



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO
AMBIENTE - PPGSHMA**

Patrícia Virgínia Padilha Dantas

**PROSPECÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE
BAMBU (*Bambusa vulgaris*) MICROPROPAGADO NA PRODUÇÃO
DE ENZIMAS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

Vitória de Santo Antão

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE -
PPGSHMA

Patrícia Virgínia Padilha Dantas

**PROSPECÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE
BAMBU (*Bambusa vulgaris*) MICROPROPAGADO NA PRODUÇÃO
DE ENZIMAS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração: Biotecnologia

Orientador: Profa. Dra. Christine Lamenha Luna Finkler
Coorientadora: Profa. Dra. Idjane Santana de Oliveira

Vitória de Santo Antão

2017

Catálogo na fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE - Biblioteca Setorial do CAV
Bibliotecária Jaciane Freire Santana - CRB-4/2018

D192p Dantas, Patrícia Virgínia Padilha.
Prospecção biotecnológica de fungos endofíticos de bambu (*Bambusa vulgaris*) micropropagado na produção de enzimas e atividade antimicrobiana / Patrícia Virgínia Padilha Dantas. - Vitória de Santo Antão, 2017.
83 folhas: il.; fig.

Orientadora: Christine Lamenha Luna Finkler
Coorientadora: Idjane Santana de Oliveira
Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Pernambuco, CAV,
Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, 2017.
Inclui referências e anexos.

1. Bambu. 2. Endofíticos. 3. Atividade enzimática. 4. Microbiologia . I. Finkler, Christine Lamenha Luna (Orientadora). II. Oliveira, Idjane Santana de (Coorientadora). III. Título.

584.9 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-80/2017

PATRÍCIA VIRGÍNIA PADILHA DANTAS

**PROSPECÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DE BAMBU
MICROPROPAGADO NA PRODUÇÃO DE ENZIMAS E ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Saúde Humana e Meio Ambiente.

Aprovada em: 17/02/2017.

Orientadora: Dr.^a Christine Lamenha Luna Finkler
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Fábio Marcel da Silva Santos
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dr.^a Laureen Michelle Houllou
Centro de Tecnologia Estratégicas do Nordeste - CETENE

Dr. Emerson Peter da Silva Falcão
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dedico à minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida maravilhosa que me concedeu e todas as graças que Ele tem colocado nela.

À minha família, Meus pais, Clícia e Manoel, que mesmo fisicamente distantes fizeram questão de sempre se inteirar do quê acontecia e sempre me incentivaram a buscar os melhores resultados que eu pudesse. E aos meus dois irmãos e futuros colegas de profissão, Patrick e Priscila, que sempre me motivam a ser um exemplo não só de pessoa como um todo, mas também de profissional. Vocês são a base forte para tudo que eu construo.

Aos meus amigos, todos. Especialmente à minha melhor amiga Carolyne Botelho (Card) que sempre me incentivou a dar o meu melhor profissionalmente, e esteve presente durante toda minha carreira me dando o suporte emocional de quê tanto precisei.

Ao meu namorado Davi Padilha, que lidou com todas as limitações psicológicas e emocionais que tive durante o último ano de mestrado, me compreendendo e me oferecendo todo o carinho que tinha em si, carinho este que sem o qual eu provavelmente não teria conseguido sequer superar minhas crises de ansiedade, diárias e recorrentes. Obrigada por ser meu equilíbrio.

À minha atual supervisora Laureen Houllou, não só por ter aceitado executar esse trabalho me oferecendo todo o apoio possível, mas porque na ausência física de meus pais, por muitas vezes me acolheu e ofereceu conselhos e orientações de vida, quase que diariamente, sem os quais eu talvez não tivesse conseguido sequer iniciar o mestrado.

Aos técnicos dos Laboratórios de Bioprocessos, Isaac Martins e Aldenize Oliveira, Pesquisa Aplicada à Biofábrica, Robson Souza, e Diagnose Fitossanitária, Paloma Cavalcante, que me ofereceram suporte nas atividades laboratoriais. E ao pesquisador Gustavo Torres pelo suporte oferecido nas etapas iniciais deste trabalho.

A todos os meus colegas de trabalho no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste bolsistas, estagiários e multiusuários pelas trocas diárias que enriqueceram muito minha vivência profissional e por todos os favores que me prestaram durante a execução deste trabalho.

À minha orientadora Christine Finkler, que aceitou me orientar mesmo não me conhecendo previamente e confiou no meu potencial para execução deste trabalho.

À minha co-orientadora Idjane Oliveira, que igualmente aceitou me orientar mesmo não me conhecendo e que me ensinou muito, desde técnicas científicas, até a melhorar minhas relações interpessoais.

À Universidade Federal de Pernambuco por me oferecer uma formação de qualidade que me permitiu ser apta à realização deste trabalho.

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste onde executei todos os experimentos contidos neste trabalho, por acreditar e investir neste trabalho.

Obrigada.

RESUMO

O bambu é uma cultura vegetal de ampla utilização e com importância comercial, mas que apresenta dificuldades quanto à sua propagação por métodos sexuais e por isso vem sendo estabelecida por métodos vegetativos, dentre os quais a cultura de tecidos vegetais. A cultura de tecidos vegetais através da micropropagação produz mudas de alto padrão, entretanto encara uma questão delicada quanto à contaminação *in vitro* por microrganismos endofíticos. Estes microrganismos embora não sejam desejáveis ao processo de micropropagação podem apresentar diversas potencialidades biotecnológicas, como a produção de enzimas e metabólitos com atividade antimicrobiana. O objetivo do presente trabalho foi isolar os fungos filamentosos endofíticos presente nos tecidos do bambu (*Bambusa vulgaris*) multiplicado *in vitro*, com capacidade de produzir enzimas (amilase e lipase), bem como testar a potencialidade antimicrobiana do líquido metabólico bruto desses fungos. A micropropagação de bambu foi realizada a partir de diferentes explantes, e foram obtidos isolados que seguiram para caracterização da comunidade microbiana cultivável do bambu. Os fungos filamentosos foram identificados por taxonomia e biologia molecular (região ITS) e empregados em testes de atividade enzimática em meios sólidos, além de testes de inibição bacteriana por microdiluição. Foram obtidos oito isolados de fungos filamentosos cultiváveis originados em sua maioria dos explantes obtidos de ramificações mais proximais com relação ao colmo da matriz coletada. Estes isolados pertencem a pelo menos cinco espécies distintas, *Hypoxylon investiens*, *Daldinia eschsholtzii*, *Curvularia lunata*, *Fusarium solani* e *Bambusicola bambusae*. Destes, cinco apresentaram atividade enzimática degradativa dentre os substratos avaliados, sendo um, CTNFB06 (*B. bambusae*), ativo para todos os substratos testados. Todos apresentaram atividade antimicrobiana para bactérias Gram negativa, com CIM de até 150 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$, e Gram-positiva, com CIM de até 7,8 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$, e três linhagens apresentaram atividade frente à bactéria Gram-positiva resistente à metilicina, com CIM de até 15.6 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$. Deste modo foi demonstrada a presença e distribuição de fungos filamentosos endofíticos do bambu (*Bambusa vulgaris*), bem como o valor destes fungos para potencialidades biotecnológicas na produção de enzimas e atividade antimicrobiana.

