata*, apresentam alta proximidade filogenética e a sua separação é problemática devido às diversas características morfológicas em comum entre inúmeras espécies^{44,48}. Os dois gêneros faziam parte de um único gênero, *Helminthosporium*, que foi revisado após análises taxonômicas, sendo os constituintes desse grupo reorganizados nos gêneros *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera* e *Exserohilum*. Porém as formas assexuadas das espécies desses gêneros são reunidas em um único gênero *Cochliobolus*⁴⁵. Existem indicações genéticas de que *C. lunata* teria evoluído a partir de *Bipolaris maydis*^{44,48}. Ambos os fungos isolados são descritos como patógenos de milho e outras *Poaceae*^{44,45,48}, raramente causando infecções oportunistas em humanos^{49,50}. Contudo, como o isolamento desses fungos foi feito de plantas assintomáticas, acreditamos que os mesmos estariam associados como comensais ou patógenos latentes. Sabe-se que microrganismos endofíticos podem ser patógenos quando ocorrem mudanças fisiológicas na planta hospedeira⁷. Mesmo com essa possível atividade negativa, a sua bioprospecção continua apresentando grande interesse tecnológico^{49,51,52}.

Assim como em outros isolamentos de microrganismos endofíticos de milho, foi identificada abundância de representantes do filo *Proteobacteria*^{17,53}, com o maior número de filotipos pertencendo a esse filo. *Bacillus* (*Firmicutes*) é o gênero mais frequentemente isolado do caule do milho, enquanto *Enterobacter* e *Burkholderia* (*Proteobacteria*) das raízes⁵³. O gênero *Pseudomonas*, que apresentou três espécies nesse isolamento, também aparece com alta frequência e diversidade de espécies tanto na raiz como no caule^{17,53,54}. Essas variações nas concentrações dos filos podem ocorrer pelas diferenças metodológicas, onde o isolamento e o meio de cultivo aplicados diferem, ou ainda pelo estado fisiológico e localização das plantas utilizadas. Portanto a frequência de isolamento de cada grupo de microrganismos variará com a mudança desses fatores.

Na análise dos metabólitos produzidos pelas bactérias isoladas de *Citrus*, mesmo com o agrupamento seguindo os padrões da identificação genética, ocorreu uma separação entre os isolados de mesma espécie. Essa separação indica a produção de metabólitos incomuns entre os dois isolados. Esse padrão ocorreu para as três espécies: *S. griseolus*, *S. badius* e *S. hydrogenans*. Para as duas primeiras, mesmo que os isolados de cada filotipo tenham originado de plantas diferentes (*C.*

reticulata e *C. sinensis*) o agrupamento pelo perfil metabólico refletiu o posicionamento sistemático da bactéria e não o hospedeiro de origem. Interessantemente esse mesmo cenário não se repetiu para os cinco isolados de *Microbacterium testaceum*, que mesmo compartilhando mais de 99,99% de similaridade genética apresentaram alta diversidade metabólica.

Um microrganismo endofítico de mesmo biotipo, de mesma identificação genética e isolado da mesma planta pode apresentar a produção de substâncias completamente distintas entre si, no cultivo em meio¹³. Ou seja, a variação metabólica de um isolado não está intimamente ligada à sua espécie ou ao hospedeiro de origem. Levando isso em consideração, a diversidade metabólica presente nos isolados de milho é muito maior do que a diversidade biológica identificada. Essas variações entre os metabólitos dos endofíticos de milho, com a mesma identificação genética e que foram cultivados nas mesmas condições, pode ser causada por diferenças presentes em outras regiões do material genético que não as analisadas (16S). As alterações no genoma entre cepas de uma mesma espécie de bactéria podem ocorrer por diversos mecanismos^{55,56}. Além da transferência direta entre duas células bacterianas, a aquisição de sequências de organismos distantes tem importância significativa na diversidade genética das bactérias⁵⁷. As transferências podem ocorrer através de genes localizados em plasmídeos⁵⁶ ou elementos genéticos transponíveis (transposons)^{56,57}, pelo contato direto com a célula de outro organismo (conjugação)^{57,58} e pela interação com bacteriófagos (transdução)^{57,59}.

Dentro dos grupos bacterianos encontrados nos endofíticos de milho, alguns apresentam atividade já conhecida na relação com a planta hospedeira. Como a fixação de nitrogênio pelos gêneros *Rhizobium*, *Herbaspirillum*^{7,60} e *Paenibacillus*⁶¹; na produção de promotores de crescimento de plantas (*H. aquaticum*⁶², *P. psychrotolerans*^{63,64}, *Paenibacillus*^{61,65} e *M. testaceum*⁶⁶); na biorremediação de compostos tóxicos (*Sphingomonas sanguinis*⁶⁷, *Acinetobacter johnsonii*^{68,69}, *Pseudomonas*⁷⁰, *B. aryabhattai*⁷¹, *Microbacterium*⁷² e *M. testaceum*⁷³); na produção de bioprodutos (*Acinetobacter*⁷⁴, *Pseudomonas*⁷⁵, *P. psychrotolerans*⁷⁶, *P. hunanensis*⁷⁷, *B. aryabhattai*⁷⁸, *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*^{79,80}, *Paenibacillus*^{61,65} e *Microbacterium*⁷²); no controle de patógenos (*Pseudomonas*⁷⁵ e *P. oryzae*⁸¹) e/ou na proteção a estressores abióticos (*P. psychrotolerans*⁶³).

Quando os metabólitos de interesse para a planta são produzidos por um microrganismo endofítico já estabelecido, evita-se a necessidade de uma nova relação com microrganismo do ambiente para o aumento da diversidade. A possibilidade de maior diversidade metabólica sem a necessidade de aumento na diversidade biológica, que leve a capacidade de reação a mudanças no ambiente, é benéfica para a planta.

Com esse olhar inicial sobre a diversidade biológica e metabólica de endofíticos de milho foi possível verificar a existência de mecanismos geradores de variação metabólica sem exigir o desenvolvimento de novas associações. Adicionalmente, o grande número de moléculas produzidas pelos isolados testados garante a existência de um repertório químico produzido por endofíticos do milho que garantem o potencial de exploração dessa comunidade de microrganismos para a buscas de moléculas com potencial biotecnológico.

3.5. Conclusões

Microrganismos endofíticos de milho possuem grande diversidade química e genética, com a possibilidade de aplicações biotecnológicas e produção de bioprodutos para inúmeras áreas;

A diversidade biológica determinada a partir da identificação filogenética não está diretamente relacionada a potencial diversidade metabólica dos isolados sendo a diversidade metabólica maior que a biológica, tanto para microrganismos endofíticos de milho como de *Citrus*.

Referências

1. Eljounaidi, K.; Lee, S. K.; Bae, H. Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases – Review and future prospects. **Biological Control**, Atlanta, v. 103, p. 62–68, 2016.
2. Rodriguez, R. J.; White, J. F.; Arnold, A. E.; Redman, R. S. Fungal endophytes: diversity and functional roles. **New Phytologist**, London, v. 182, p. 314–330, 2009.

3. Frank, A.; Saldierna Guzmán, J.; Shay, J. Transmission of bacterial endophytes. **Microorganisms**, Basel, v. 5, n. 4, 2017. doi: 10.3390/microorganisms5040070.
4. Yadav, A. Exploring the potential of endophytes in agriculture: a minireview. **Advances in Plants & Agricultural Research**, Edmond, v. 6, n. 4, 2017. doi: 10.15406/apar.2017.06.00221.
5. Gonzalez, F. et al. New opportunities for the integration of microorganisms into biological pest control systems in greenhouse crops. **Journal of Pest Science**, Heidelberg, v. 89, p. 295–311, 2016.
6. Azevedo, J. L.; Maccheroni Junior, W.; Pereira, J. O.; de Araújo, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Eletronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 3, 2000. <http://www.ejb.org/content/vol3/issue1/full/4>.
7. Melo, I. S.; Azevedo, J. L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998.
8. Saikkonen, K., Wäli, P., Helander, M. & Faeth, S. H. Evolution of endophyte-plant symbioses. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 9, p. 275–280, 2004.
9. Clay, K. The ecology and evolution of endophytes. **Agriculture, Ecosystem and Environment**, Amsterdam, v. 44, p. 39–64, 1993.
10. Zhang, H. W.; Song, Y. C.; Tan, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, London, v. 23, p. 753–771, 2006.
11. Torres, M. S. et al. Were endophytes pre-adapted for defensive mutualism? In: International Symposium on Fungal Endophytes of Grasses, 6., 2007, Christchurch, New Zealand. **Proceedings...** Dunedin, NZ: New Zealand Grassland Association, 2007. (Grassland Research and Practice Series, 13).
12. Araújo, W. L. et al. **Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: ESALQ, 2010.
13. Strobel, G. D. B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural product. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v. 67, p. 491–402, 2003.
14. de Oliveira, N. C. et al. Endophytic bacteria with potential for bioremediation of petroleum hydrocarbons and derivatives. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 11, p. 2977–2984, 2012.
15. Müller, C. A.; Obermeier, M. M.; Berg, G. Bioprospecting plant-associated microbiomes. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 235, p. 171–180, 2016.

16. Stępniewska, Z.; Kuśniar, A. Endophytic microorganisms - Promising applications in bioremediation of greenhouse gases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 97, p. 9589–9596, 2013.
17. Seghers, D. et al. Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 70, p. 1475–1482, 2004.
18. Li, G. et al. Frequency of Cry1F non-recessive resistance alleles in North Carolina field populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **PLoS One**, San Francisco, v. 11, p. 1–14, 2016.
19. Shirling, E. B. & Gottlieb, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 16, 313–340 (1966).
20. Sunnucks, P.; Hales, D. F. Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Stiobion* (Hemiptera: *Aphididae*). **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 13, p. 510-524, 1996.
21. Gilbert, M. T. P. et al. DNA extraction from dry museum beetles without conferring external morphological damage. **PLoS One**, San Francisco, v. 2, p. 1–4, 2007.
22. Lane, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E.; Goodfellow, M. (Ed.). **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Chichester: John Wiley and Sons, 1991. p. 115–175.
23. Pantos, O. et al. The bacterial ecology of a plague-like disease affecting the Caribbean coral *Montastraea annulari*. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, p. 370–382, 2003.
24. Turner, S. et al. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, New York, v. 46, p. 327–338, 1999.
25. Weisburg, W. G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 173, p. 697–703, 1991.
26. White, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A. et al. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic Press, 1990. p. 315–322.
27. Sambrook, J. F.; Russell, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
28. Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger data sets. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 33, p. 1870–1874, 2016.

29. TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, p. 2731–2739 (2011).
30. Kimura, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 33, p. 111–120, 1980.
31. Chong, J. et al. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. **Nucleic Acids Research**, London, 2018. doi: 10.1093/nar/gky310.
32. Xia, J.; Wishart, D. S. Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive Metabolomics Data Analysis. **Current Protocols in Bioinformatics**, Hoboken, v. 55, p. 14.10.1--14.10.91, 2016.
33. Xia, J. et al. MetaboAnalyst 3.0-making metabolomics more meaningful. **Nucleic Acids Research**, London, v. 43, W251–W257, 2015.
34. Xia, J., Mandal, R., Sinelnikov, I. V., Broadhurst, D. & Wishart, D. S. MetaboAnalyst 2.0--a comprehensive server for metabolomic data analysis. **Nucleic Acids Research**, London, v.40, W127–W133 (2012).
35. Xia, J.; Wishart, D. S. Web-based inference of biological patterns, functions and pathways from metabolomic data using MetaboAnalyst. **Nature Protocols**, London, v. 6, p. 743–760, 2011.
36. Xia, J.; Wishart, D. S. Metabolomic Data Processing, Analysis, and Interpretation Using MetaboAnalyst. **Current Protocols in Bioinformatics**, Hoboken, v. 34, p. 14.10.1--14.10.48, 2011.
37. Xia, J. et al. MetaboAnalyst: a web server for metabolomic data analysis and interpretation. **Nucleic Acids Research**, London, v. 37, p. W652-660, 2009.
38. Xia, J. et al. Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial. **Metabolomics**, New York, v. 9, p. 280–299, 2013.
39. Xia, J.; Sinelnikov, I. V.; Wishart, D. S. MetATT: a web-based metabolomics tool for analyzing time-series and two-factor datasets. **Bioinformatics**, Oxford, v. 27, p. 2455–2456, 2011.
40. Xia, J.; Wishart, D. S. MetPA: a web-based metabolomics tool for pathway analysis and visualization. **Bioinformatics**, Oxford, v. 26, p. 2342–2344, 2010.
41. Xia, J.; Wishart, D. S. MSEA: a web-based tool to identify biologically meaningful patterns in quantitative metabolomic data. **Nucleic Acids Research**, London, v. 38, p. W71–W77, 2010.
42. Giraldo, A. et al. Phylogeny of *Sarocladium* (Hypocreales). **Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 34, p. 10-24, 2015.