Palavras-chave: *Bambusa vulgaris*. Endofíticos. Atividade enzimática. atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Bamboo is a plant culture widely used with commercial prominence, but it presents difficulties in its propagation by sexed methods and for this reason has been widely established by vegetative methods, among it the plant tissue culture. The plant tissue culture through micropropagation produces high quality seedlings. However, it faces a delicate issue regarding *in vitro* contamination by endophytic microorganisms. These endophytic microorganisms, although not desirable to the micropropagation process, may present several biotechnological potentialities, such as enzymatic and antimicrobial activity. The present work aimed to isolate the endophytic filamentous fungi present in the tissues of bamboo multiplied *in vitro*, with the capacity to produce enzymes (amylase and lipase), as well as to test the antimicrobial potential of the crude metabolic liquid of these fungi. Micropropagation of bamboo was developed from different explants, and isolations were developed to characterize the microbial community of bamboo. Filamentous fungi were identified by taxonomy and molecular biology (ITS region) and used in enzymatic activity tests in solid media, and microdilution bacterial inhibition tests. Eight isolates of cultivable filamentous fungi were obtained, mostly from the explants obtained from more proximal branches with respect to the stem of the collected matrix. These isolates belong to at least 5 distinct species, *Hypoxylon investiens*, *Daldinia eschsholtzii*, *Curvularia lunata*, *Fusarium solani* and *Bambusicola bambusae*. Of these, 5 presented enzymatic activity among tested substrates, one, CTNFB06 (*B. bambusae*), being active for all substrates tested. All showed antimicrobial against Gram-negative bacteria, with MIC up to 150 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, and Gram-positive, with MIC up to 7.8 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, and three strains showed activity against Gram-positive bacteria Methicillin resistant, with MIC up to 15.6 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. The presence and distribution of endophytic filamentous fungi of bamboo (*Bambusa vulgaris*) was demonstrated, as well as the value of these fungi for biotechnological potentialities in the production of enzymes and antimicrobial activity.

Key words: *Bambusa vulgaris*. Endophytic. Enzymatic activity. antimicrobial activity.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Primeira Tabela do Capítulo 2. Distribuição dos isolados de fungos filamentosos cultiváveis obtidos ao longo das ramificações e segmentos do bambu avaliados.	41
Tabela 1.2	Segunda Tabela do Capítulo 2. Identificação através da morfologia macro e microscópica, e através do sequenciamento do fragmento ITS dos isolados de fungos filamentosos cultiváveis obtidos.	41
Tabela 2.1	Primeira Tabela do Capítulo 3. Atividade enzimática (Pz) dos fungos filamentosos para degradação de amido e lipídios.	57
Tabela 2.2	Secunda Tabela do Capítulo 3. Concentrações inibitórias mínimas dos líquidos metabólicos de fungos endofíticos frente às bactérias.	58

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Percentual
±	Mais ou menos
/	Dividido por
=	Igual a
>	Maior que
<	Menor que
®	Marca registrada
°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
dc	Diâmetro da colônia
dcp	Diâmetro da colônia mais a área de precipitação
eq	Equivalente
ha	Hectare
g	Gramma
h	Hora
Kg	Quilograma
L	Litro
mg	Miligramma
mL	Mililitro
mm	Milímetros
p	Peso
v	Volume
Pz	Atividade enzimática
β	Beta
V	Volts

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> – Análise de Variância
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> – Infusão de Cérebro e Coração
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i> – Incubadora de Demanda Bioquímica de Oxigênio
BPG	Bamboo Phylogeny Group
CBTC	Cane and Bamboo Technology Center
CETENE	Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CV	Coeficiente de Variação
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> – Ácido desoxirribonucleico
GPWG	Grass Phylogeny Working Group
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> – Vírus da Imunodeficiência Humana
kHz	Quilohertz
LAPAB	Laboratório de Pesquisas Aplicadas à Biofábrica
CBM	Concentração Bactericida Mínima
MH	Müeller Hinton
CIM	Concentração Inibitória Mínima
MRSA	<i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i> - <i>Staphylococcus aureus</i> Resistente à Meticilina
AN	Ágar Nutriente
BDA	Batata Dextrose Ágar
RPM	Rotações por Minuto
TTC	2,3,5-trifeniltetrazolium
UFC	Unidade Formadora De Colônia

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	12
1.1 Introdução	12
1.2 Objetivos	14
1.2.1 Objetivo Geral	14
1.2.2. Objetivos Específicos	14
1.3 Revisão da Literatura	15
CAPÍTULO 2	
Assembleia e distribuição de fungos filamentosos endofíticos cultiváveis em tecidos de bambu (<i>Bambusa vulgaris</i>)	25
2.1 Resumo	25
2.2 Abstract	26
2.3 Introdução	27
2.4 Material e Métodos	28
2.5 Resultados e Discussão	31
2.6 Conclusões	37
2.8 Agradecimentos	37
2.9 Referências	37
2.10 Figuras e Tabelas	40
CAPÍTULO 3	
Atividade enzimática e antimicrobiana de fungos filamentosos endofíticos do bambu (<i>Bambusa vulgaris</i>)	42
3.1 Resumo	42
3.2 Abstract	43
3.3 Introdução	44
3.4 Material e Métodos	45
3.5 Resultados	49
3.6 Discussão	50
3.6 Conclusões	53
3.8 Agradecimentos	53
3.9 Referências	54
3.10 Tabelas	57
DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	59

REFERÊNCIAS	
ANEXOS	

61
70

CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

O bambu (*Bambusa* Schreber spp.) compreende um grupo de plantas herbáceas e lenhosas, pertencentes à família Poaceae. Esta cultura vem sendo utilizada milenarmente das mais diversas formas, como por exemplo: na alimentação, na construção de abrigos, na confecção de ferramentas e de utensílios e objetos dos mais variados usos (MARTINS; GUERREIRO, 2006).

Devido à crescente demanda do mercado por produtos sustentáveis, o bambu vem se destacando principalmente por ser um ótimo recurso renovável, aplicado nas mais diversas áreas. Atualmente, os principais focos de sua utilização são: na indústria (de móveis, de papel e de celulose), na construção civil e na alimentação, sendo o bambu avaliado como uma planta de grande valor econômico, e caráter sustentável, por garantir rentabilidade em relação a outras culturas agrícolas (ALMEIDA, 2016; DABA, 2016).

Tendo em vista o crescente interesse na expansão das áreas de plantio de bambu e devido à escassez de mudas das principais espécies, o desenvolvimento de novas estratégias de propagação vem sendo, recentemente, considerado estratégico para o Governo Brasileiro, e essencial para ampliação das diferentes cadeias produtivas associadas a esta cultura. A propagação através dos métodos convencionais tem se mostrado incapaz de atender a demanda atual de mudas e as expectativas governamentais de aumento da diversificação de produtos sustentáveis. Desta forma, o desenvolvimento de protocolos para a clonagem *in vitro* pode acelerar a propagação das espécies mais relevantes de bambu (Ex. *Guadua angustifolia* Kunth, *Bambusa vulgaris* Schrad. ex J.C.Wendl., *Dendrocalamus asper* (Schult f.) Backer ex Heyne), visando dar suporte a esta crescente demanda.

A micropropagação é feita sob condições controladas em ambiente estéril, permitindo que as plantas tenham um rápido crescimento, induzido principalmente pelos ricos meios de cultura e hormônios vegetais utilizados. No entanto, a contaminação microbiana é um dos principais problemas que afeta o estabelecimento *in vitro* e a micropropagação de espécies vegetais em laboratórios comerciais de clonagem. Este problema pode resultar em grandes perdas durante o processo de produção. A maior parte dos contaminantes são microrganismos associados à própria planta (endofíticos), o que torna mais difícil o seu controle (ESPOSITO-POLESI, 2011).

Os microrganismos endofíticos são fungos e bactérias encontrados no interior de tecidos e órgãos saudáveis das plantas e que não causam danos aparentes aos hospedeiros durante o ciclo vital *in vivo*. A partir da relação simbiótica, os microrganismos endofíticos podem ainda desempenhar funções relevantes para a saúde vegetal. Dentre estas funções mais comumente descritas estão: a proteção contra pragas e patógenos, o aumento do crescimento da parte aérea e do desenvolvimento do sistema radicular, o aumento da resistência ao estresse, e a produção de substâncias com as mais variadas aplicações biotecnológicas (SANTOS et al., 2008; SOUZA et al., 2004).

Dentre as aplicações de valor econômico dos fungos filamentosos endofíticos destacam-se a utilização na indústria farmacêutica (para produção de antibióticos com diferentes propriedades farmacológicas), na agricultura (como herbicidas naturais e no controle de pragas) (RAI et al., 2014; KUMAR et al., 2014; SANTOS; VARAVALLO, 2011) e na indústria de bebidas e alimentos (CORRÊA et al., 2014). Deste modo, o presente trabalho se propõe a explorar a hipótese da obtenção de novos isolados de fungos endofíticos a partir de fontes ainda pouco estudadas, como é o caso do bambu, com potencial biotecnológico para aplicação industrial alimentar e farmacêutica.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Identificar os fungos encontrados em tecidos de bambu *Bambusa vulgaris* introduzido *in vitro* e avaliar a aplicação biotecnológica dos fungos endofíticos na obtenção de isolados com atividade enzimática e antimicrobiana.

1.2.2 Objetivos específicos

- Isolar, identificar e formar uma coleção de espécies de fungos endofíticos presentes no bambu clonado *in vitro*;
- Avaliar a atividade enzimática para amilase e lipase dos fungos endofíticos;
- Analisar a atividade antimicrobiana de líquidos metabólicos brutos dos fungos endofíticos do bambu.

1.3 Revisão da Literatura

1.3.1 Bambu

O bambu é uma gramínea que pertence à Família Poaceae, subfamília Bambusoideae, a qual possui 116 gêneros e 1.439 espécies conhecidas (BPG, 2012), configurando um grupo monofilético suportado com base em dados moleculares (GPWG, 2001). É um grupo vegetal cosmopolita, amplamente distribuído em nosso planeta (JUDZIEWICZ et al., 1999), sendo encontrado até mesmo em ambiente de floresta, como é o caso da Floresta Amazônica (CARVALHO et al., 2013; FERREIRA, 2014), caracterizando-se como uma exceção ao hábito usual do grupo Poaceae (JUDZIEWICZ; CLARK, 2007). Os espécimes de bambu são plantas rizomatosas, que apresentam caules aéreos do tipo colmo, sólidos ou ocos, herbáceos ou lignificados, dos quais partem lâminas foliares pseudopetioladas, e apresentam rota fotossintética do tipo C3 (BPG, 2012).

A cultura do bambu apresenta diversas formas de utilização pelo ser humano, tais como obtenção de celulose para papel, construção, movelaria e artesanato, e até mesmo alimentação (PEREIRA; BERALDO, 2007). Além da utilização do bambu como matéria prima para produtos, é proposto por Osse e Meirelles (2011) que o vegetal tem notável potencial pra minimização de problemas climáticos em espaços urbanos, quando de sua utilização, sob manejo controlado, compondo a gama de espécimes utilizados na ampliação de áreas verdes.

São atribuídas ao bambu características que consolidam e embasam a atribuição do caráter ecologicamente amigável aos produtos que utilizam sua cultura como matéria prima. Pereira (1999) destaca o bambu como uma cultura que apresenta alto potencial para sequestro de CO₂, sendo inclusive superior a vegetais arbóreos, e segundo Netto e Giannetti (2009) o bambu demonstra alto potencial de estoque de carbono, entre 31.860 e 77.039 Kg CO₂ eq.ha⁻¹.ano⁻¹. Para Américo (2009), o uso do bambu no chamado eco-design já se configura como uma

tendência a ser consolidada, ao passo que as demandas por produtos que utilizam materiais sustentáveis vêm crescendo socialmente.

Existe ainda a imergência do bambu no campo da engenharia de materiais, no sentido da agregação das fibras de bambu a ligas industriais para conferência de caráter sustentável e rapidamente renovável aos novos produtos gerados a partir destas composições (BATTISTELLE; MARCILIO; LAHR, 2009). Anjos, Ghavami e Barbosa (2003) evidenciam a eficiência da suplementação com polpa celulósica do bambu ao cimento comercial num teor ótimo de 8% que promoveu melhora mecânica do material suplementado com relação à sua matriz.

A construção civil é uma das vertentes que absorve à sua essência o caráter sustentável que o emprego do bambu pode oferecer nas denominadas bioconstruções (SILVA; LIMA; OLIVEIRA, 2011), podendo este, por vezes, conferir redução de custo às obras. Segundo Liu et al. (2012) o uso da fibra de bambu, em seus diferentes tamanhos, macro, micro e nano, através de processos de otimização de suas propriedades é uma tendência à produção de compostos estruturais sustentáveis. Dash e Gupta (2014) destacam o papel do bambu à composição estrutural de paredes como um passo à construção sustentável, sendo ainda colocado por Teixeira Júnior, Kenupp e Campos (2010) que o bambu como substituto da madeira pode reduzir em até 30% o valor total de uma obra. Deste modo, é proposto por Souza (2009) e por Pawar (2014) o uso do bambu em construção civil como uma forma de atender às demandas crescentes por habitações urbanas de qualidade com baixo custo.

Segundo Chongtham, Bisht e Haorongbam (2011) o broto-de-bambu se configura numa fonte nutricional de alto valor, com potencial para incorporação na dieta humana, sendo relatado por Ferreira et al. (1990) alimentação com broto-do-bambu, em especial de suas porções apical e basal, com aceitação superior a 90% em provas sensoriais por famílias que o degustaram. Segundo Satya et al. (2012) e Singhal et al. (2013) o broto tem alto potencial a ser incorporado em pratos tradicionais, promovendo suplementação das dietas, uma vez que este é rico em proteínas e fibras, e pobre em gorduras, sendo ainda fonte de vitamina C e potássio,

necessitando apenas de cuidados no processamento do produto para manutenção de suas características organolépticas e nutricionais.

O bambu apresenta uma peculiaridade a ser levada em conta para seu estabelecimento como cultivo agrícola no tocante à sua forma de propagação. O bambu é um vegetal de rara floração (AZZINI; CIARAMELLO; NAGAI, 1978), com espécies cujo ciclo de floração ainda não foi relatado (SAARELA, 2007). Em contra partida o bambu apresenta fácil propagação por meio de processos assexuados como a estaquia, que é amplamente utilizada em campos de cultivo do vegetal desde os primórdios de seu cultivo em larga escala (AZZINI; ARANHA; PIO, 1982). Além dos métodos de propagação vegetativos tradicionais, já foram estabelecidas técnicas mais sofisticadas para propagação do bambu como a cultura de tecidos vegetal (OLIVEIRA; LEMOS; REZENDE, 2012).

No Brasil, a Lei 12.484 de 8 de setembro de 2011 trata da Política Nacional de Incentivo ao Manejo Sustentado e ao Cultivo do Bambu, estabelece incentivos ao desenvolvimento da cultura em nosso país, configurando estímulo ao desenvolvimento agrícola da cultura do bambu (BRASIL, 2011). De modo que esse tipo de medida por parte do Estado brasileiro traduz o valor que esta cultura ganhou em todo o território nacional. Entretanto, apesar da preocupação demonstrada pelo Governo brasileiro em incentivar a difusão da cultura do bambu em solos agrícolas, além da ampliação das áreas de cultivo, e da utilização do bambu em diferentes cadeias produtivas, são necessárias adequações nas estratégias de propagação de mudas de diferentes espécies desta cultura a fim de suprir a demanda instaurada. E neste sentido, a cultura de tecidos vegetais, através da técnica de micropropagação, se apresenta como uma ferramenta de apoio ao cultivo do bambu em larga escala.

1.3.2 Micropropagação

A cultura de tecidos vegetais, segundo Raven, Evert e Eichhorn (2010), configura um conjunto de métodos que permite replicar *in vitro* um grande número de células vegetais sob condições controladas, tendo atual destaque na biotecnologia vegetal o método conhecido como micropropagação ou propagação clonal. Para Andrade (2002), a micropropagação é uma técnica de propagação vegetativa

estabelecida *in vitro* que consiste na obtenção de pequenas amostras de tecido vivo, chamados explantes, a partir de uma matriz vegetal pré-selecionada com características de interesse agrícola. Os referidos explantes passam por processos de assepsia minuciosos e são introduzidos em meios de cultura estéreis onde estes serão nutridos e mantidos sob condições controladas a fim de que valendo-se da totipotência inerente às células vegetais, sejam originados novos indivíduos a partir do crescimento do explante (GEORGE; HALL; KLERK, 1984). O método descrito resulta na obtenção de um grande número de plântulas saudáveis e geneticamente idênticas à planta da qual se obteve o explante, ou seja, clones da matriz, que, portanto apresentam as mesmas características agrônômicas do material a ser propagado, sendo estes resultados obtidos em um curto período de tempo (CARVALHO; VIDAL, 2003).