43. Summerbell, R. C. et al. *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium*, and *Trichothecium*. **Studies in Mycology**, Baarn, v. 68, p. 139–162, 2011.
44. Gao, S. et al. Genome sequence and virulence variation-related transcriptome profiles of *Curvularia lunata*, an important maize pathogenic fungus. **BMC Genomics**, London, v. 15, p. 1–18, 2014.
45. Manamgoda, D. S. et al. The genus *Bipolaris*. **Studies in Mycology**, Baarn, v. 79, p. 221–288, 2014.
46. Bills, G. F.; Platas, G.; Gams, W. Conspecificity of the cerulenin and helvolic acid producing '*Cephalosporium caerulens*', and the hypocrealean fungus *Sarocladium oryzae*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 108, p. 1291–1300, 2004.
47. Roylance, J. T.; Hill, N. S.; Agee, C. S. Ergovaline and peramine production in endophyte-infected tall fescue: Independent regulation and effects of plant and endophyte genotype. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 20, p. 2171–2183, 1994.
48. Marin-Felix, Y. et al. New species and records of *Bipolaris* and *Curvularia* from Thailand. **Mycosphere**, Chiang Rai, Thailand, v. 8, p. 1556–1574, 2017.
49. Kuan, C. S. et al. Dissecting the fungal biology of *Bipolaris papendorfii*: From phylogenetic to comparative genomic analysis. **DNA Research**, Oxford, v. 22, p. 219–232, 2014.
50. Manamgoda, D. S. et al. A taxonomic and phylogenetic re-appraisal of the genus *Curvularia* (*Pleosporaceae*): human and plant pathogens. **Phytotaxa**, Auckland, v. 212, p. 175–198, 2015.
51. Sayyed, R. Z.; Jobanputra, A. H.; Chincholkar, S. B. *Curvularia lunata*: A versatile organism for biotransformation of organic compounds. In: Rai, M. K.; Deshmukh, S. K. (Ed.). **Fungi: diversity and biotechnology**. Johdpur, India: Scientific Publishing, 2015. p. 195–216.
52. Giridharan, P. et al. Antiproliferative activity of hamigerone and radicicol isolated from *Bipolaris papendorfii*. **BioMed Research International**, New York, v. 2014, 7 p. 2014. doi: 10.1155/2014/890904.
53. McInroy, J. A.; Kloepper, J. W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 173, p. 337–342, 1995.
54. Fisher, P. J.; Petrini, O.; Scott, H. M. L. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, Oxford, v. 122, p. 299–305, 1992.

55. Lorenz, M. G.; Wackernagel, W. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. **Microbiological Reviews**, Washington, DC, v. 58, p. 563–602, 1994.
56. Davison, J. Genetic exchange between bacteria in the environment. **Plasmid**, New York, v. 91, p. 73–91, 1999.
57. Ochman, H.; Lawrence, J. G.; Groisman, E. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. **Nature**, London, v. 405, p. 299–304, 2000.
58. Heinemann, J. A.; Sprague Junior, G. F. Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast. **Nature**, London, v. 340, p. 205–209, 1989.
59. Jiang, S. C.; Paul, J. H. Gene transfer by transduction in the marine environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 64, 2780–2787 (1998).
60. Young, J. M. Renaming of *Agrobacterium larrymoorei* Bouzar & Jones 2001 as *Rhizobium larrymoorei* (Bouzar & Jones 2001) comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 149, 2004.
61. Jiang, B. et al. *Paenibacillus shenyangensis* sp. nov., a bioflocculant-producing species isolated from soil under a peach tree. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 65, 220–224 (2015).
62. Chen, T. et al. Diversity and potential application of endophytic bacteria in ginger. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 13, p. 4918–4931, 2014.
63. Chen, L. et al. Growth promotion and induction of antioxidant system of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L.) by endophyte TPs-04 under low night temperature. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 176, p. 143–150, 2014.
64. Krishnamoorthy, R. et al. Diversity of culturable methylotrophic bacteria in different genotypes of groundnut and their potential for plant growth promotion. **3 Biotech**, Heidelberg, v. 8, p. 11, 2018.
65. Liu, Y. et al. *Paenibacillus hunanensis* sp. nov., isolated from rice seeds. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 60, p. 1266–1270, 2010.
66. Mendes, R. et al. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 73, p. 7259–7267, 2007.

67. Rahal, A. G.; Moussa, L. A. Degradation of 2, 4, 6-Trinitrotoluene (TNT) by Soil Bacteria Isolated From TNT Contaminated Soil. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, Melbourne, v. 5, p. 8–17, 2011.
68. Straganz, G. D. et al. Acetylacetone-cleaving enzyme Dke1: a novel C–C-bond-cleaving enzyme from *Acinetobacter johnsonii*. **Biochemical Journal**, London, v. 369, p. 573–581, 2003.
69. XIE, S. et al. Biodegradation of malathion by *Acinetobacter johnsonii* MA19 and optimization of cometabolism substrates. **Journal of Environmental Sciences**, Beijing, v. 21, p. 76–82, 2009.
70. Li, S.; Wang, S.; Yan, W. Biodegradation of methyl tert-butyl ether by cometabolism with a *Pseudomonas* sp. Strain. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 13, p. 1–10, 2016.
71. Pailan, S. et al. Degradation of organophosphate insecticide by a novel *Bacillus aryabhatai* strain SanPS1, isolated from soil of agricultural field in Burdwan, West Bengal, India. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Amsterdam, v. 103, p. 191–195, 2015.
72. Lin, L. et al. The actinobacterium *Microbacterium* sp. 16SH accepts pBBR1-based pPROBE vectors, forms biofilms, invades roots, and fixes N₂ associated with micropropagated sugarcane plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 93, p. 1185–1195, 2012.
73. Morohoshi, T. et al. Genome sequence of *Microbacterium testaceum* StLB037, an N-acylhomoserine lactone-degrading bacterium isolated from potato leaves. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 193, p. 2072–2073, 2011.
74. Abdel-el-haleem, D. Minireview acinetobacter: environmental and biotechnological applications. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 2, p. 71–74, 2003.
75. Dowling, D. N.; O’Gara, F. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. **Trends in Biotechnology**, Barking, v. 12, p. 133–141, 1994.
76. Sun, H. et al. Expression, characterization of a novel nitrilase PpL19 from *Pseudomonas psychrotolerans* with S-selectivity toward mandelonitrile present in active inclusion bodies. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 38, p. 455–461, 2016.
77. Sonawane, M. S. et al. Insect Gut Bacteria: A Novel Source for Siderophore Production. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 6, 2016. doi: 10.1007/s40011-016-0785-0.

78. Singh, Y.; Srivastava, S. K. Performance improvement of *Bacillus aryabhatai* ITBHU02 for high-throughput production of a tumor-inhibitory L-asparaginase using a kinetic model based approach. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 89, p. 117–127, 2014.
79. Rooney, A. P. et al. Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 59, 2429–2436 (2009).
80. Gautam, R.; Sharma, J. Optimization, purification of cellulase produced from *Bacillus Subtilis* Subsp. *Inaquosorum* under solid state fermentation and its potential applications in denim industry. **International Journal of Science Research**, Raipur, India, v. 3, p. 1759–1763, 2014.
81. Vagelas, I.; Gowen, S. R. Control of *Fusarium oxysporum* and root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) with *Pseudomonas oryzae* habitans. **Pakistan Journal of Phytopathology**, Faisalabad, v. 24, p. 32–38, 2012.

4. UTILIZAÇÃO DE INSETICIDAS PARA O CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS DE MILHO – SÃO ELES POTENCIAIS BIORREMEDIADORES?

Resumo

O uso de produtos químicos na agricultura é, muitas vezes, feito de forma incorreta ou exagerada, produzindo inúmeros efeitos indesejáveis, como a contaminação do solo. A contaminação do solo pode trazer riscos ao ambiente, afetar a microbiota e a comunidade de invertebrados associados ao solo, modificando as características do mesmo, podendo, assim, torná-lo inadequado ao cultivo agrícola. A biorremediação é uma opção econômica e ecologicamente viável para a recuperação dessas áreas. Trata-se de um processo que reduz a presença de poluentes em um local contaminado por meio da aplicação de agentes biológicos. Os organismos aplicados podem degradar, imobilizar, mineralizar, transformar ou remover os compostos poluentes. Os principais agentes biológicos aplicados são microrganismos, os quais podem atuar na biorremediação de forma direta ou indireta. Como os microrganismos endofíticos também sofrem pressão de seleção dos diferentes produtos químicos empregados nos ambientes agrícolas, o objetivo do presente estudo foi o de investigar o potencial de utilização de inseticidas por microrganismos endofíticos para uso em processos de biorremediação. Assim, bactérias endofíticas isoladas de milho (21) e *Citrus* (6) foram cultivadas em meio contendo os inseticidas lufenuron, spinosad, chlorpyrifos ethyl, lambda-cyhalothrin e deltamethrin como única fonte de carbono para o seu crescimento. Esses inseticidas são os mais comumente aplicados no controle da principal praga do milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Quinze dos isolados ensaiados apresentaram crescimento em meio mínimo acrescido de inseticidas. Desses, *Pseudomonas hunanensis*, *Acidovorax wautersii*, *Sphingomonas sanguinis* e *Streptomyces griseolus* foram selecionados para construção da curva de crescimento em meio líquido devido ao seu potencial de crescimento em todos os inseticidas testados. Foi observado grande potencial biotecnológico para o desenvolvimento futuro de aplicações em técnicas de biorremediação ou fitorremediação dos endófitos de milho analisados.

Palavras-chave: Biorremediação; Bioprospecção; Bactérias endofíticas; Inseticidas.

Abstract

The use of chemicals in agriculture is often done incorrectly or in excess, leading to many undesirable effects, such as soil contamination. The contamination of the soil can put in risk the environment, affect the microbiota and the invertebrate community, modifying the soil characteristics and making it unsuitable for agricultural activities. Bioremediation is an economically and ecologically viable option for recovery of these areas; it is a process that applies biological agents to reduce the presence of pollutants in a contaminated site. These organisms can degrade, immobilize, mineralize, transform or remove pollutants. The main biological agents are microorganisms, which can be applied directly or indirectly in bioremediation. As endophytic microorganisms also undergo selection pressure of different chemicals used in agricultural environments, the objective of this work was to investigate the potential of endophytic to degrade insecticides for use in bioremediation processes. Thus, endophytic bacteria isolated from corn (21) and Citrus (6) were cultivated in medium containing the insecticides lufenuron, spinosad, chlorpyrifos ethyl, lambda-cyhalothrin and deltamethrin as the only source of carbon for their growth. These insecticides are the most commonly applied in controlling the main corn pest, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Of the tested isolates, fifteen grew in minimal medium supplemented with insecticides. Of these, *Pseudomonas hunanensis*, *Acidovorax wautersii*, *Sphingomonas sanguinis* and *Streptomyces griseolus* were selected to assess their growth curve in liquid medium due to their potential to grow in all insecticides tested. We observed a great biotechnological potential for the future development of applications in techniques of bioremediation or phytoremediation for the maize endophytes tested.

Keywords: Bioremediation; Bioprospecting; Endophytic bacteria; Insecticides.

4.1. Introdução

O aumento crescente da população mundial requer o incremento da produção para atender a maior demanda de alimentos. Como as pragas das plantas cultivadas são responsáveis por grande parte da redução da produtividade, o aumento da demanda por alimentos leva ao uso cada vez mais intenso de produtos sintéticos voltados ao controle de insetos pragas, fitopatógenos e plantas daninhas. O uso em larga escala desses produtos pode levar à contaminação de áreas agrícolas¹.

Esse processo pode ser observado na interação milho – *Spodoptera*. *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) que se constitui na principal praga do milho, sendo responsável pela perda de 400 milhões de dólares anuais no Brasil². A principal forma de controle dessa praga ainda se dá por meio de inseticidas sintéticos, mesmo em áreas de cultivo de plantas geneticamente modificadas que expressam genes de toxinas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt)^{2,3}. A utilização de inseticidas no controle dessa praga tem sido feita de forma inadequada, o que tem levado à diminuição na eficiência de controle de diversos produtos, principalmente devido à evolução da resistência de insetos^{4–13}, o que acaba levando à aplicação excessiva de produtos, agravando, assim, os problemas de contaminação do ambiente².

Alguns dos principais inseticidas aplicados na cultura do milho são o *lufenuron*, *spinosad*, *chlorpyrifos ethyl*, *lambda-cyhalothrin* e *deltamethrin*. *Lufenuron* (PubChem CID:71777; C₁₇H₈Cl₂F₈N₂O₃) é um composto inseticida de uso agrícola e veterinário do grupo das benzoilfeniluréias. Apresenta atividade reguladora de crescimento dos insetos, atuando como inibidor da síntese de quitina durante a ecdise, afetando ainda a fecundidade e fertilidade dos adultos^{14,15}. *Lufenuron* é de toxicidade moderada aos mamíferos, sendo também aplicado em animais domésticos para o controle de pulgas¹⁶. *Spinosad* (PubChem CID:443059; C₄₁H₆₅NO₁₀) é um inseticida que conta com as espinosinas A e D como ingredientes ativos. Essas espinosinas foram isoladas da actinobactéria *Saccharopolyspora spinosa* Mertz; Yao (1990) (Actinomycetales, Pseudonocardaceae)^{17,18}. *Spinosad* atua no sistema nervoso como agonista dos receptores nicotínicos da acetilcolina, interferindo, assim, nos receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA). É considerado de baixa toxicidade a organismos não-alvo, sendo também recomendado para uso em cultivos orgânicos¹⁷. *Chlorpyrifos ethyl* (PubChem CID:2730; C₉H₁₁Cl₃NO₃PS) é um organofosforado

utilizado no ambiente agrícola em todo o mundo desde 1965¹⁹. Atua como inibidor da acetilcolinesterase, possuindo, assim, alta toxicidade a mamíferos²⁰. *Lambda-cyhalothrin* (PubChem CID:71464055; $C_{23}H_{19}ClF_3NO_3$) e *deltamethrin* (PubChem CID:40585; $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$) são piretroides do tipo 2²¹ os quais tem sua estrutura sintética derivada das piretrinas (inseticidas naturais)^{22,23}, ambos tem ação contra grande diversidade de insetos e, por isso, são largamente empregados no controle de insetos na agricultura, em residências e na veterinária^{21,22,24}. Piretróides são ingredientes ativos comumente utilizados, contudo o seu principal risco está na toxicidade a organismos não-alvo^{22,24}. Isso ocorre porque seu modo de ação tem como alvo um mecanismo conservado no funcionamento do sistema nervoso, atuando no fluxo de íons sódio e assim na transmissão dos impulsos nervosos^{24,25}.

Áreas contaminadas por esses compostos podem ser recuperadas por biorremediação para que voltem a ter funcionalidade ecológica ou agrícola²⁶. O processo de biorremediação utiliza agentes biológicos para reduzir a concentração de poluentes e estabilizar ou reduzir os riscos em um local contaminado^{26,27}. Trata-se de um método ecologicamente correto e economicamente acessível²⁷. Na biorremediação são usadas técnicas que podem degradar, imobilizar, mineralizar, transformar ou remover os contaminantes²⁷.

Os microrganismos são aplicados vastamente como os principais agentes em diversos processos de biorremediação. Podem atuar diretamente na biorremediação por meio da bioacumulação, biodegradação ou biotransformação das substâncias tóxicas²⁷, ou atuar de forma indireta, como o que ocorre na fitorremediação^{28–30}. A microbiota endofítica é formada por um grupo de microrganismos que tem potencial biorremediador, podendo atuar diretamente em contato com os agentes contaminantes, ou indiretamente, ao auxiliar seu hospedeiro com a degradação de poluentes acumulados no tecido vegetal. Adicionalmente, os endófitos podem produzir substâncias estimuladoras do crescimento de plantas e da tolerância das raízes aos contaminantes do solo^{26–28}. O interesse no uso de microrganismos endofíticos na biorremediação deve-se à sua grande diversidade biológica e metabólica, possibilitando a tolerância e/ou degradação de uma grande gama de substâncias tóxicas²⁸.

Dado o potencial apresentado pela microbiota endofítica e da possibilidade de seleção natural de microrganismos com potencial de biodegradação de ambientes poluídos²⁷, no presente estudo foi investigada a capacidade de bactérias endofíticas

isoladas de áreas de cultivo tradicional de milho em degradar inseticidas comumente utilizados, baseando-se na hipótese de que a interação planta hospedeira – endofíticos sirva como fonte de bactérias com potencial para uso em processos de biorremediação.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Ensaio de capacidade crescimento em meio com inseticida

Todas as bactérias endofíticas isoladas e selecionadas no item 3.3 tiveram sua capacidade de crescimento avaliada em inseticidas comumente aplicados na cultura do milho para o controle de lagartas *S. frugiperda*, como *lufenuron*, *spinosad*, *chlorpyrifos ethyl*, *lambda-cyhalothrin* e *deltamethrin*. As bactérias foram inoculadas por estria de esgotamento³¹ em placas de Petri contendo meio mínimo M9 (MgSO₄ 0,24g/L; NH₄Cl 0,4g/L; NaH₂PO₄ 0,5g/L; K₂HPO₄ 0,21g/L; pH 7,2; ágar 16 g/L)³², contendo 10 µg/mL de inseticida. As placas foram incubadas a 28°C durante 7 dias, sendo observadas diariamente para verificar o crescimento. Foram avaliadas como crescimento positivo (+) ou ausente (-).

4.2.2. Curva de crescimento

De um total de 27 bactérias cultivadas no ensaio 4.2.1, os isolados IIL-ZM-IDP-01 (*Acidovorax wautersii*), IIL-ZM-IDP-02 (*Pseudomonas hunanensis*), IIL-ZM-IDP-12 (*Sphingomonas sanguinis*) e LGM-CR-01 (*Streptomyces griseolus*), que apresentaram crescimento positivo em pelo menos quatro dos inseticidas avaliados, foram selecionados para a determinação das curvas de crescimento nos diferentes pesticidas.

4.2.1.1. Pré-inóculo

O pré-inóculo dos isolados selecionados foi preparado após inoculação de 50 mL de meio líquido ISP2 (4 g de extrato de levedura, 4 g de dextrose e 10 g de malte, 1 litro de água deionizada, pH 7.3)³³ com uma colônia das bactérias estudadas. O meio foi mantido sob agitação constante (120 rpm) e temperatura controlada (28°C) por 72 h ou até atingir densidade ótica (OD_{600 nm} = 0,6), quando o material foi reservado para utilização na etapa posterior.

4.2.1.2. Cultivo

Para cada inseticida, foi inoculado 0,1 mL da suspensão de bactérias em 4 mL de meio mínimo (M9) líquido acrescido de 10 µg/mL do respectivo inseticida em um tubo de 10 mL, para a determinação da curva de crescimento de cada isolado nos diferentes inseticidas estudados. Foram feitos dois tubos referentes a cada dia de cultivo, com o total de 20 tubos por inseticida de cada isolado. As amostras foram cultivadas por 10 dias (28°C x 120 rpm). Diariamente, um tubo de cultivo foi removido e uma alíquota de 100 µL foi utilizada para a determinação da quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC) pela técnica de microcolônias³⁴. Essa técnica faz uso da diluição seriada das alíquotas, coleta de 10 µL de cada diluição e aplicação, na forma de gota, em placas contendo meio sólido não seletivo TSA (4g triptona de soja, 16g ágar e um litro de água deionizada)³⁵. As placas foram incubadas (28°C x 48 h) e o número de UFC determinado. O experimento foi feito em duplicata, com cada frasco de 4 mL sendo considerado uma repetição biológica, e cada gota (10 µL) da microcolônia (4 por diluição) como sendo uma repetição técnica.

4.3. Resultados

4.3.1. Capacidade de crescimento

As bactérias endofíticas utilizadas demonstraram alto potencial de crescimento em meio tendo os inseticidas como única fonte de carbono. *Chlorpyrifos ethyl* e *spinosad* foram os que apresentaram o maior número de isolados (14) com potencial de degradação e utilização desses compostos como substrato para o seu crescimento positivo. Dentre os isolados, 12 apresentaram capacidade de crescimento utilizando *deltamethrin* como única fonte de carbono, 11 em *lufenuron* e oito em *lambda-cyhalothrin* (Tabela 4.1). Dos endófitos analisados, sete cresceram em todos os inseticidas usados, sendo quatro (4) deles provenientes de citros, LGM-CR-01 (*Streptomyces griseolus*), LGM-CS-01 e LGM-CS-03 (*Streptomyces hydrogenans*) e LGM-CS-04 (*Streptomyces badius*), e três (3) do milho, IIL-ZM-IDP-01 (*Acidovorax wautersii*), IIL-ZM-IDP-14 (*Pseudomonas oryzae*) e IIL-ZM-IDP-15 (*Pedobacter suwonensis*).

Tabela 4.1 - Capacidade de crescimento dos endófitos em meio mínimo (M9) sólido contendo os inseticidas *chlorpyrifos ethyl* (CL), *lambda-cyhalothrin* (λ), *spinosad* (SP), *deltamethrin* (Δ), *lufenuron* (LUF) como única fonte de carbono. Sinais “+” para presença de crescimento e “-” para ausência de crescimento

Isolado	Correspondente mais próximo	CL	λ	SP	Δ	LUF
IIL-ZM-IDP-01	<i>Acidovorax wautersii</i>	+	+	+	+	+
IIL-ZM-IDP-02	<i>Pseudomonas hunanensis</i>	+	+	+	+	-
IIL-ZM-IDP-03	<i>Rhizobium larrymoorei</i>	-	-	-	-	-
IIL-ZM-IDP-04	<i>Paenibacillus hunanensis</i>	-	-	-	-	-
IIL-ZM-IDP-05	<i>Chryseobacterium culicis</i>	-	-	+	+	-
IIL-ZM-IDP-06	<i>Microbacterium testaceum</i>	-	-	-	-	-
IIL-ZM-IDP-07	<i>Chryseobacterium culicis</i>	+	-	+	+	+
IIL-ZM-IDP-08	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	+	-	+	+	+
IIL-ZM-IDP-09	<i>Paenibacillus hunanensis</i>	-	-	-	-	-
IIL-ZM-IDP-10	<i>Herbaspirillum aquaticum</i>	-	-	-	-	-
IIL-ZM-IDP-11	<i>Microbacterium testaceum</i>	-	-	-	-	-
IIL-ZM-IDP-12	<i>Sphingomonas sanguinis</i>	+	-	+	+	+
IIL-ZM-IDP-13	<i>Herbaspirillum aquaticum</i>	+	-	+	-	-
IIL-ZM-IDP-14	<i>Pseudomonas oryzae</i>	+	+	+	+	+
IIL-ZM-IDP-15	<i>Pedobacter suwonensis</i>	+	+	+	+	+
IIL-ZM-IDP-16	<i>Microbacterium testaceum</i>	-	-	-	-	-
IIL-ZM-IDP-17	<i>Bacillus aryabhatai</i>	-	-	-	-	-
IIL-ZM-IDP-18	<i>Bacillus subtilis subsp. inaquosorum</i>	-	+	+	+	+
IIL-ZM-IDP-19	<i>Microbacterium testaceum</i>	-	-	-	-	-
IIL-ZM-IDP-20	<i>Microbacterium testaceum</i>	+	-	-	-	-
IIL-ZM-IDP-23	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i>	-	-	-	-	-
LGM-CR -01	<i>Streptomyces griseolus</i>	+	+	+	+	+
LGM-CR-02	<i>Streptomyces badius</i>	-	-	-	-	-
LGM-CS-01	<i>Streptomyces hydrogenans</i>	+	+	+	+	+
LGM-CS-02	<i>Streptomyces griseolus</i>	+	-	+	+	+
LGM-CS-03	<i>Streptomyces hydrogenans</i>	+	+	+	+	+
LGM-CS-04	<i>Streptomyces badius</i>	+	+	+	+	+

4.3.2. Curvas de crescimento

A maior densidade de células foi registrada em *Acidovorax wautersii* (IIL-ZM-IDP-01) tendo *lufenuron* como substrato, atingindo 10^9 UFC/mL no terceiro dia de cultivo. *Chlorpyrifos ethyl* (CL) e *spinosad* foram os substratos que proporcionaram o menor crescimento do isolado IIL-ZM-IDP-01 (Figura 4.1). O isolado IIL-ZM-IDP-02 (*Pseudomonas hunanensis*) apresentou curvas de crescimento muito semelhantes em todos os inseticidas, atingindo densidade máxima próxima a 10^8 UFC/mL no sétimo dia de crescimento (Figura 4.1). O crescimento do isolado IIL-ZM-IDP-12 (*Sphingomonas sanguinis*) foi inicialmente mais lento em *spinosad*, mas todos os meios atingiram densidade máxima próxima a 10^8 UFC/mL no oitavo dia de cultivo (Figura 4.1). Dos isolados testados, LGM-CS-02 (*Streptomyces griseolus*) não apresentou crescimento significativo em nenhum dos inseticidas avaliados (Figura 4.1).

Figura 4.1 - Curva de crescimento dos isolados endofíticos IIL-ZM-IDP-02 (*Pseudomonas hunanensis*), IIL-ZM-IDP-01 (*Acidovorax wautersii*), IIL-ZM-IDP-12 (*Sphingomonas sanguinis*) e LGM-CS-02 (*Streptomyces griseolus*) em meio mínimo (M9) acrescido dos inseticidas *chlorpyrifos ethyl* (CL), *lambda-cyhalothrin* (λ), *spinosad* (SP), *deltamethrin* (Δ), *lufenuron* (LUF) como única fonte de carbono

4.4. Discussão

Foi identificado um grande número de isolados (14) com capacidade de crescimento em pelo menos dois inseticidas como única fonte de carbono. Sendo nove do milho e cinco de *Citrus*.

Das sete bactérias que cresceram em todos os inseticidas analisados, algumas possuem registros como biorremediadores, como *Acidovorax* spp.³⁶, *Sphingomonas sanguinis*³⁷, *Streptomyces griseolus*³⁸⁻⁴¹, *S. badius*^{42,43}, *Paenibacillus*⁴⁴, *P. hunanensis*⁴⁵ e outras espécies do gênero *Pseudomonas*⁴⁶.

O elevado número de bactérias (14) com capacidade de utilização do inseticida *spinosad* como substrato de crescimento pode ser decorrente da origem microbiana desse produto, dado que seus dois ingredientes ativos (espinosina A e D) são originalmente produzidos por *S. spinosa*^{17,18,47}. A origem biológica dessas moléculas representariam um composto com o qual as bactérias normalmente interagiriam em seu ambiente natural, apresentando mecanismos de defesa para a metabolização das mesmas⁴⁸. *Chlorpyrifos ethyl* é um organofosforado, uma das moléculas mais utilizadas no combate a pragas desde 1965¹⁹. Apesar do mecanismo de degradação microbiana de organofosforado parecer ser ligado apenas à existência de enzimas do grupo das fosfotriesterases ou hidrolases dos organofosfatos, são várias as bactérias e fungos que apresentam capacidade de degradação desses xenobiótico, incluindo o *chlorpyrifos ethyl*⁴⁹.