A micropropagação de vegetais dispõe de um amplo mercado comercial ainda carente de fornecedores (SPRICIGO; MOMBACH, 2008), e Alves et al. (2008) afirmam que a cultura de tecidos vegetais tem um papel fundamental ao desenvolvimento agrícola no tocante ao fornecimento de mudas para aumento da produtividade de cultivos para o campo, destacando ainda o valor da obtenção das mudas de alto padrão e geneticamente idênticas para a otimização da produção agrícola. É importante ainda que essas mudas estejam livres de contaminação por microrganismos a fim de garantir a fitossanidade das mesmas para o envio ao campo, e de acordo com Nair e Padmavathy (2014) a presença de microrganismos endofíticos no cultivo vegetal *in vitro* se configura em uma dificuldade recorrente para garantir a segurança sanitária das mudas.

1.3.2.1 Contaminação microbiana na cultura de tecidos

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, e conforme a Lei 10.711 de 5 de agosto de 2003, as mudas produzidas para fins comerciais (micropropagadas ou por propagação convencional) devem ser sanitariamente seguras, ou seja, livres de contaminantes (BRASIL, 2003). A técnica de micropropagação, embora almeje a condução de um processo que gere mudas em meio axênico, enfrenta constantemente a ocorrência de contaminação por microrganismos.

A contaminação durante a micropropagação pode ser de origem externa, na forma de microrganismos epifíticos ou contaminantes ambientais, caso a assepsia do explante não seja executada de forma efetiva, ou interna, como é o caso dos microrganismos que estejam compondo a microbiota interna dos tecidos vegetais, sendo que ambos os casos, as contaminações são consideradas prejudiciais ao processo propagativo (DEBERGH; READ, 1991). A maior parte dos contaminantes são microrganismos associados à própria planta, como é o caso dos endofíticos, o que torna mais difícil o seu controle, especialmente porque estes possuem uma taxa de crescimento mais rápida do que a do explante e terminam por competir com este pelos nutrientes do meio de cultivo, prejudicando o desenvolvimento da nova plântula (CARVALHO; RODRIGES; SANTOS, 2012).

Embora a contaminação microbiana possa ocasionar perdas à produção de mudas micropropagadas, esta contaminação pode ser uma fonte para isolados microbianos promissora. Uma vez que a limpeza externa dos explantes seja executada por um protocolo efetivo, os microrganismos que venham a ser expressos no processo de micropropagação, considerados endofíticos, podem demonstrar grande potencial biotecnológico (KANTARIAN et al., 2016). Este potencial biotecnológico tem quebrado o paradigma do papel classicamente prejudicial atribuído aos microrganismos endofíticos contaminantes na cultura de tecidos vegetais (ESPOSITO-POLESI, 2011).

Dentre esses contaminantes endofíticos de mudas de bambu (*Bambusa vulgaris*) micropropagado, destacam-se os fungos filamentosos, que podem chegar a se expressar em até 99% dos explantes quando da introdução dos mesmos *in vitro*, caso não haja adição de antimicrobianos aos meios de cultivo vegetal (TORRES; HOULLOU; SOUZA, 2016).

1.3.3 Fungos Endofíticos

A categorização dos microrganismos endofíticos foi feita inicialmente por Bary (1866), tendo ele definido o grupo como microrganismos colonizadores de perfil assintomático no vegetal, conceito este foi sendo revisado e adaptado ao passo que a literatura demonstrou relações mais complexas nas relações estabelecidas. Os

chamados fungos endofíticos atualmente são aqueles que colonizam tecidos vegetais, em especial folhas e caules, sem causar dano aparente ao vegetal hospedeiro, sendo endossimbiontes que podem estar colonizando quaisquer tecidos vegetais (SCHULZ; BOYLE, 2005). Esses microrganismos, originários de comunidades presentes no solo, estabelecem uma relação harmônica com a planta colonizada, obtendo abrigo e nutrientes com baixa competição, uma vez que nem todos os organismos presentes no solo tem a capacidade de colonizar o vegetal hospedeiro, sem causar patologias ao último, podendo ainda apresentar propriedades de interesse ao desenvolvimento da planta (AZEVEDO, 1998).

A entrada dos fungos endofíticos aos tecidos vegetais, segundo Azevedo (1998), se dá especialmente na região das raízes a partir de lesões oriundas da abrasão inerente ao crescimento radicular, podendo ainda ter sua entrada ocasionada por lesões resultantes da atividade de herbívoros, por estruturas de fungos patogênicos, como os apressórios, ou mesmo por aberturas naturais, como os estômatos. Em etapas reprodutivas, a microbiota endofítica pode ser transmitida através de sementes colonizadas, ou nas estruturas utilizadas para métodos de propagação vegetativa, caso o vegetal de origem apresente seus tecidos colonizados.

A diferença entre fungos endofíticos, epifíticos e patógenos ainda é uma questão que se vale de limites tênues para definir as mencionadas categorizações, de modo que são considerados microrganismos epifitos aqueles que vivem na superfície externa das plantas, e os fitopatógenos aqueles que embora adentrem os tecidos vegetais, podem vir a causar doenças, prejudicando o desenvolvimento da planta que coloniza (AZEVEDO, 1998; ZINNIEL et al., 2002). Uma vez que exista uma porta de entrada ao vegetal, a colonização por fungos endofíticos é mediada por sinalização química, o que compõe um mecanismo distintivo entre endofíticos e patógenos, já que o microrganismo endofítico desencadeia um processo de acomodação pelo organismo hospedeiro, ao passo que um patógeno desencadeará uma resposta defensiva por parte do organismo da planta (KOGEL; FRANKEN; HÜCKELHOVEN, 2006).

A diferenciação entre os diferentes grupos de microrganismos, endofíticos ou patogênicos, segundo Azevedo (1999), é meramente didática, uma vez que não existe um limite claro entre estes grupos, mas gradientes que são determinados pelas condições do ambiente e do vegetal hospedeiro. Deste modo, um fungo epifítico, uma vez que haja porta de entrada aos tecidos vegetais, pode colonizá-los como endofítico, e o mesmo em situações de estresse do organismo hospedeiro poderia eventualmente causar danos à planta tornando-se patógeno. É colocado por Sieber (2007) que os fungos endofíticos teriam evoluído de fungos parasitas ou patógenos por meio da extensão nos períodos de latência e redução da virulência, o que deixa mais evidente a distinção gradual de categorização dos fungos de caráter endofítico. Estes fungos endofíticos podem ainda apresentar atividades biológicas *in vitro* das mais diversas, tais como: antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, bem como produção de enzimas, entre outros produtos com aplicação biotecnológica (NAIR; PADMAVATHY, 2014).

1.3.3.1 Potencial biotecnológico de fungos endofíticos

O emprego dos fungos endofíticos ganha cada vez maior espaço econômico à medida que têm sido evidenciadas suas aplicações em diversas áreas biotecnológicas desde agrícola até industrial farmacêutica e alimentar (KUSARI; SINGH; JAYABASKARAN, 2014). Os referidos fungos têm destaque quanto às suas potencialidades agrícolas para controle biológico de fitopatogenias (SANTOS; VARAVALLO, 2011; KUSARI et al., 2013), e podem apresentar variados mecanismos de promoção do crescimento vegetal (KHAN et al., 2012; RAI et al., 2014), com destaque para a espécie *Piriformospora indica*, basidiomiceto endofítico que coloniza diversas espécies vegetais promovendo aumento de seus crescimentos (PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002).