Não foi observada relação entre o posicionamento sistemático dos isolados de endófitos estudados e a sua capacidade de utilização dos diferentes inseticidas como substrato de crescimento. Dos três filotipos de *Pseudomonas*, *P. oryzihabitans* e *P. hunanensis* tiveram alto potencial de utilização de pesticidas enquanto *P. psychrotolerans* não foi capaz de se desenvolver em nenhum dos inseticidas testados. Variação na capacidade de utilização de inseticidas também foi observada entre isolados de um mesmo filotipo. O filotipo *S. badius* apresentou capacidade divergente de utilização de inseticidas como substrato nutricional (LGM-CS-04 com capacidade de utilização de todos inseticidas testados; LGM-CR-02 sem capacidade de utilização de inseticidas). O mesmo foi observado para os isolados do filotipo *Chryseobacterium culicis*. O isolado IIL-ZM-IDP-05 cresceu em apenas dois inseticidas enquanto IIL-ZM-IDP-07 cresceu em quatro. Essas diferenças observadas na capacidade de biorremediação entre filotipos geneticamente próximos ou entre isolados de uma mesmo filotipo podem ser causadas por

modificações cromossômicas ou mesmo pela ocorrência de alterações genéticas de origem plasmidial, assim como discutido no capítulo anterior.

Todos os microrganismos que demonstraram potencial de utilização e crescimento em meio contendo os inseticidas testados como fonte exclusiva de carbono, apresentando potencial para uso como biorremediadores. A utilização pode se dar por aplicação isolada ou em consórcios microbianos. Adicionalmente, por serem endófitos, podem também auxiliar no desenvolvimento de procedimento de fitorremediação. Contudo, ainda são necessários estudos adicionais para a determinação do consumo dos inseticidas, assim como dos produtos resultantes da degradação inicial dessas toxinas e as melhores condições para maior biodegradação.

4.5. Conclusões

Bactérias endofíticas de milho e de *Citrus* apresentam potencial de crescimento utilizando *deltamethrin*, *chlorpyrifos ethyl*, *lambda-cyhalothrin*, *lufenuron* ou *spinosad* como única fonte de carbono;

Os inseticidas *chlorpyrifos ethyl* e *spinosad* são consumidos pelo maior número de endófitos;

Os isolados IIL-ZM-IDP-01, IIL-ZM-IDP-02 e IIL-ZM-IDP-12 apresentam potencial como agentes biorremediadores para a eliminação dos contaminantes *deltamethrin*, *chlorpyrifos ethyl*, *lambda-cyhalothrin*, *lufenuron* e *spinosad*.

Referências

1. O'Callaghan, M. Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 100, p. 5729–5746, 2016.
2. Cruz, I.; Figueiredo, M. L. C.; Silva, R. B.; Foster, J. E. Efficiency of chemical pesticides to control. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v. 9, p. 107–122, 2010.
3. Farias, J. R. et al. Dominance of Cry1F resistance in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on TC1507 Bt maize in Brazil. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 72, p. 974–979, 2016.

4. Santos, V. et al. Insecticide resistance in populations of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae), from the state of Pernambuco, Brazil. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 40, p. 264–270, 2011.
5. Bogwitz, M. R. et al. Cyp12a4 confers lufenuron resistance in a natural population of *Drosophila melanogaster*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 102, p. 12807–12812, 2005.
6. Wang, W. et al. Selection and characterization of spinosad resistance in *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 84, p. 180–187, 2006.
7. Bielza, P. et al. Resistance to spinosad in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande), in greenhouses of south-eastern Spain. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 63, p. 682–687, 2007.
8. Liu, H. et al. Chlorpyrifos Resistance in Mosquito *Culex quinquefasciatus*. **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 42, p. 815–820, 2005.
9. Siegfried, B. D. et al. Biochemistry and genetics of chlorpyrifos resistance in the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v. 121, p. 110–121, 1990.
10. Hansen, L. M. Insecticide-resistant pollen beetles (*Meligethes aeneus* F.) found in Danish oilseed rape (*Brassica napus* L.) fields. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 59, p. 1057–1059, 2003.
11. Yoon, K. S. et al. Biochemical and molecular analysis of deltamethrin resistance in the common bed bug (Hemiptera: Cimicidae). **Journal of Medical Entomology**, Honolulu, v. 45, p. 1092–1101, 2008.
12. Guedes, R. N. C. et al. Inheritance of deltamethrin resistance in a brazilian strain of maize weevil (*Sitophilus zeamais* mots). **International Journal of Pest Management**, London, v. 40, p. 103–106, 1994.
13. Lorini, I.; Galley, D. J. Deltamethrin resistance in *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae), a pest of stored grain in Brazil. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 35, p. 37–45, 1999.
14. Pratisoli, D. et al. Ação transovariana de lufenuron (50 g/l) sobre adultos de *Spodoptera Frugiperda* (J. E. smith) (Lepidoptera: Noctuidae) e seu efeito sobre o parasitóide de ovos *Trichogramma pretiosum* Riley (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, p. 9–14, 2004.
15. Brock, T. C. M. et al. Toxicity of sediment-bound lufenuron to benthic arthropods in laboratory bioassays. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 198, p. 118–128, 2018.

16. Meinke, P. T.; Smith, M. M.; Shoop, W. L. Nodulisporic acid: its chemistry and biology. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 2, p. 655–674, 2002.
17. Tomé, H. V. V. et al. Spinosad in the native stingless bee *Melipona quadrifasciata*: Regrettable non-target toxicity of a bioinsecticide. **Chemosphere**, Oxford, 124, p. 103–109, 2015.
18. Campos, M. R. et al. Spinosad and the tomato borer *Tuta absoluta*: A bioinsecticide, an invasive pest threat, and high insecticide resistance. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, 2014.
19. Singh, B. K. et al. Biodegradation of chlorpyrifos by *Enterobacter* strain B-14 and its use in bioremediation of contaminated soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 70, p. 4855–4863, 2004.
20. Kim, S. et al. **PubChem Compound Database**. London, Information Retrieval Ltd. 2005. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2730>. Acesso em: 18 abr. 2018.
21. Martínez, M. A. et al. Pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin induces hepatic cytochrome P450 enzymes, oxidative stress and apoptosis in rats. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 631–632, p. 1371–1382, 2018.
22. Birolli, W. G. et al. Enantioselective biodegradation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin by marine-derived fungi. **Chemosphere**, Oxford, v. 197, p. 651–660, 2018.
23. Sharma, N. et al. Persistence of thiacloprid and deltamethrin residues in tea grown at different locations of North-East India. **Food Chemistry**, Barking, v. 253, p. 88–92, 2018.
24. Cycon, M.; Piotrowska-Seget, Z. Pyrethroid-degrading microorganisms and their potential for the bioremediation of contaminated soils: A review. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 7, p. 1–26, 2016.
25. Burr, S. A.; Ray, D. E. Structure-activity and interaction effects of 14 different pyrethroids on voltage-gated chloride ion channels. **Toxicological Sciences**, Orlando, v. 77, p. 341–346, 2004.
26. Yadav, A. Exploring the potential of endophytes in agriculture: a minireview. **Advances in Plants & Agricultural Research**, Edmond, v. 6, n. 4, 2017. doi: 10.15406/apar.2017.06.00221.
27. Azubuike, C. C.; Chikere, C. B.; Okpokwasili, G. C. Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 32, p. 1–18, 2016.

28. Stępniewska, Z.; Kuñiar, A. Endophytic microorganisms - Promising applications in bioremediation of greenhouse gases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 97, p. 9589–9596, 2013.
29. Li, H. Y. et al. Endophytes and their role in phytoremediation. **Fungal Diversity**, Dordrecht, v. 54, p. 11–18, 2012.
30. Khan, Z.; Doty, S. Endophyte-assisted phytoremediation. **Current Topics in Plant Biology**, London, v. 12, p. 97–105, 2011.
31. Araújo, W. L. et al. **Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos**. Piracicaba: ESALQ, 2010.
32. Sambrook, J. F.; Russell, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
33. Shirling, E. B.; Gottlieb, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 16, 313–340 (1966).
34. Almeida, L. G. **Simbiontes de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae): potencial biotecnológico para biorremediação e implicações na metabolização de inseticidas pelo hospedeiro**. 2013. 105 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.
35. Company, B. D. and. **Pocedimentos de controle de qualidade - BBL Trypticase Soy Agar (L007516 • Rev. 11)**. Sparks, MD: Becton, Dickinson & Co, 2014.
36. Cardenas, E. et al. Microbial communities in contaminated sediments, associated with bioremediation of uranium to submicromolar levels. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 74, p. 3718–3729, 2008.
37. Rahal, A. G.; Moussa, L. A. Degradation of 2, 4, 6-Trinitrotoluene (TNT) by Soil Bacteria Isolated From TNT Contaminated Soil. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, Melbourne, v. 5, p. 8–17, 2011.
38. Boschin, G. et al. Biodegradation of Chlorsulfuron and Metsulfuron-Methyl by *Aspergillus niger* in Laboratory Conditions. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, New York, v. 38, p. 737–746, 2003.
39. Omer, C. A. et al. Genes for two herbicide-inducible cytochromes P-450 from *Streptomyces griseolus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 172, p. 3335–3345, 1990.

40. O'Keefe, D. P.; Romesser, J. A.; Leto, K. J. Identification of constitutive and herbicide inducible cytochromes P450 in *Streptomyces griseolus*. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. **149**, p. 406–412, 1988.
41. Romesser, J. A.; O'Keefe, D. P. Induction of cytochrome P-450-dependent sulfonylurea metabolism in *Streptomyces griseolus*. **Biochemistry and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 140, p. 650–659, 1986.
42. El-Sayed, O. H. et al. Bioremediation of zinc by *Streptomyces aureofaciens*. **Journal of Applied Science**, Chiang Rai, Thailand, v. 11, p. 873–877, 2011.
43. Sangale, M. K.; Shahnawaz, M.; Ade, A. B. A review on biodegradation of polythene: the microbial approach. **Journal of Bioremediation and Biodegradation**, Sunnyvale, v. 3, p. 9, 2012.
44. Govarthanan, M. et al. Bioremediation of heavy metals using an endophytic bacterium *Paenibacillus* sp. RM isolated from the roots of *Tridax procumbens*. **3 Biotech**, Heidelberg, v. 6, p. 1–7, 2016.
45. Gao, J. et al. *Pseudomonas hunanensis* sp. nov., isolated from soil subjected to long-term manganese pollution. **Current Microbiology**, New York, v. **69**, p. 19–24, 2014.
46. Li, S.; Wang, S.; Yan, W. Biodegradation of methyl tert-butyl ether by co-metabolism with a *Pseudomonas* sp. Strain. **International Journal of Environmental Research and Public Health** Basel, v. 13, p. 1–10, 2016.
47. Kirst, H. A. The spinosyn family of insecticides: Realizing the potential of natural products research. **Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 63, p. 101–111, 2010.
48. Alonso, A., Sánchez, P., Martínez, J. L. Environmental selection of antibiotic resistance genes. **Environmental Microbiology**, Madrid, v. 3, p. 1–9, 2001.
49. Singh, B. K.; Walker, A. Microbial degradation of organophosphorus compounds. **FEMS Microbiology Reviews**, Aberdeen, UK, v. 30, p. 428–471, 2006.

5. BIOPROSPECÇÃO DE COMPOSTOS DE ATIVIDADE INSETICIDA

Resumo

O controle de insetos praga em culturas de importância econômica é em sua maioria feito com inseticidas químicos. O uso indevido desses compostos pode levar a diversos problemas, como por exemplo a resistência dos insetos alvo aos inseticidas. Assim, a variedade de compostos com mecanismos de ação diversos é muito importante para esse mercado. Uma opção sustentável são os produtos naturais de origem microbiana, são substâncias estruturalmente diversas e apresentam grande variedade de modos de ação descritas. Microrganismos endofíticos habitam o interior de plantas sem causar doenças e são uma ótima fonte de substâncias entomotóxicas. A bioprospecção de novos bioinseticidas de origem endofítica foi o objetivo desse trabalho. Para isso os extratos de três fungos e 20 bactérias endofíticas foram ensaiados contra lagartas neonatas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), uma importante praga polífaga. Os extratos brutos que apresentaram atividade inseticida foram fracionados e para dois deles os compostos ativos foram identificados por espectrometria de massas (DI(ESI)-MS/MS). Oito extratos brutos apresentaram mortalidade acima de 90% em lagartas de primeiro instar. Em função dos promissores resultados, os extratos brutos foram usados em lagartas de terceiro instar, sendo que *Streptomyces griseolus* (LGM-CR-01 e LGM-CS-02) apresentaram atividade inseticida de 100%, para *Paenibacillus hunanensis* (IIL-ZM-IDP-09), *Microbacterium testaceum* (IIL-ZM-IDP-06) e *Bipolaris papendorfii* (IIL-ZM-IDP-22) a atividade observada foi superior à 80%. O composto responsável pela atividade inseticida de 55,6% em terceiro instar detectada para o extrato de *S. badius* (LGM-CR-02) é a valinomicina.

Palavras-chave: Microrganismos endofíticos; Bioinseticidas; Entomotóxico; Bioprospecção.

Abstract

Chemical insecticides are the most applied form of control in pest insects of crops with economic importance. Misuse of these compounds can lead to several problems, such as the resistance of insects to insecticides. Thus, the variety of compounds with diverse mechanisms of action is very important for this market. A sustainable option is natural products with microbial origin; they are structurally diverse substances and present a great variety of modes of action described. Endophytes are microorganisms that live inside plants without causing disease and are a great source of entomotoxic substances. The bioprospection of new bioinsecticides of endophytic origin was the objective of this work. For this, the extracts of three fungi and 20 endophytic bacteria were tested against newborn caterpillars of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), an important polyphagous pest. The crude extracts that showed insecticidal activity were fractionated and for two of them the active compounds were identified by mass spectrometry (DI (ESI) -MS / MS). Eight crude extracts presented mortality above 90% in first instar caterpillars. In light of the promising results, the crude extracts were tested on third instar caterpillars, *Streptomyces griseolus* (LGM-CR-01 and LGM-CS-02) showed 100% insecticidal activity, *Paenibacillus hunanensis* (IIL-ZM-IDP-09), *Microbacterium testaceum* (IIL-ZM-IDP-06) and *Bipolaris papendorfii* IIL-ZM-IDP-22) the had activity above 80%. The compound responsible for the insecticidal activity of *S. badius* extract (LGM-CR-02), with 55.6% in the third instar is valinomycin.

Keywords: Endophytes; Bioinseticidas; Entomotoxic; Bioprospecting.

5.1. Introdução

A busca da humanidade pela melhoria na qualidade de vida exige maior produção de alimentos e cuidados com o meio ambiente¹. Isso leva a procura de substâncias mais sustentáveis para aplicação em diferentes áreas. Essas substâncias podem ser novas na questão estrutural, ou seja inéditas e ainda não descritas, ou quanto a sua aplicação, quando já são conhecidas porém sem aplicação descrita na área de interesse. Nesse cenário, os microrganismos surgem como opção pela sua diversidade genética e metabólica, com a produção de grande variedade de substâncias com modos de ação diversos^{2,3}. Uma fonte microbiana de potenciais novos bioprodutos são os microrganismos endofíticos, microrganismos que habitam o interior de plantas sem causarem efeitos negativos³⁻⁵. Na interação entre eles e as plantas hospedeiras ocorre a troca de inúmeros metabólitos. Os compostos do metabolismo secundário dos microrganismos podem ser aplicados em diversas áreas como a agrícola, industrial, farmacológica e alimentícia. Esses compostos endofíticos variam de enzimas, fitormônios, antibióticos, compostos orgânicos voláteis (VOCs) até promotores de crescimento de plantas e compostos de defesa contra patógenos e herbívoros^{2,5-7}.

Os metabólitos endofíticos com atividade na defesa contra herbivoria tem grande apelo para a área agrícola. Esse interesse existe pois o uso indiscriminado de inseticidas causa constante pressão de seleção nas espécies pragas e leva à resistências^{8,9}, causando a necessidade de novos compostos inseticidas. Um exemplo de organismo nesse cenário é a lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)¹⁰, uma praga polífaga que ataca inúmeras espécies de importância econômica¹¹. Populações desse inseto desenvolveram resistência a plantas de milho Bt¹²⁻¹⁴, um tipo de milho geneticamente modificado com genes ligados a produção de toxinas da bactéria *Bacillus thuringiensis*¹⁵. Nesse cenário, os compostos inseticidas produzidos por microrganismos endofíticos são uma ótima opção para o controle de insetos praga, já que eles possuem uma grande diversidade genética e metabólica com substâncias apresentando variados mecanismos de ação².

Os bioinseticidas ainda representam uma porção pequena do mercado de inseticidas, mesmo com a identificação de inúmeros isolados endofíticos produtores de compostos com essa atividade. Os metabólitos produzidos por endófitos, tanto fungos como bactérias, são muito variados estruturalmente e em seu modo de ação.

Com registros de composto inseticidas como alcalóides esteróides, terpenóides, quinonas, flavonoides e fenilpropanóides¹⁶.

O primeiro registro de um fungo endofítico no controle de insetos é de 1981 com *Phomopsis oblonga* (*Diaporthe eres*) Nitschke (1870) (Diaporthales, Diaporthaceae) atuando no controle do besouro *Physocnemus brevilineum* Say (1824) (Coleoptera, Cerambycidae)². Alguns outros exemplos relatados de compostos endofíticos com atividade inseticida (Figura 5.1) são os ácidos nodulispóricos¹⁷, os alcaloides peramina e ergovalina¹⁸ e o inseticida rotenona¹⁹. Mas os compostos microbianos mais conhecidos e aplicados no controle de artrópodes são as espinosinas e avermectinas. As espinosinas são produzidas por *Saccharopolyspora spinosa* Mertz; Yao (1990) (Actinomycetales, Pseudonocardaceae), apresentam alta atividade nos organismos alvo e baixo efeito adverso ao meio ambiente^{20,21}. A combinação das espinosinas A e D leva nome de spinosad e é aplicado como inseticida na agricultura²⁰. Já as avermectinas são produzidas por *Streptomyces avermitilis* (Burg, 1979) Kim e Goodfellow (2002) (Actinomycetales, Streptomycetaceae) e sua atividade vermícida e inseticida^{20,22} é muito aplicadas na medicina veterinária²⁰.

As possíveis aplicações no controle biológico tem levado ao aumento do interesse pelas bactérias endofíticas⁵. A maior parte dos compostos inseticidas aplicados na agricultura produzidos por bactérias endofíticas são pertencentes a espécie *Bacillus thuringiensis* Berliner (1915) (Bacillales, Bacillaceae)²³. As proteínas Cry produzidas por essa bactéria são tóxicas à insetos e os genes responsáveis pela sua produção são usados largamente na modificação de plantas comerciais, assim como citato anteriormente²⁴.

Os bioinseticidas apresentam uma possibilidade eficiente, seletiva e segura¹. Levando em conta a diversidade dos microrganismos endofíticos, o objetivo foi identificar, isolar e caracterizar metabólitos secundários de endófitos com atividade inseticida.

Figura 5.1 - Estruturas das substâncias produzidas por microrganismos endofíticos;
 A) ácido nodulispórico, B) peramina, C) ergovalina, D) rotenona, E)
 espinosinas e F) avermectinas

5.2. Material e Métodos

5.2.1. Produção de extratos de microrganismos endofíticos para ensaios biológicos

Uma colônia, aleatoriamente selecionada, de cada endófito foi inoculada em 50 mL de meio líquido ISP2 (4 g de extrato de levedura, 4 g de dextrose e 10 g de malte, 1 litro de água deionizada, pH 7.3)²⁵ para a produção do pré-inóculo a ser utilizado na produção de extratos brutos orgânicos. Os microrganismos foram cultivados em condições controladas de temperatura (28°C) e agitação constante (120 rpm) durante 72 horas ou até atingir densidade ótica (OD) de 0,6 a 600 nm. O pré-inóculo dos fungos estudados foi produzido a partir da remoção de 1 cm² do meio de cultivo sólido contendo o fungo. O material coletado foi depositado diretamente em meio líquido BD (infusão de 200g de batata e 20g de dextrose para 1L de meio, pH 6,0)²⁶ e cultivado assim como descrito anteriormente. Posteriormente, uma alíquota de 100 µL do meio de cultivo do pré-inóculo de cada uma das bactérias e dos fungos foi inoculada em frascos de 300 mL contendo 100 mL do meio de cultivo (1/3 do volume do frasco) de acordo com o microrganismo a ser cultivado, sendo meio de cultivo ISP2 para bactérias e BD para os fungos, e foram mantidas nas condições de cultivo anteriormente descritas por um período de 7 dias.

Ao término do período de cultivo, as células foram removidas por centrifugação (3000 g por 5 minutos) ou filtradas à vácuo e o sobrenadante foi extraído utilizando acetato de etila como solvente extrator em extrações líquido-líquido. As amostras foram assim armazenadas a 4°C em frascos com proteção a luz, para uso futuro.

5.2.2. Atividade inseticida

5.2.2.1. Criação de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)

Os isolados de *S. frugiperda* utilizados foram disponibilizadas pelo Laboratório de Interações em Insetos, Departamento de Entomologia e Acarologia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), sob supervisão do professor Dr. Fernando Luís Cônsoli. A criação foi feita em dieta artificial à base de feijão, segundo Parra²⁷.

5.2.2.2. *Ensaios in vivo*

Foram conduzidos ensaios utilizando o método de ingestão, com tratamento superficial da dieta artificial com os extratos brutos orgânicos dos isolados endofíticos estudados. A dieta tratada foi oferecida inicialmente contra lagartas de primeiro ínstar e, em havendo atividade inseticida, também contra o terceiro ínstar de *S. frugiperda*. Esses ensaios foram conduzidos em placas para cultivo de células de 24 poços (Costar®, Cambridge, Massachusetts, EUA), em que cada poço da placa recebeu 1,25 mL de dieta artificial. Após a completa gelatinização da dieta, cada poço recebeu 20 µL do extrato diluído em metanol na concentração superficial de 260 µg/cm². Dietas tratadas exclusivamente com metanol foram utilizadas como controle negativo. Após o tratamento da dieta e a completa evaporação do solvente em capela de fluxo laminar, cada poço da placa foi inoculado com 10 lagartas neonatas. Os bioensaios com lagartas de terceiro instar foram realizados para os nove extratos brutos LGM-CR-01, LGM-CR-02, LGM-CS-01, LGM-CS-02, LGM-CS-03, LGM-CS-04, IIL-ZM-IDP-09, IIL-ZM-IDP-06, IIL-ZM-IDP-22 que apresentaram os melhores resultados no bioensaio com lagartas neonatas. As condições experimentais foram as mesmas descritas para o bioensaio com lagartas neonatas, porém cada poço foi inoculado com três lagartas de terceiro ínstar. Na sequência, as placas foram fechadas com filme plástico contendo pequenas perfurações para permitir a ventilação, sendo mantidas em condições controladas (25±1°C; 60±10% UR; fotofase = 14h) por 48 h, com avaliação diária da mortalidade. Para cada tratamento de extrato bruto foram testadas 240 lagartas de primeiro ínstar e 120 de terceiro ínstar, para os ensaios das frações foram usadas 60 lagartas. Em todos os ensaios cada poço da placa foi considerado como equivalente a uma repetição biológica. As lagartas que ao serem tocadas não responderam com movimentos foram consideradas mortas.

5.2.2.3. *Determinação de concentrações letais médias*

O bioensaio foi conduzido, segundo o procedimento experimental anteriormente descrito para os ensaios *in vivo* (5.2.2.3), com a aplicação do volume de 20 µL do bioensetecida endofítico, com concentrações finais de composto ativo iguais a 0,56; 1,0; 1,8; 3,2; 4,4; 5,6; 7,8; 10,0; 18,0 µg/mL em cada poço das placas para cultivo de células. O bioensaio de curva resposta foi realizado com a

valinomicina purificada. Para o controle negativo os poços receberam metanol. Após a aplicação dos extratos brutos, as placas foram mantidas em câmara de fluxo laminar para a secagem do solvente. Foram adicionadas três lagartas de terceiro ínstar em cada poço, sendo as placas mantidas em condições controladas ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$; $60\pm 10\%$ UR; fotofase = 14h) por 48 h para a avaliação da mortalidade. As lagartas que ao serem tocadas não responderam com movimentos foram consideradas mortas.

Com os dados de mortalidade, foi então determinada a curva resposta com análise de Probit através do programa R²⁸ com a adição das extensões ExpDes.pt²⁹ e ecotoxicology³⁰. O valor de concentração letal média (CL_{50}) foi estimado a partir dos resultados dessa análise.

5.2.3. Isolamento dos compostos ativos

Para o isolamento dos compostos com atividade inseticida foi utilizado o fracionamento guiado por bioensaio. Os extratos brutos que apresentaram atividade inseticida superior a 85% foram fracionados em coluna (25x2 cm) preenchidas com Sephadex LH20 e eluídas com metanol. Foram coletadas frações de 4 mL, sendo a fração inicial coletada logo após a adição do extrato bruto à coluna. A adição de metanol e coleta das frações continuou até a ausência de coloração na coluna ou qualquer mudança ao ser iluminada com lâmpada UV (254 e 365 nm). Após a última fração com presença de cor ser eluída, uma fração final de 50 mL foi coletada para garantir que a amostra aplicada tenha sido completamente eluída da coluna.

Todas as frações foram submetidas a cromatografia de camada delgada (TLC) para agrupamento das que apresentaram o mesmo perfil. A fase móvel empregada foi composta de hexano, acetato de etila e metanol, dependendo da polaridade dos compostos e determinada experimentalmente para cada uma das frações. A determinação dos perfis químicos foi feita por detecção espectroscópica dos compostos com lâmpada de UV com $\lambda = 254$ e 365 nm. Após a junção das frações semelhantes, elas foram analisadas em cromatografia líquida de altíssima eficiência (UHPLC - Ultra High Performance Liquid Chromatography) no cromatógrafo Accela 600 (Thermo Scientific), equipado com coluna ACE 5 (250 x 4,6 mm; 5 μm), comprimento de onda entre 200 – 800 nm, vazão de 600 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, e gradiente de eluição começando com 50% de fase C, aumentando para 95% em de 15 min, mantendo-se nessa condição por 5 min, retornando a condição inicial para

recondicionamento da coluna, com tempo total de análise de 30 minutos. As fases empregadas foram 0,1% de ácido fórmico (fase A) e acetonitrila (0,1% de ácido fórmico) (fase C).