Quanto aos processos e serviços que os fungos endofíticos podem fornecer, são destacadas as propriedades em biorremediação e biotransformação de poluentes (AGUSTA et al., 2014; FESTER et al., 2014), fitorremediação (LI et al., 2012), bem como a biodegradação do polímero poliéster poliuretano (RUSSELL et al., 2011), e a própria decomposição para ciclagem natural de nutrientes (SUN; GUO; HYDE, 2011). As propriedades dos fungos endofíticos em propiciar o

desenvolvimento dos vegetais hospedeiros podem ultrapassar os mecanismos clássicos de promoção do crescimento vegetal, de forma indireta por meio da ciclagem de nutrientes. É proposta por Behie, Zelisko e Bidoshka (2012) a passagem de nitrogênio, importante macronutriente à nutrição vegetal, obtido a partir do parasitismo em insetos por parte de um fungo endofítico do gênero *Metarhizium*, que é capaz de translocar o nutriente para seu vegetal hospedeiro via micélio, configurando uma interação tripartida de ciclagem de nutrientes que beneficia a planta colonizada.

A produção de biocatalizadores e enzimas de interesse industrial e alimentar é um dos destaques quanto às competências expressas por fungos endofíticos (SURYANARAYANAN et al., 2012), podendo ser observada a produção de compostos com valor biocombustível, tais como síntese lipídica para biodiesel (KUMAR; KAUSHIK, 2013; DEY; BANERJEE; MAITI, 2011), e hidrocarbonetos relacionados com combustíveis que por serem produtos do metabolismo fúngico vem sendo denominados *mycodiesel* (STROBEL, 2014a; AHAMED; AHRING, 2011). Neste último processo a produção de hidrocarbonetos pode ser efetuada por fungos endofíticos até mesmo a partir de resíduos agrícolas (STROBEL, 2014b). É relatado ainda um processo mais recente atribuído a fungos endofíticos de alto valor no tocante à síntese extracelular de nanopartículas de prata, tendo estas alta biocompatibilidade com células saudáveis ao passo que exercem atividade citotóxica a células cancerígenas humanas (BALAKUMARAN; RAMACHANDRAN; KALAICHELVAN, 2015).

Outra propriedade amplamente atribuída aos fungos endofíticos é a produção de enzimas tais como lipases, proteases, pectinases, lactases e amilases (CORRÊA et al. 2014; KHARWAR et al., 2014), além de enzimas associadas a outros processos biotecnológicos recentes, como as hemicelulases e xilanases empregadas na produção de etanol de segunda geração (ROBL et al., 2013).

Dentre as enzimas de interesse industrial produzidas por fungos, destacam-se as lipases e amilases. O interesse industrial pelas lipases, hidrolases capazes de catalisar reações de substratos insolúveis em água, degradando lipídeos, é dado pela vasta aplicação desta enzima em diferentes áreas (ATTAR; AMINIFAR, 2014),

tais como indústrias de detergentes e medicamentos (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006), biodiesel (PARK; SATO; KOJIMA, 2006) e efluentes (CASTRO et al., 2005). Em confluência, o valor da prospecção por enzimas amilolíticas, hidrolases que degradam moléculas de amido, se dá também por suas aplicações em diferentes segmentos industriais, como alimentar, têxtil, química analítica, farmacêutica e detergentes (SOUZA; MAGALHÃES, 2010; SARANRAJ; STELLA, 2013).

Os fungos endofíticos são uma notável fonte para novos metabólitos secundários bioativos (KAUL et al., 2012; KUSARI; HERTWECK; SPITELLER, 2012), pela produção de diversos compostos de valor anticancerígeno (CHANDRA, 2012; CHEN et al., 2014), dentre eles o Taxol® (HEINIG; SCHOLZ; JENNEWEIN, 2013; YANG et al., 2014), e mesmo tendo demonstrado atividade leishmanicida (SANTIAGO et al., 2012) e antimalárica (CALCUL et al., 2013). É relatada atividade biológica por parte de diversos gêneros de fungos endofíticos (ALY; DABBAB; PROKSCH, 2013) e a indução à apoptose de células cancerígenas por ascomicetos endofíticos (HAZALIN et al., 2012), além da inibição da replicação do vírus HIV-1 por metabólitos secundários de fungos endofíticos (WELLENSIEK et al., 2013).

Dentre os compostos bioativos, é notável o estudo de produtos com atividade antimicrobiana produzidos por fungos endofíticos (BANO et al., 2016; SUDHA et al., 2016; SOUSA et al., 2016; WANG et al., 2016), de modo que a produção de compostos de valor farmacêutico como antibióticos por parte dos referidos fungos cresce ao passo que diversas microbiotas endofíticas de espécies vegetais variadas são estudadas. Essa prospecção por atividade antimicrobiana a partir de produtos metabólicos de fungos endofíticos demonstra alto valor ao passo que resultados promissores são relatados, podendo mesmo estes metabólitos apresentarem atividade com eficácia similar ou até mesmo superior à de compostos farmacêuticos comerciais atualmente empregados (VAZ et al., 2012).

A aparente co-evolução entre fungos endofíticos com seus vegetais hospedeiros permite que estes tenham seus metabolismos intimamente associados com tamanha coesão que os microrganismos chegam a produzir os mesmos compostos bioativos, ou similares, aos produtos originários da planta hospedeira, tais como paclitaxel, podofilotoxina, camptotecina, vinblastina, hipericina, e

diosgenina (ZHAO et al., 2011; ALY; DEBBAB; PROKSCH, 2013). É possível ainda verificar que fungos endofíticos de plantas medicinais já vêm sendo caracterizados por sua atividade antimicrobiana (VIEIRA et al., 2014; SRINIVAS et al., 2015).

Azevedo (2014) propõe que com base nos resultados evidenciados pela literatura quanto aos possíveis empregos biotecnológicos dos fungos endofíticos, a continuidade na prospecção destes a partir de fontes de espécies vegetais variadas e em diferentes áreas geográficas para condução de ensaios a fim de determinar suas competências potenciais deve ser incentivada no Brasil, uma vez que a vastidão territorial, e diversidade ecológica do país tendem a proporcionar achados promissores e que ainda não foram completamente estudados. Neste sentido, a prospecção de fungos endofíticos a partir de uma fonte pouco estudada como o bambu, e em uma matriz cuja microbiota ainda não foi caracterizada, presente no Nordeste brasileiro, se apresenta como uma opção promissora para achados com valor biotecnológico.

CAPÍTULO 2

ASSEMBLEIA E DISTRIBUIÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS ENDOFÍTICOS CULTIVÁVEIS EM TECIDOS DE BAMBU (*Bambusa vulgaris*)

Resumo: Fungos endofíticos, são aqueles que colonizam os tecidos vegetais, sem ocasionar patologias e intimamente relacionados com suas plantas hospedeiras, sendo a colonização espécie-específica. O bambu (*Bambusa vulgaris*) é uma cultura de ampla utilização com microbiota não estudada. Com objetivo de verificar a distribuição de fungos endofíticos em diferentes ramificações de bambu, bem como a assembleia de fungos cultiváveis presentes nestes, foram analisadas amostras de ramos primários e secundários. Estas amostras foram submetidas ao processo de micropropagação de tecidos vegetais, sendo fragmentadas em segmentos pré-nodais, nodais, e pós-nodais. Os fungos expressos que demonstraram ser cultiváveis posteriormente por meios artificiais passaram por identificação morfológica e molecular com base na região ITS dos fungos. Foram obtidos 8 isolados fúngicos, sendo 4 da região nodal, 2 da região pré-nodal e 2 da região pós-nodal dos explantes de bambu. Tanto na ramificação primária quanto secundária, foram encontrados mais fungos na região nodal do bambu. As espécies de fungos identificadas foram: *Hypoxylon investiens*, *Daldinia eschsholtzii*, *Curvularia lunata*, *Fusarium solani* e *Bambusicola bambusae*. Os resultados permitem apreender a existência de um gradiente de colonização dos tecidos vegetais decrescente em direção às suas porções mais distais com relação ao colmo, e a existência de uma assembleia de pelo menos cinco espécies distintas de fungos filamentosos endofíticos cultiváveis nos tecidos de *B. vulgaris*.