Para o extrato do fungo LGM-SO-FTR-01, nas análises cromatográficas foi empregada a coluna ACE 5 (250 × 4.6 mm; 5 µm) com vazão de 500 µL.min⁻¹. O cromatógrafo líquido é equipado com arranjo de diodos que permitiu a varredura nos comprimentos de ondas de 200 – 800 nm. O método cromatográfico consistiu em gradiente de eluição inicial de 50% de B, aumentando para 60% de B em 2 min, mantendo-se nessa condição por 7 min, aumentando para 95% em 5 min e permanecendo nessa condição por 5 min, para finalmente retornar as condições iniciais de análise para recondicionamento da coluna, com tempo total de análise de 30 minutos. As fases empregadas foram 0,1% de ácido fórmico (fase A) e metanol (0,1% de ácido fórmico) (fase B).

Após avaliação de atividade inseticida em *S. frugiperda*, as frações ativas ainda não purificadas e, portanto, compostas por vários metabólitos foram re-purificadas para a determinação do composto responsável pela atividade biológica encontrada através do bioensaio. O refractionamento das frações ativas foi realizado em UHPLC Accela 600 (Thermo Scientific) equipado com coluna semi-preparativa ACE5 (250 × 7.75 mm, 5 µm), vazão de 1700 µL.min⁻¹ e usando como fase móvel 0,1% de ácido fórmico (fase A) e acetonitrila/0,1% de ácido fórmico (fase C). Para as purificações, as condições analíticas aplicadas foram ajustadas para a coluna semi-preparativa, sendo o gradiente de eluição o mesmo descrito anteriormente. Cada fração repurificada foi utilizada em ensaios de atividade inseticida e as frações que apresentaram a maior mortalidade nas lagartas e estavam puras seguiram para a identificação do composto ativo.

5.2.3.1. Identificação molecular dos compostos

O perfil químico de todas os extratos brutos e frações foram determinados por espectrometria de massas. O modo de injeção foi a inserção direta (ID(ESI)-MS) com o espectrômetro de massas operando nos modos positivo (ID-(ESI)/MS(+)) e negativo (ID-(ESI)/MS(-)). O espectrômetro de massas usado foi o Xevo™ TQ-S (Waters Corporation), acoplado ao sistema de cromatografia líquida Acquity™ Ultra High Performance Liquid Chromatography (UPLC™ - Waters) com detector de arranjo de diodos (DAD), amostrador automático (auto-sampler) e ionização por

electrospray. O espectrômetro de massas operou no intervalo de massas de m/z 50 a 1500 Da, voltagem do capilar de 3,3 kV; voltagem do spray de 60 V, temperatura da fonte de 120°C e temperatura de dessolvatação de 350°C; e fluxo do gás de colisão de 0,1 L.min⁻¹. As amostras foram injetadas via cromatógrafo líquido sem coluna, com vazão de 0,15 mL.min⁻¹ de (8:2) metanol/0,1% de ácido fórmico.

Para a determinação estrutural dos compostos ativos, foi empregado o experimento de dissociação induzida por colisão (do inglês *Collision induced dissociation* - CID) e as energias de colisão foram otimizadas (20 – 70V) e escolhida a que forneceu maior informação estrutural para cada composto analisado individualmente, sendo selecionada 70V para o composto ativo do isolado *Streptomyces badius* (LGM-CR-02) e 25V para o de *Paenibacillus hunanensis* (IIL-ZM-IDP-09).

Com as informações estruturais obtidas nas análises espectrométricas, foram realizadas buscas nos bancos de dados Dictionary of natural products (dnp.chemnetbase.com) e CAS (Chemical Abstract Service - www.cas.org/) para a identificação dos compostos.

As análises de espectrometria de massas foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas Aplicada aos Produtos Naturais, na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, coordenado pelo professor Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes.

5.3. Resultados

5.3.1. Atividade inseticida *in vivo*

Os extratos brutos da maioria dos isolados microbianos usados produziram metabólitos com atividade entomotóxica extremamente elevada à lagartas de primeiro ínstar de *S. frugiperda* (Tabela 5.1). Os extratos brutos mais ativos causaram 100% de mortalidade e foram produzidos pelos seis isolados de *Citrus* (LGM-CR-01, LGM-CS-01, LGM-CS-02, LGM-CR-02, LGM-CS-03, LGM-CS-04) e pelo isolado de milho IIL-ZM-IDP-06, putativamente identificado como *Microbacterium testaceum*. Os extratos brutos da bactéria *Paenibacillus hunanensis* (IIL-ZM-IDP-04) e do fungo *Bipolaris papendorffii* (IIL-ZM-IDP-22), também apresentaram mortalidade de 90% e 88,9%, respectivamente, em larvas de primeiro ínstar de *S. frugiperda*.

Tabela 5.1 - Mortalidade em lagartas de *Spodoptera frugiperda* de primeiro ínstar expostas aos extratos brutos de microrganismos endofíticos

Isolado	Identificação putativa (Similaridade %)	Mortalidade% ($\pm$ desvio padrão)
LGM-CR-01	<i>Streptomyces griseolus</i> (99,62%)	100%
LGM-CR-02	<i>Streptomyces badius</i> (99,92%)	100%
LGM-CS-01	<i>Streptomyces hydrogenans</i> (100%)	100%
LGM-CS-02	<i>Streptomyces griseolus</i> (99,43%)	100%
LGM-CS-03	<i>Streptomyces hydrogenans</i> (99,93%)	100%
LGM-CS-04	<i>Streptomyces badius</i> (99,93%)	100%
IIL-ZM-IDP-01	<i>Acidovorax wautersii</i> (97,97%)	43,33% ($\pm 1,08$)
IIL-ZM-IDP-02	<i>Pseudomonas hunanensis</i> (99,35%)	13,33% ($\pm 0,33$)
IIL-ZM-IDP-03	<i>Rhizobium larrymoorei</i> (99,85%)	11,67% ($\pm 0,17$)
IIL-ZM-IDP-05	<i>Chryseobacterium culicis</i> (99,93%)	20% ($\pm 0,70$)
IIL-ZM-IDP-06	<i>Microbacterium testaceum</i> (99,87%)	100%
IIL-ZM-IDP-08	<i>Acinetobacter johnsonii</i> (99,15%)	80,83% ($\pm 0,62$)
IIL-ZM-IDP-09	<i>Paenibacillus hunanensis</i> (98,93%)	90% ($\pm 0,40$)
IIL-ZM-IDP-12	<i>Sphingomonas sanguinis</i> (99,40%)	10% ($\pm 0,36$)
IIL-ZM-IDP-13	<i>Herbaspirillum aquaticum</i> (99,86%)	28,33% ($\pm 0,57$)
IIL-ZM-IDP-14	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> (99,14%)	6,67% ($\pm 0,33$)
IIL-ZM-IDP-15	<i>Pedobacter suwonensis</i> (99,85%)	43,33% ($\pm 0,67$)
IIL-ZM-IDP-17	<i>Bacillus aryabhatai</i> (100%)	65,83% ($\pm 0,70$)
IIL-ZM-IDP-18	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i> (99,71%)	13,33% ($\pm 0,21$)
IIL-ZM-IDP-21	<i>Curvularia lunata</i> (99%)	8,33% ($\pm 0,34$)
IIL-ZM-IDP-22	<i>Bipolaris papendorfii</i> (100%)	88,89% ($\pm 0,40$)
IIL-ZM-IDP-23	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> (98,35%)	25,83% ($\pm 0,57$)
LGM-SO-FTR-01	<i>Sarocladium implicatum</i> (99%)	60% ($\pm 0,14$)

Ao contrário do que foi observado nos bioensaios com lagartas de primeiro ínstar, as mortalidades causadas pelos extratos brutos de isolados de mesmo filotipo foram bastante variadas (Tabela 5.2). Em lagartas de terceiro ínstar os dois isolados de *S. hydrogenans*, que haviam causado 100% de mortalidade a lagartas de primeiro ínstar, apresentaram atividades entomotóxicas diferentes, causando 2,8% (LGM-CS-03) e 33,3% (LGM-CS-01) de mortalidade (Tabela 5.2). Já os isolados de *S. badius* apresentaram toxicidade bem próxima entre si, provocando entre 44,4% (LGM-CR-02) e 50,0% (LGM-CS-04) de mortalidade. Os isolados LGM-CS-01 e LGM-CS-02, ambos identificados putativamente como *S. griseolus*, foram os únicos isolados a manter a mesma atividade entomotóxica a lagartas de terceiro

ínstar, causando 100% de mortalidade (Tabela 5.2). As bactérias *Microbacterium testaceum* (IIL-ZM-IDP-06) e *Paenibacillus hunanensis* (IIL-ZM-IDP-09) e o fungo *Bipolaris papendorfii* (IIL-ZM-IDP-22), causaram mortalidade às lagartas de terceiro ínstar muito próxima àquela observada para lagartas de primeiro ínstar (Tabelas 5.1 e 5.2).

Tabela 5.2 - Mortalidade observada em lagartas de *Spodoptera frugiperda* de terceiro ínstar expostas aos extratos brutos de microrganismos endofíticos

Isolado	Organismo mais próximo	Mortalidade% ($\pm$ desvio padrão)
LGM-CR-01	<i>Streptomyces griseolus</i>	100%
LGM-CR-02	<i>Streptomyces badius</i>	44,4% ($\pm 0,18$)
LGM-CS-01	<i>Streptomyces hydrogenans</i>	33,3% ($\pm 0,25$)
LGM-CS-02	<i>Streptomyces griseolus</i>	100%
LGM-CS-03	<i>Streptomyces hydrogenans</i>	2,8% ($\pm 0,08$)
LGM-CS-04	<i>Streptomyces badius</i>	50% ($\pm 0,23$)
IIL-ZM-IDP-09	<i>Paenibacillus hunanensis</i>	83,3% ($\pm 0,14$)
IIL-ZM-IDP-06	<i>Microbacterium testaceum</i>	94,4% ($\pm 0,11$)
IIL-ZM-IDP-22	<i>Bipolaris papendorfii</i>	85,8% ($\pm 0,11$)

Os extratos brutos que causaram alta mortalidade a lagartas de terceiro ínstar foram selecionados para fracionamento e condução de bioensaio direcionado por atividade para o isolamento e caracterização da(s) molécula(s) inseticida(s) ativa(s). Assim, foram submetidos ao fracionamento e ensaio os extratos dos isolados as bactérias LGM-CR-01, LGM-CR-02, LGM-CS-02, IIL-ZM-IDP-06 e IIL-ZM-IDP-09, e os fungos IIL-ZM-IDP-22 e LGM-SO-FTR-01. Para alguns dos extratos brutos selecionados, as frações ativas obtidas resultaram em efeito entomotóxico similar àquele obtido pelo extrato bruto (Tabela 5.3). As amostras em que as frações tiveram o maior efeito tóxico (Tabela 5.5) seguiram para o refracionamento e isolamento dos metabólitos.

Tabela 5.3 - Identificação da fração ativa dos isolados endofíticos e suas respectivas mortalidades em lagartas de *S. frugiperda*

Isolado	Organismo mais próximo	Fração ativa	Mortalidade% (± desvio padrão)
LGM-CR-01	<i>Streptomyces griseolus</i>	F-04	61,1% (±0,27)
LGM-CS-02	<i>Streptomyces griseolus</i>	F-03	94,4% (±0,11)
LGM-CR-02	<i>Streptomyces badius</i>	F-02	55,6% (±0,33)
IIL-ZM-IDP-09	<i>Paenibacillus hunanensis</i>	F-06	100%
IIL-ZM-IDP-06	<i>Microbacterium testaceum</i>	F-07	8,3% (±0,17)
IIL-ZM-IDP-22	<i>Bipolaris papendorfii</i>	F-04	83,3% (±0,21)
LGM-SO-FTR-01	<i>Sarocladium implicatum</i>	F-03	21,7% (±1,17)

O refracionamento das frações ativas (Tabela 5.4) da bactéria identificada putativamente como *S. griseolus* (LGM-CR-01) não permitiu a identificação do composto ativo. Já para o isolado LGM-CS-02, a subfração 25 apresentou 72% de atividade entomotóxica nas lagartas de *S. frugiperda*. Valores menores foram encontrados para as subfrações de *P. hunanensis* (IIL-ZM-IDP-09) e do fungo *B. papendorfii* (IIL-ZM-IDP-22). Foi verificado que a fração ativa do isolado LGM-CR-02 é formada por apenas um composto e por isso não exigiu refracionamento (Figura 5.2).

Tabela 5.4 - Identificação das frações ativas dos endofíticos e suas respectivas mortalidades em lagartas de *S. frugiperda* de terceiro ínstar

Isolado	Organismo mais próximo	Subfração ativa	Mortalidade% (± desvio padrão)
LGM-CR-01	<i>Streptomyces griseolus</i>	-	0%
LGM-CS-02	<i>Streptomyces griseolus</i>	F-03 (25)	72% (±0,31)
LGM-CR-02	<i>Streptomyces badius</i>	Não re-fracionada	
IIL-ZM-IDP-09	<i>Paenibacillus hunanensis</i>	F-06 (8)	44% (±0,49)
IIL-ZM-IDP-22	<i>Bipolaris papendorfii</i>	F-04 (7)	22% (±0,33)

Figura 5.2 - Cromatograma (LC-UV) da fração ativa(F-02) do isolado LGM-CR-02 (*Streptomyces badius*) no comprimento de onda de 273 nm

As análises dos extratos brutos e das frações por cromatografia líquida e espectrometria de massas demonstraram a complexidade do perfil de metabólitos. Os compostos ativos da amostra do isolado *S. griseolus* (LGM-CS-02) apresentaram tempo de retenção entre 24 e 25 minutos (Figura 5.3) e o perfil espectrométrico (Figura 5.4) da fração purificada demonstra a presença de mais de um composto. Para o fungo *Bipolaris papendorfii* (IIL-ZM-IDP-22), a fração ativa foi isolada no tempo de retenção entre 9 e 11 minutos (Figura 5.5) e seu espectro de massas também apresenta alta complexidade (Figura 5.6). Análise de LC-UV da fração ativa (F-02) do isolado *S. badius* (LGM-CR-02), como citado anteriormente, indicou a presença de um único composto com tempo de retenção entre 20 e 22 min (Figura 5.2). Já para a bactéria *Paenibacillus hunanensis* (IIL-ZM-IDP-09), a fração ativa apresenta tempo de retenção entre 10 e 10:30 min (Figura 5.7) e seu o espectro de massas exibe mais de um composto (Figura 5.8), enquanto a sua subfração (F-06 (8)) apresentou um único composto.