Palavras-chave: Colonização; gramínea; hospedeiro; micropropagação; microrganismos.

ASSEMBLY AND DISTRIBUTION OF CULTIVABLE ENDOPHYTIC FILAMENTOUS FUNGI FROM BAMBOO (*Bambusa vulgaris*)

Abstract: Endophytic fungi are those that colonize plant tissues without causing illness. These are closely related to their host plants, and present species-specific colonization. Bamboo is a culture of widespread use and whose microbiota is still unknown. With the aim of verify the distribution of endophytic fungi in different branches of bamboo and the assembly of cultivable fungi present in these, samples were collected from primary and secondary branches. These samples were subjected to micropropagation of plant tissues process, being fragmented in pre-nodal, nodal, and post-nodal segments. Expressed fungi that showed to be cultivable by artificial means were submitted through morphological and molecular identification based on the ITS region of the fungi. 8 fungal isolates were obtained, 4 from the nodal region, 2 from the pre-nodal region and 2 from the post-nodal region of the bamboo explants. In both the primary and secondary branches, more fungi were found in the nodal region of bamboo. The fungus species identified were: *Hypoxyylon investiens*, *Daldinia eschsholtzii*, *Curvularia lunata*, *Fusarium solani* and *Bambusicola bambusae*. The results allow noticing the existence of a gradient on the intensity of colonization of plant tissues descending towards their distal portions from the stem, and the existence of an assembly of at least five distinct species of cultivable endophytic filamentous fungi in bamboo (*Bambusa vulgaris*) tissues.

Keywords: Colonization; grass; host; micropropagation; microorganisms.

Introdução

Fungos endofíticos são aqueles capazes de colonizar os tecidos vegetais sem causar danos aparentes a seu hospedeiro, adentrando aos vegetais em geral por portas ocasionadas pela abrasão resultante do crescimento radicular, ação de herbívoros, ou aberturas naturais, como os estômatos (Azevedo 1998). Os fungos endofíticos têm sua entrada sinalizada positivamente pelo vegetal, o que se deve a uma aparente co-evolução destes para com seu hospedeiro, existindo especificidade de colonização. (Redko 2006). Deste modo, a diversidade de fungos endofíticos pode ser influenciada por alguns aspectos relacionados ao local onde os hospedeiros estão, bem como a gama de hospedeiros a partir dos quais o isolamento é realizado (Morakotkarn et al. 2007). Assim a prospecção de microrganismos pode demonstrar novas composições da microbiota de bambu dependendo da localização da matriz coletada e de sua própria interação com o ambiente em que se encontra.

O bambu é uma gramínea considerada matéria prima de rápida reposição, ao passo que agrega um caráter ecologicamente amigável aos produtos que a incorporam (Almeida 2016). A fim de suprir tal demanda, diversas técnicas têm sido implementadas para obtenção de mudas de bambu, podendo ser destacada a cultura de tecidos vegetal através da micropropagação, que gera mudas de alto rendimento agrícola livres de contaminantes (Oliveira et al. 2012). Neste sentido, a ocorrência de microrganismos endofíticos pode se apresentar como um entrave ao processo de micropropagação, e, portanto aspectos acerca do comportamento da distribuição destes organismos nos tecidos podem permitir a otimização do processo de escolha das ramificações a serem cultivadas *in vitro*.

Pouco se sabe, em geral, sobre o papel da comunidade endofítica e a caracterização desta, e apesar do histórico cultivo do bambu, a microbiota endofítica deste vegetal e suas potencialidades permanecem um tema ainda pouco explorado. Portanto, o estudo da comunidade fúngica endofítica do bambu, bem como sua distribuição ao longo de seus tecidos ainda requer estudos elucidativos que gerem caracterizações da colonização deste vegetal, bem como novos isolados fúngicos com valor biotecnológico ainda não estudado. Deste modo, o presente trabalho teve por objetivo verificar a distribuição de fungos filamentosos endofíticos nos tecidos do

bambu e identificar a assembleia de fungos cultiváveis isolados a partir do referido vegetal.

Material e Métodos

Foram coletadas amostras de bambu (*Bambusa vulgaris* Schrad) a partir de uma matriz pré-selecionada pelo Laboratório de Pesquisas Aplicadas à Biofábrica (LAPAB) do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) para micropropagação. A coleta foi feita durante o mês de março de 2015, durante uma semana na qual não foi registrada a ocorrência de chuvas no local onde está alocada a matriz (Latitude 8°32'26,16" Sul, Longitude 34°58'27,56" Oeste), Município de Recife - Pernambuco. A matriz consiste em uma touceira de bambu com vigor vegetativo visível, que não apresenta indícios visuais ou sintomas de perturbações ao desenvolvimento saudável do vegetal, tais como presença de patógenos, deficiência nutricional e estresse hídrico. Foram coletados ramos primários, com diâmetro médio de 3 a 4 mm, cujas brotações foram descartadas, e ramos secundários nas mesmas dimensões, ainda não apresentando brotamento de suas gemas, de modo que apenas um segmento de cada ramo, o quinto mais distal, foi utilizado para o processo de introdução *in vitro*.

- **Introdução do bambu *in vitro***

A limpeza das amostras foi estabelecida em dois processos, de modo que estas foram desinfestadas mediante lavagem em água destilada com bucha e detergente comercial, e foram secadas com papel absorvente estéril. Em seguida, as amostras foram submetidas à desinfecção conforme protocolo adaptado de Araújo et al. (2002) sendo submergidas em etanol a 70% (v/v) por 1 minuto, seguido de três lavagens em água destilada estéril. Em seguida, as amostras foram imersas em hipoclorito de sódio a 2% (v/v), por 4 minutos, seguidos por três lavagens em água destilada estéril; banho de ultrassom 55 kHz, por 10 minutos, seguidos por três lavagens com água destilada estéril; etanol a 70% (v/v) por 30 segundos, seguidos três lavagens finais com água destilada estéril.

O controle do processo de limpeza do material foi realizado mediante inoculação em triplicata de alíquotas de 1,0 mL da última água de lavagem das amostras em tubos contendo 10 mL de Caldo Nutriente HIMEDIA®, Caldo Infusão

de Cérebro e Coração (BHI) HIMEDIA®, e Caldo Sabouraud HIMEDIA®, que foram incubados a 32 °C, por 15 dias, sob agitação de 150 rpm. A ausência de turvação nos meios inoculados para controle foi considerada como validação positiva quanto à eficiência do processo de limpeza.

- **Isolamento dos microrganismos expressos *in vitro***

Para o isolamento, os ramos de bambu, com auxílio de tesoura de poda triplamente flambada, foram fragmentados em segmentos pré-nodais, nodais e pós-nodais, sendo a delimitação do início dos segmentos pré-nodais coincidente com o término da porção pós-nodal anterior, e os segmentos nodais delimitados por dois centímetros anterior e posteriormente aos nós. Os fragmentos dos segmentos nodais foram introduzidos em triplicata em tubos de cultivo contendo 10 mL de meios de cultura próprios para cultivo de microrganismos, a saber, Ágar Nutriente (AN), Ágar BHI, e BDA, em estado de consistência semissólido (5,0 g.L⁻¹ de ágar).

Os tubos contendo os fragmentos dos segmentos nodais introduzidos foram incubados em B.O.D. a 32 °C por 15 dias, ao longo dos quais os microrganismos que se expressaram foram isolados e purificados (por esgotamento, no caso das bactérias, e fragmentação de micélio no caso dos fungos), nos respectivos meios de cultura sólidos onde foram originalmente obtidos. Foi catalogada e avaliada a manifestação aparente de fungos filamentosos e bactérias (quando presentes) fenotipicamente distintos em cada repetição para estudo da disposição destes ao longo dos segmentos vegetais. Todos os isolados receberam codificação e os que se mantiveram ativos *in vitro* foram preservados para posteriores estudos conforme protocolos descritos por Sola et al. (2012) e Bueno et al. (2006) em óleo mineral, além de criogenia em glicerol a 15% (v/v) no caso das bactérias, e discos de micélio em água destilada estéril no caso dos fungos filamentosos.

Os isolados bacterianos obtidos foram mantidos em preservação para posterior identificação e testes para potencial biotecnológico, ao passo que os isolados fúngicos, objeto de estudo do presente trabalho, foram mantidos ativos para prosseguimento da identificação e disponibilização posterior em ensaios de caracterização.

- **Identificação dos fungos filamentosos endofíticos isolados**

A identificação dos fungos por taxonomia foi conduzida através da avaliação de características macroscópicas e microscópicas das culturas dos isolados. Para avaliação das características macroscópicas, foram estabelecidas culturas dos isolados em meio de cultura BDA incubados por seis dias a 32°C, sendo que a avaliação das características macroscópicas foi feita a olho nu com iluminação branca. Se tratando na avaliação de características microscópicas, foi estabelecido microcultivo dos isolados, a fim de gerar rebordos das colônias que foram corados com azul de algodão (1g.L⁻¹ em ácido láctico 88%) entre lâmina e lamínula para visualização em microscopia óptica.

Para extração de DNA e identificação molecular dos fungos, foram estabelecidos crescimentos líquidos de cada cultura em Caldo Sabouraud HIMEDIA®. As culturas líquidas foram obtidas mediante incubação em estufa B.O.D. a 32 °C por sete dias, e então foram filtradas a vácuo em papel de filtro estéril. Para extração de DNA genômico das amostras de microrganismos foi utilizado o kit de extração Qiagen® DNA Genômico. Os DNAs extraídos foram corados com Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia), separados em gel de Agarose (Avati - Biometrix) a 1% em tampão TBE 1 X, eluídos durante 30 minutos a 100 V. Os géis visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel L-PIX HE (Loccus Biotecnologia). Foram selecionadas as melhores amostras quanto à integridade e quantidade do DNA extraído.

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada em um volume final de 25 µL contendo 2,0 µL de DNA (20 ng), 0,1 µL de cada iniciador 10 µmol⁻¹ (Eurofins Genomics), 2,5 µL de tampão de PCR 5X (Ludwig Biotec), 2,5 µL de MgCl₂ 25 mM (Ludwig Biotec), 0,5 µL de dNTP 10 mM (Ludwig Biotec), 0,25 µL de Taq DNA polimerase 5U (Ludwig Biotec) e o volume final completado com água Milli-Q® ultrapura estéril. Foram utilizados os iniciadores ITS1 (5' - TCC GTA GGT GAA CCT GCG G - 3') e ITS4 (5' - TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC - 3') para amplificação da região ITS do rDNA, conforme proposto por White et al. (1990). As reações de PCR foram estabelecidas em termociclador automático (Amplitherm™). O programa foi constituído de uma desnaturação inicial a 95° C por 2 min, seguido por 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 95° C, 1 minuto de anelamento a 55° C

e 1 minuto e 30 segundos de extensão a 72° C, e uma extensão final por 10 minutos a 72 °C. Os produtos de PCR foram corados com Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia) e analisados por eletroforese em gel de Agarose (Avati - Biometrix) 2%, em tampão TBE 1 X, eluídos durante 45 minutos a 100 V. Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel L-PIX HE (Loccus Biotecnologia), sendo consideradas como amostras aptas ao envio para sequenciamento aquelas que apresentaram bandas bem definidas com peso molecular entre 600 e 650 pb quando comparados ao marcador Ladder 100bp (EasyGen) . A purificação dos produtos de amplificação foi conduzida através do kit comercial GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit – GE Healthcare Life Sciences™ e quantificadas para sequenciamento mediante uso do kit comercial Qubit® dsDNA HS Assay Kit - Invitrogen™.

As sequências de DNA foram obtidas mediante envio das amostras amplificadas à empresa Ludwig Biotec (Brasil), e foram analisadas para busca de identidade utilizando-se o programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool - versão 2.215 do BLAST 2.0), disponível no portal do National Center for Biotechnology Information (NCBI) desenvolvido pelo National Center For Biotechnology (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/). Como referência para identificação dos isolados foram tomados como satisfatórios alinhamentos que apresentaram similaridade maior que 97% com a espécie indicada no GenBank®, além de serem utilizados os dados morfológicos como complementares para indicação das espécies.

Resultados e discussão

Foram expressos 48 isolados bacterianos e 27 isolados de fungos filamentosos fenotipicamente distintos como endofíticos de bambu. O crescimento fúngico ocorreu tanto por meio de projeções de hifas nas porções terminais expostas dos explantes, sem contato com o meio de cultura, o que sugere que o explante foi consumido pelo fungo como substrato quando submetido ao estresse da introdução *in vitro*, como em crescimentos ao longo da parte exposta dos meios de cultura nos quais os explantes foram introduzidos, sendo este último comportamento observável apenas no meio de cultura BDA. É possível destacar que em geral, conforme

esperado, mediante o proposto por Tortora et al. (2012), foram expressos mais isolados bacterianos em meios ricos em fontes nitrogenadas, 19 bactérias frente a 8 fungos em meio BHI, e 17 bactérias frente a 4 fungos em AN, ao passo que o meio que apresentava maior quantidade de fonte de carbono BDA expressou mais isolados fúngicos, onde foram notadas 12 bactérias frente a 15 fungos em meio BDA (Figura 1).

Segundo Liese e Tang (2015), os internódios da espécie *Bambusa vulgaris* são compartimentos ocos com paredes fibrosas compostas por células dispostas longitudinalmente, ao passo que os nós se configuram em estruturas maciças. Essa característica pode ser o principal fator para o comportamento observado de uma menor colonização aparente por parte dos fungos filamentosos nos tecidos dos fragmentos pré-nodais e pós-nodais, que apresentaram, respectivamente, um total de oito e sete isolados expressos (Figura 2), uma vez que estes são fragmentos ocos nos quais os microrganismos endofíticos teriam menos tecidos disponíveis para colonização, ao passo que nos segmentos nodais, que apresentaram um total de 12 isolados expressos, a composição maciça do tecido permitiria maior espaço para colonização pelos microrganismos diversos.

Ainda neste sentido, os segmentos nodais aparentemente se comportam ainda como barreiras naturais à distribuição dos endofíticos no sentido do colmo em direção aos pontos mais distais ao longo dos entrenós, uma vez que para a maioria dos segmentos analisados, a região pré-nodal, com cinco isolados oriundos de ramificação primária e três de secundária, apresentou expressão de mais fungos filamentosos no total em detrimento das regiões pós-nodais, que embora tenha apresentado seis isolados provenientes de ramificações primárias, apenas apresentou um isolado a partir das ramificações secundárias.

Quanto à proximidade do ramo de origem dos isolados com relação ao colmo, existe um gradiente crescente dos ramos mais distais, secundários, em direção ao colmo, primários. Deste modo, é notável que os ramos secundários, a partir dos quais foram expressos nove isolados no total, apresentaram menos isolados fenotipicamente distintos ao longo de seus segmentos do que os ramos primários, que apresentaram 18 isolados no total.

Segundo Azevedo (2000), a principal porta de entrada para microrganismos endofíticos está nas raízes, e, portanto o tecido radicular estaria em especial mais intensamente colonizado, ao passo que em porções mais distantes destes tecidos há um decréscimo na intensidade da colonização devido à lenta mobilidade dos microrganismos ao longo dos tecidos. Deste modo, o decréscimo na quantidade de isolados apresentados nos ramos mais distais é justificado por sua distância relativa com relação ao colmo e, por conseguinte, às raízes, comportamento que também foi observado por Wearn et al. (2012). Uma circunstância similar já foi observada em outras espécies de bambu (*Phyllostachy* spp.) que apresentam a característica similar de *Bambusa vulgaris* de ser uma planta alta, onde os nós apresentaram uma maior quantidade de isolados que internódios e folhas, mas, por outro lado, em *Sasa* spp. as folhas apresentaram mais isolados do que os nós e os internódios, apresentando estes dois últimos um número similar de isolados (Morakotkarn et al. 2007). É importante ressaltar que o bambu *Sasa* spp. apresenta plantas geralmente mais baixas do que *B. vulgaris*, com folhas frequentemente próximas ao solo, que é a principal fonte de microrganismos para colonizar tecidos vegetais e assim a colonização observada preferencialmente nas folhas pode ser um reflexo da proximidade entre as folhas e o reservatório fundamental de microrganismos, capazes de estabelecer a colonização de tecidos vegetais, observando que as folhas apresentam aberturas naturais à colonização através dos estômatos (Azevedo 1998).