Figura 5.3 - Cromatograma (LC-UV) da fração ativa (F-03) *S. griseolus* (LGM-CS-02) com saída do composto ativo entre 24 e 25 minutos, no comprimento de onda de 288 nm

Figura 5.4 - Espectro de massas MS-MS por inserção direta (ID) da fração ativa (F-03) da bactéria *S. griseolus* (LGM-CS-02); a) ESI+(positivo) e b) ESI- (negativo)

Figura 5.5 - Cromatograma (LC-UV) da fração ativa (F-06) do fungo *Bipolaris papendorfii* (IIL-ZM-IDP-22) no comprimento de onda de 288 nm. Com saída do ativo F-06(8) entre 9 e 11 minutos de corrida

Figura 5.6 - Espectro de massas MS-MS por inserção direta (ID) da fração ativa F-06(8) do fungo *Bipolaris papendorfii* (IIL-ZM-IDP-22); a) ESI+(positivo) e b) ESI-(negativo)

Figura 5.7 - Cromatograma (LC-UV) da fração ativa (F-04) da bactéria *Paenibacillus hunanensis* (IIL-ZM-IDP-09) no comprimento de onda de 288 nm, com saída do ativo F-04(7) ente 10 e 10:30 minutos de corrida

Figura 5.8 - Espectro de massas MS-MS por inserção direta (ID) da fração ativa F-04(7) da bactéria *Paenibacillus hunanensis* (IIL-ZM-IDP-09); a) ESI+(positivo) e b) ESI- (negativo)

Tabela 5.5 - Mortalidade de lagartas de *S. frugiperda* expostas as diferentes frações dos microrganismos endofíticos

Isolado	LGM-CR-01 <i>S. griseolus</i>	LGM-CR-02 <i>S. badius</i>	LGM-CS-02 <i>S. griseolus</i>	IIL-ZM-IDP-09 <i>P. hunanensis</i>	IIL-ZM-IDP-06 <i>M. testaceum</i>	IIL-ZM-IDP-22 <i>B. papendorffii</i>	LGM-SO-FTR-01 <i>S. implicatum</i>
Fração 01	0	0	55,6 ±0,33	0	0	0	6,7 ±0,35
Fração 02	0	55,6 ±0,33	72,2 ±0,27	0	0	0	5,8 ±0,15
Fração 03	47,2 ±0,28	8,3 ±0,13	94,4 ±0,12	0	0	0	21,7 ±1,17
Fração 04	61,1 ±0,27	8,3 ±0,25	22,2 ±0,23	0	0	83,3 ±0,21	13,3 ±0,72
Fração 05	0	0	2,8 ±0,08	91,7 ±0,17	0	41,7 ±0,30	2,5 ±0,18
Fração 06		2,8 ±0,08	8,3 ±0,25	100	0	0	4,2 ±0,19
Fração 07		16,7 ±0,26	0	33,3 ±0,33	8,3 ±0,17	0	
Fração 08		5,6 ±0,11	0	0	0	0	
Fração 09				8,3 ±0,17	0	0	
Fração 10				0	8,3 ±0,17	0	
Fração 11						0	

A fração (F-02) do isolado LGM-CR-02 foi analisada por massas (Figura 5.9), onde são observados os adutos, m/z 1112 $[M+H]^+$, m/z 1084 $[M-CO+H]^+$, m/z 1128 $[M+NH_4]^+$, m/z 1150 $[M+K]^+$ e o íon mais intenso m/z 1134 $[M+Na]^+$. Para a realização dos experimentos de MS/MS foi selecionado o íon de maior intensidade (Figura 5.10), que foi sujeito a diversas energias de colisão (45, 50, 55, 60, 65 e 70 eV). Foi selecionada a carga mais apropriada (65 eV) para gerar fragmentos, buscando evitar a perda de informações sobre o íon molecular. Através do padrão de fragmentação dos adutos (m/z 1084, m/z 1106, m/z 1112, m/z 1120, m/z 1134, m/z 1152 e m/z 1168), as informações estruturais da molécula foram comparadas à literatura, levando a identificação da valinomicina como composto ativo (Figura 5.11).

Figura 5.9 - Espectro de massas ESI+ MS-MS do composto ativo da bactéria LGM-CR-02 (*Streptomyces badius*), na carga de 65eV

Figura 5.10 - Espectro de massas ESI+ CID (dissociação induzida por colisão) do íon m/z 1134 do composto ativo da bactéria LGM-CR-02 (*Streptomyces badius*). Nas cargas 45eV (a), 50eV (b), 55eV (c), 60eV (d), 65eV (e) e 70eV (f)

Figura 5.11 - Estrutura do metabólito valinomicina produzido pela bactéria LGM-CR-02 (*S. badius*)

A análise de massas da subfração f-06 (8) do isolado IIL-ZM-IDP-09 (Figura 5.13) apresentou apenas um sinal de m/z 194 (ESI+). Diversas energias de colisão foram avaliadas nos experimentos de MS/MS para o íon m/z 194 (Figura 5.12) (15, 20, 25, 30, 35 e 40 eV), sendo selecionada a energia de colisão de 25 eV como a mais apropriada para a geração dos fragmentos e informação estrutural. Nos experimentos de CID para o íon de m/z 194 foram observados os sinais de m/z 108, m/z 120 (majoritário), m/z 134, m/z 146 m/z 160, m/z 176 e m/z 194.

Figura 5.12 - Espectro de massas ESI+ CID (dissociação induzida por colisão) do íon m/z 194 do composto ativo da bactéria IIL-ZM-IDP-09 (*Paenibacillus hunanensis*). Nas cargas 15eV (a), 20eV (b), 25eV (c) 30eV (d), 35eV (e) e 40eV (f)

Figura 5.13 - Espectro de massas ESI+ MS-MS do íon m/z 194 da subfração ativa (F-04(7)) da bactéria IIL-ZM-IDP-09 (*Paenibacillus hunanensis*), na carga de 25 eV

Observou-se um padrão de fragmentação semelhante ao da pirazina³¹ (Figura 5.15), porém os dados espectrométricos ainda não são definitivos para a confirmação estrutural, sendo fundamental novos experimentos para a identificação do composto. A fórmula molecular do composto é $C_{11}H_{18}N_2O$. O perfil de fragmentação apresenta a perda de 18 Da correspondente à perda de H_2O , o que indica a hidroxilação da molécula. Além disso, o padrão de fragmentação observado seguiria o mecanismo radicalar, incomum em análises de espectrometria de massas consideradas brandas, porém justificável pela densidade eletrônica das pirazinas. O fragmento de m/z 79 corresponde ao anel da pirazina protonado e após a perda de todos os substituintes. Porém, as demais informações sobre os substituintes e as suas posições no anel não podem ser confirmadas.

5.3.2. Determinação da curva resposta à valinomicina

O valor de dose letal média (CL_{50}) foi obtido através de análise de probit (tabela 5.6) estimada em 4,38 $\mu g/mL$, com o coeficiente angular de 2,02 e erro padrão de $\pm 0,12$, o Qui-quadrado (χ^2) foi de 1,38 com 6 graus de liberdade.

Tabela 5.6 - Valores da análise probit para determinação de dose letal média, onde:
 1. Número de indivíduos testados; 2. Erro padrão da média; 3. Dose letal 50 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) intervalo de confiança a 95%; 4. Dose letal 90 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) intervalo de confiança a 95%; 5. Qui-quadrado calculado e grau de liberdade; 6. Probabilidade de significância

Amostra	n ¹	Coefficiente angular ($\pm\text{EMP}$) ²	CL ₅₀ (IC95%) ³	CL ₉₀ (IC95%) ⁴	χ^2 (g.l.) ⁵	p-valor ⁶
Valinomicina	36	2,02 $\pm$ 0,12	4,38 (3,43 – 5,52)	18,83 (12,94 – 35,75)	1,38 (6)	0,0334

A partir dos valores de mortalidade nas diferentes concentrações foi feita a curva resposta das lagartas de *Spodoptera frugiperda* de terceiro ínstar para a valinomicina (Figura 5.14).

Figura 5.14 - Curva resposta de lagartas de *Spodoptera frugiperda* de terceiro ínstar à valinomicina

5.4. Discussão

De um total de 23 endofíticos analisados, 12 isolados apresentaram atividade inseticida com mortalidade superior a 50% em lagartas de *S. frugiperda* de primeiro ínstar e cinco isolados em lagartas de terceiro ínstar. Todos esses extratos brutos apresentam compostos potencialmente inseticidas.

Assim como comentado no terceiro capítulo foi observado que mesmo quando a identificação genética putativa entre isolado é a mesma, os metabólitos produzidos por eles podem divergir. Isso ocorreu com os isolados de *S. hydrogenans*, onde os extratos brutos de LGM-CS-03 causaram uma atividade de 2,8% enquanto os extratos brutos de LGM-CS-01 causaram mortalidade de 33,3%. Isso evidencia todo o potencial a ser explorado nos microrganismos endofíticos. É prática comum em laboratórios de microbiologia o agrupamento de isolados após a identificação putativa por 16S RNA. Isso, porém, deve ser contestado. Os resultados evidenciam que as identificações moleculares induzem ao agrupamento isolados com potenciais químicos diversificados.

Observando os estratos brutos desses dois isolados (LGM-CS-01 e LGM-CS-03) também podemos verificar que existe diferenciação entre as atividades apenas nos ensaios em terceiro ínstar. Já que para as lagartas de primeiro ínstar a atividade foi de 100% para os dois extratos, isso pode indicar que os compostos que causam a atividade nos dois ínstaes não são os mesmos e/ou que o isolado LGM-CS-01 produz o composto ativo em terceiro ínstar em maior concentração.

Foi possível identificar o composto ativo produzido pela bactéria endofítica *Streptomyces badius* (LGM-CR-02). O composto, identificado como valinomicina, é um peptídeo antibiótico que é produzido pelo gênero *Streptomyces*³²⁻³⁴, já foi relatado nas espécies *S. griseus*³⁴, *S. fulvissimus*³⁵, *S. roseochromogenes*³⁶, *S. lividans* e *S. coelicolor*³⁷. E teve o gene (ATCC 15141) responsável pela sua produção identificado em *S. tsusimaensis*³⁸. A valinomicina é ciclododecadepsipeptídeo (C₅₄H₉₀N₆O₁₈) que apresenta um anel de 36 membros, composto alternadamente por *L*-valina, ácido *D*-alfa-hidroxisovalérico, *D*-valina e ácido *L*-lático. É classificada como um ionóforo, um agente químico que causa o aumento da permeabilidade de membranas lipídicas a íons específicos, aumentando a permeabilidade da membrana a íons de potássio (K)^{34,35}. Sua atividade antibiótica está relacionada à ação desacoplante, que leva ao colapso do gradiente de prótons das membranas³⁹. Este modo de ação leva à diminuição do rendimento de ATP,

aumento no consumo de O₂, liberação de calor e alteração de pH⁴⁰. As atividades atribuídas a valinomicina são diversas, apresentando efeito acaricida, inseticida, nematocida³⁶, fungicida³², é utilizada na medição instrumental de íons de potássio na biomedicina³⁷ e também é aplicada na saúde humana, como um antibiótico potente contra Coronavírus (CoV) causador da síndrome respiratória aguda grave (SARS)³³.

Existem relatos da ação inseticida da valinomicina que sustentam a atividade biológica encontrada para este composto neste trabalho. Esse entomotóxico causou a acidificação do intestino e levou a morte de 4 das 11 lagartas de *Spodoptera litura* Fabricius (Noctuidae: Lepidoptera) que receberam 1mM da substância na alimentação⁴¹. Lagartas de *Bombyx mori* de quinto ínstar, que também receberam valinomicina (5 µg) pela alimentação, apresentaram após 90-180 minutos paralisia e alteração no pH (6,8 - 8,0) da hemolinfa⁴². Mosquito *Aedes aegyptii* (Rockefeller) que receberam a valinomicina produzida por *S. griseus* var. *flexipertum* na água em que se desenvolviam tiveram a mortalidade média (CL₅₀) com 2-3 µg/mL para larvas de terceiro e quarto ínstar; já em pulgões rajados (*Tetranychus urticae*), a CL₅₀ foi de 3 ppm e para larvas do besouro do feijão mexicano (*Epilachna varivestis*) foi necessária a concentração de 35 ppm de valinomicina³⁶. O fermentado dessa cepa de *S. griseus* var. *flexipertum* com na concentração celular de 10⁻³ – 10⁻⁴ causou mortalidade (CL₅₀) de larvas de *A. aegyptii*³⁶. Quando injetada, a valinomicina possui CL₅₀ em moscas (*Musca domestica*) de 1,18 – 1,5 µg/g (valinomicina/peso corpóreo), em baratas (*Periplaneta americana*) de 0,25 – 0,5 µg/g e em ratos (*Mus musculus*) é de 37 µg/g. Não apresentou nenhum efeito quando feita aplicação tópica em moscas⁴³. Apesar das metodologias e organismos modelo serem diferentes nos estudos citados é possível notar um padrão, onde observa-se efeito tóxico da valinomicina por ingestão. A atividade por ingestão sustenta a possibilidade da valinomicina atuar nas membranas do sistema digestivo dos insetos, alterando a passagem de íons pelas membranas, modificando o pH do organismo e levando a um colapso.

Mesmo não sendo possível a identificação completa do composto ativo de *Paenibacillus hunanensis* (IIL-ZM-IDP-09) como sendo uma pirazina, existem fortes indícios. O gênero *Paenibacillus* apresenta espécies (*P. polymyxa*³¹) produtoras de pirazinas, inclusive espécies endofíticas, que através de compostos orgânicos voláteis (VOCs), apresentaram potenciais bioativos para controle biológico⁴⁴.

Pirazinas possuem nitrogênio e uma estrutura heterocíclica⁴⁵, que pode conter quatro tipos de ligações: hidrogênio, alquil, metoxilo ou hidroxila³¹ e atuar como um bloco de construção de polímeros⁴⁶. São moléculas comuns e encontradas em diversos ambientes. Podem ser produzidas através de reações químicas ou são formadas naturalmente⁴⁵. São compostos relacionados a alimentos pois estão presentes naturalmente em vegetais⁴⁷, além de serem produzidas quimicamente em alimentos processados, apresentam odores de interesse para aplicação em diversos produtos alimentícios^{31,48,49}. Também são produzidas por insetos tóxicos como um sinal de alerta⁵⁰⁻⁵² e por microrganismos⁴⁵, podendo apresentar atividade quimioprotetora⁵³ e bactericida⁵⁴.

As pirazinas produzida por *P. polymyxa*³¹, apresentaram a sequência dos íons m/z 108, m/z 121, m/z 136, m/z 149, m/z 164, m/z 178 e m/z 192 em análise por espectrometria de massas por introdução via membrana (MIMS) e cromatografia gasosa (GC/MS). Enquanto o composto que propomos ser pirazina apresentou m/z 108, m/z 120, m/z 134, m/z 147, m/z 161, m/z 176 e m/z 194, em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC/MS). A diferença observada nos sinais de m/z deve-se aos diferentes analisadores de massas empregados nas análises. Duas tentativas de análise da fração ativa por GC-MS foram executadas sem sucesso devido à baixa concentração do composto nas amostras. Sendo assim, novas fermentações e isolamento serão realizados para a obtenção de amostras mais concentradas para novas análises por espectrometria de massas com analisador por impacto de elétrons e análises de ressonância magnética nuclear, para a confirmação dos substituintes e de suas posições no anel.

5.5. Conclusão

Microrganismos endofíticos são uma boa fonte de compostos com atividade inseticida, apresentando metabólitos secundários que causam alta mortalidade na lepidóptera *Spodoptera frugiperda*;

A valinomicina, produzida pela linhagem LGM-CR-02 de *S. badius*, que apresenta alta ação inseticida (CL_{50} 4,38 $\mu\text{g/mL}$) por ingestão em *S. frugiperda* de terceiro instar;

Sugerimos que a bactéria endofítica de milho *Paenibacillus hunanensis* (IIL-ZM-IDP-09) produz o composto com atividade inseticida (83,3% $\pm$ 0,14) com perfil de fragmentação (MS/MS) semelhante ao da pirazina;

Os compostos não identificados dos isolados de *S. griseolus* (LGM-CS-02) e *Bipolaris papendorffii* (IIL-ZM-IDP-22) possuem alta atividade inseticida e são de grande interesse para estudos futuros.

Referências

1. Strobel, G. D. B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural product. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v. 67, p. 491–402, 2003.
2. Azevedo, J. L.; Maccheroni Junior, W.; Pereira, J. O.; de Araújo, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Eletronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 3, 2000. <http://www.ejb.org/content/vol3/issue1/full/4>.
3. Melo, I. S.; Azevedo, J. L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998.
4. Araújo, J. M. de; Silva, A. C. da; Azevedo, J. L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 43, 2000. doi: 10.1590/S1516-89132000000400016
5. Eljounaidi, K.; Lee, S. K.; Bae, H. Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases – Review and future prospects. **Biological Control**, Atlanta, v. 103, p. 62–68, 2016.
6. Müller, C. A.; Obermeier, M. M.; Berg, G. Bioprospecting plant-associated microbiomes. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 235, p. 171–180, 2016.
7. Stępniewska, Z.; Kuźniar, A. Endophytic microorganisms - Promising applications in bioremediation of greenhouse gases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 97, p. 9589–9596, 2013.
8. Li, G. et al. Frequency of Cry1F non-recessive resistance alleles in North Carolina field populations of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **PLoS One**, San Francisco, v. 11, p. 1–14, 2016.
9. Storer, N. P. et al. Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: Lessons from Puerto Rico. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 110, p. 294–300, 2012.
10. Gallo, D. et al. Pragas das plantas e seu controle. In: _____. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. p. 839–845.

11. Barros, E. M.; Torres, J. B.; Bueno, A. F. Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 39, p. 996–1001, 2010.
12. Farias, J. R. et al. Dominance of Cry1F resistance in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) on TC1507 Bt maize in Brazil. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 72, p. 974–979, 2016.
13. Omoto, C. et al. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 72, p. 1727–1736, 2016.
14. Santos-Amaya, O. F. et al. Genetic basis of Cry1F resistance in two Brazilian populations of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Crop Protection**, Guildford, v. 81, p. 154–162, 2016.
15. Aldemita, R. R. et al. Trends in global approvals of biotech crops (1992-2014). **GM Crops & Food**, Austin, v. 6, p. 150–166, 2015.
16. Tan, R. X.; Zou, W. X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. **Natural Product Reports**, London, v. 18, p. 448–459, 2001.
17. Meinke, P. T.; Smith, M. M.; Shoop, W. L. Nodulisporic acid: its chemistry and biology. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 2, p. 655–674, 2002.
18. Siegel, M. R. et al. Fungal endophyte-infected grasses: Alkaloid accumulation and aphid response. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 16, p. 3301–3315, 1990.
19. Hu, M. Y. et al. Insecticidal activities of secondary metabolites of endophytic *Penicillium* sp. in *Derris elliptica* Benth. **Journal of Applied Entomology**, Berlin, v. 129, p. 413–417 (2005).
20. Kirst, H. A. The spinosyn family of insecticides: Realizing the potential of natural products research. **Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 63, p. 101–111, 2010.
21. Petroski, R. J.; Stanley, D. W. Natural compounds for pest and weed control. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 57, p. 8171–8179, 2009.
22. Burg, R. W. et al. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 15, p. 361–367, 1979.
23. Gonzalez, F. et al. New opportunities for the integration of microorganisms into biological pest control systems in greenhouse crops. **Journal of Pest Science**, Heidelberg, v. 89, p. 295–311, 2016.

24. International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications. **Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops**: 2016. Ithaca, NY: ISAAA, 2016. (ISAAA Briefs, 52).
25. Shirling, E. B. & Gottlieb, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. **16**, 313–340 (1966).
26. Araújo, W. L. et al. **Guia prático**: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos. Piracicaba: ESALQ, 2010.
27. Parra, J. R. P. Criação de insetos para estudos com patógenos. In: Alves, S. B. (Ed.). **Controle microbiano de insetos**. Piracicaba: FEALQ; 1986. p. 348–373.
28. R Core Team. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, 2014.
29. Ferreira, E. B.; Cavalcanti, P. P.; Nogueira, D. A. **ExpDes.pt**: experimental design package. Jaboticabal, 2013.
30. Gama, J. **Ecotoxicology**: methods for ecotoxicology. Brussels: ECETOC, 2015.
31. Beck, H. C.; Hansen, A. M.; Lauritsen, F. R. Novel pyrazine metabolites found in polymyxin biosynthesis by *Paenibacillus polymyxa*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 220, p. 67–73, 2003.
32. Park, C. N. et al. Antifungal activity of valinomycin, a peptide antibiotic produced by *Streptomyces* sp. Strain M10 antagonistic to *Botrytis cinerea*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. **18**, p. 880–884, 2008.
33. Alvin, A.; Miller, K. I.; Neilan, B. A. Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. **Microbiology Research**, Pavia, v. 169, p. 483–495, 2014.
34. Lee, D. W.; Kim, B. S. Antimicrobial cyclic peptides for plant disease control. **Plant Pathology Journal**, Faisalabad, v. 31, p. 1–1, 2015.
35. Tosteson, D. C. et al. The effect of valinomycin on potassium and sodium permeability of HK and LK sheep red cells. **Journal of General Physiology**, New York, v. 50, p. 2513–2525, 1967.
36. Heisey, R. M. et al. Production of Valinomycin, an Insecticidal Antibiotic, by *Streptomyces griseus* var. *flexipertum* var. nov. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 36, p. 1283–1286, 1988.
37. Perkins, J. B. et al. Streptomyces genes involved in biosynthesis of the peptide antibiotic valinomycin. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 172, p. 3108–3116, 1990.

38. Cheng, Y. Q. Deciphering the biosynthetic codes for the potent anti-SARS-CoV cyclodepsipeptide valinomycin in *Streptomyces tsusimaensis* ATCC 15141. **ChemBioChem**, Weinheim, v. 7, p. 471–477, 2006.
39. CHANG, R. Membranas biológicas. In: _____. **Físico-química: para as ciências químicas e biológicas**. Porto Alegre: AMGH, 2010. 289 p.
40. NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2014.
41. Skibbe, U. et al. Visualization of pH gradients in the larval midgut of *Spodoptera litura* using ³¹P-NMR microscopy. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v. 42, p. 777–790, 1996.
42. Angus, T. A. Similarity of effect of *Valinomycin* and *Bacillus thuringiensis* parasporal protein in *Larvae* of *Bombyx mori*. **Journal of Insect Pathology**, New York, v. 11, p. 145-146, 1968.
43. Pansa, M. C.; Natalizi, G. M.; Bettini, S. Toxicity of valinomycin on insects. **Journal of Invertebrate Pathology**, New York, v. 22, p. 148–152, 1973.
44. Rybakova, D. et al. Endophytes-assisted biocontrol: novel insights in ecology and the mode of action of *Paenibacillus*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 405, p. 125–140, 2016.
45. Kempler, G. M. Production of flavor compounds by microorganisms. **Advances in Applied Microbiology**, New York, v. 29, p. 29–51, 1983.
46. Gao, B. et al. Pyrazine-containing acene-type molecular ribbons with up to 16 rectilinearly arranged fused aromatic rings. **Journal of the American Chemical Society**, Washington, DC, v. 130, p. 8297–8306, 2008.
47. Teranishi, R.; Buttery, R. G.; Guadagni, D. G. Odor quality and chemical structure in fruit and vegetable flavors. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 237, p. 209–216, 1974.
48. Lojzova, L. et al. Alternative GC-MS approaches in the analysis of substituted pyrazines and other volatile aromatic compounds formed during Maillard reaction in potato chips. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 641, p. 101–109, 2009.
49. Vandamme, E. J.; Soetaert, W. Bioflavours and fragrances via fermentation and biocatalysis. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 77, p. 1323–1332, 2002.
50. Rothschild, M.; Moore, B. P.; Brown, W. V. Pyrazines as warning odour components in the Monarch butterfly, *Danaus plexippus*, and in moths of the genera *Zygaena* and *Amata* (Lepidoptera). **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v. 23, p. 375–380, 1984.

51. Jetz, W. Non-warning odors trigger innate color aversions--as long as they are novel. **Behavioral Ecology**, New York, v. 12, p. 134–139, 2001.
52. Lindström, L.; Rowe, C.; Guilford, T. Pyrazine odour makes visually conspicuous prey aversive. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences** London, v. 268, p. 159–162, 2001.
53. Kim, N. D., Kwak, M. K.; Kim, S. G. Inhibition of Cytochrome P450 2E1 Expression by 2-(Allylthio) pyrazine, a Potential Chemoprotective Agent: Hepatoprotective Effects. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 53, p. 261–269, 1997.
54. Seitz, L. E.; Suling, W. J.; Reynolds, R. C. Synthesis and Antimycobacterial Activity of Pyrazine and Quinoxaline Derivatives. **Journal of Medical Chemistry**, Washington, DC, v. 45, p. 5604–5606, 2002.

6. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Endofíticos são uma ótima fonte de microrganismos para bioprospecção, apresentam grande diversidade genética e metabólica. A identificação genética não está diretamente relacionada a produção de metabólitos, podendo existir microrganismos de mesma identificação putativa com metabólitos divergentes.

Na biorremediação de inseticidas, as bactérias endofíticas confirmaram o seu potencial ao tolerarem e crescerem em meios com os inseticidas como única fonte de carbono, sendo possível apenas com a metabolização desses compostos muitas vezes nocivos ao meio ambiente.

Um grande número de metabólitos secundários produzidos pelos endofíticos em meio de cultivo apresentaram alta atividade inseticida, causando mortalidade em lagartas de primeiro e terceiro ínstar e apresentando um alto potencial para aplicação como bioinseticidas.

A valinomicina foi identificada como o entomotóxico produzido pelo isolado de *Streptomyces badius* (LGM-CR-02) e apresentou a dose letal média (CL₅₀) de 4,38 µg/mL ($\pm$ 2,02) em lagartas de *Spodoptera frugiperda*.