De acordo com Zhang et al. (2006) existe uma aparente co-evolução dos fungos com sua espécie hospedeira, onde os fungos têm se adaptado ao microambiente configurado pelos tecidos vegetais, e neste sentido o comportamento de alguns possíveis isolados de não crescer em meios de cultura sintéticos, próprios para fungos, pode se dever ao fato de que durante o isolamento *in vitro* as condições de crescimento estabelecidas na condição endofítica dos fungos expressos não podem ser reproduzidas artificialmente de forma efetiva. Mesmo dentre os isolados obtidos, que eram cultiváveis *in vitro*, foi possível observar pequenas alterações fenotípicas no tocante a aspectos como a coloração do verso das colônias quando comparados os estágios de manifestação do fungo mediante introdução do explante de bambu frente aos repiques de manutenção destes

isolados. Estas alterações nos fungos filamentosos estão relacionadas com a plasticidade destes microrganismos (Slepecky e Starmer 2009) e indicam que efetivamente a recuperação destes fungos a partir dos tecidos vegetais para o cultivo *in vitro* é uma alteração considerável de microhabitat à qual o fungo é sujeito.

Apenas os fungos cujo crescimento se deu a partir da expansão no meio de cultura foram possíveis de serem isolados e mantidos por repiques no cultivo *in vitro*. Estes fungos cultiváveis receberam códigos para catalogação e seguiram para identificação. Para todos os meios de cultura utilizados na introdução dos explantes (BHI, AN e BDA) foram obtidos isolados fúngicos. Entretanto, apenas isolados oriundos do meio de cultura BDA demonstraram-se cultiváveis, sendo observado que quando do isolamento dos fungos endofíticos do bambu em ambiente artificial de cultivo com mais elevadas fontes de nitrogênio do que de carbono, estes tendem a crescer nos próprios tecidos do bambu, em detrimento do meio de cultura, de modo que é possível que estes fungos consumam o carbono presente no próprio explante.

Para Ekanayake et al. (2012) as relações estabelecidas entre microrganismos endofíticos para com seus hospedeiros são complexas, de modo que a colonização de diferentes espécimes vegetais se configura num estudo dificilmente estimável em termos de diversidade, por estar sob influência de variáveis ainda pouco elucidadas no tocante à interação entres os genótipos das partes envolvidas.

No tocante à distribuição dos fungos filamentosos endofíticos cultiváveis, é possível notar que existe uma aparente preferência por parte dos fungos endofíticos na colonização dos tecidos do nó do bambu, de onde foram obtidos quatro isolados, com relação aos segmentos pré-nodais e pós-nodais, cada segmento com dois isolados (Tabela 1). Essa tendência se evidencia na análise do número de isolados obtidos a partir dos segmentos nodais, tanto em ramos primários, de onde foram oriundos dois isolados, como secundários, a partir do qual foram obtidos outros dois isolados, com relação aos demais segmentos.

Quanto à identificação dos fungos filamentosos, cinco dos oito isolados não formaram estruturas de reprodução em meio de cultura, impedindo a identificação morfológica clássica, sendo, portanto, considerados *Mycelia sterilia* (Tabela 2). Este comportamento demonstrado por microrganismos endofíticos, segundo Hyde e

Soytong (2008), é frequente e pode ser contornado pelo uso de ferramentas moleculares, entretanto é colocado por Ko et al. (2011) que o uso da identificação por biologia molecular de fungos endofíticos como ferramenta exclusiva pode ocasionar identificações equivocadas. No entanto, Slepecky e Starmer (2009) colocam que diversos fatores podem alterar as características fenotípicas de fungos filamentosos, tais como a fonte de carbono utilizada para cultivo, a idade da colônia, a temperatura de incubação, o tipo de substrato de cultivo e até mesmo o ciclo de luminosidade ao qual as colônias são expostas, o que os autores chamam de plasticidade fenotípica.

Diante do exposto, para o presente trabalho, as características macroscópicas das colônias bem como a identidade obtida por biologia molecular foram levadas em conta para identificação dos isolados, deixando a ressalva de que aos isolados que não apresentaram estruturas reprodutivas quando da microscopia, a identificação foi feita de forma indicativa. Dentre os isolados que apresentaram estruturas reprodutivas, foram identificados dois isolados pertencentes ao gênero *Curvularia*, que apresentaram estruturas reprodutivas típicas como presença de conidióforos sem ramificação e contendo conídios apresentando três septos, sendo estes levemente curvos, e um pertencente ao gênero *Fusarium*, marcado pela presença de clamidosporo e conídio fusiformes.

Quanto à identificação molecular dos isolados, os dados obtidos no GenBank® e analisados à luz das características morfológicas previamente registradas, permitiram a identificação de cinco diferentes espécies de fungos entre os oito isolados avaliados. As espécies *Hypoxyylon investiens*, *Daldinia eschsholtzii*, ambas representantes da família Xylariaceae (Ascomycota), previamente descritas como endofíticas colonizando colmos e troncos, respectivamente, dos vegetais arbóreos *Litsea akoensis* e *Fraxinus* sp. (Chang et al. 2014, Khalil et al. 2015), sendo a espécie *D. eschsholtzii*, descrita como colonizadora de internódios de outra espécie de bambu, *Dendrocalamus hamiltonii* (Bengyella et al. 2015). Dois isolados foram indicados como pertencentes à espécie *Curvularia lunata*, espécie da família Pleosporaceae (Ascomycota), também relatada como colonizadora de colmos de bambus dos gêneros *Bambusa* e *Dendrocalamus* (Hyde et al. 2002). Um dos isolados foi indicado pertencente à espécie *Fusarium solani*, fungo fitopatogênico

pertencente à família Nectriaceae (Ascomycota), previamente relatado como colonizador de tecidos de bambu da espécie *Dracaena sanderiana* (Abedi-Tizaki et al. 2016), e outro isolado foi indicado como *Bambusicola bambusae*, pertencente à família Bambusicolaceae (Ascomycota), um fungo tipicamente descrito como originário do bambu *Bambusa* sp. (Dai et al. 2012).

Dois isolados não se demonstraram possíveis de serem identificados, sendo um indicado a um isolado fúngico não descrito e outro a um isolado da classe Dothideomiceto (Ascomycota) também não descrito. Esta situação de sequências de fungos endofíticos que apresentam homologia com sequências não identificadas é um fenômeno previamente reportado por outros autores em estudos sobre os referidos microrganismos com uso do GenBank (Casella et al. 2013). De acordo com Nilsson et al. (2006) a frequência com que sequências da região ITS são depositadas no GenBank sem a descrição taxonômica mínima é uma tendência que tem dificultado o uso da base de dados para identificação, à medida que a mesma é alimentada com sequências que não estão devidamente identificadas, e não permitem portanto o uso das mesmas como indicação através do BLAST. Ainda neste sentido, Hibbett et al. (2011) destaca que as sequências ITS depositadas no GenBank oriundas de fungos, especialmente com origem ambiental, por vezes ainda não oferecem suporte que viabilize a identificação destes apenas através da base de dados.

Segundo Land et al. (2015), o estudo das populações microbianas ainda se dá de forma muito restrita devido às principais técnicas de avaliação ainda estarem ligadas a procedimentos de isolamento para posterior identificação de microbiotas, e de boa parte dos isolados não serem cultiváveis ou apresentarem difícil *cultivo in vitro*. Neste sentido, a abordagem metagenômica pode ser uma alternativa válida para levantamento das assembleias endofíticas totais de diferentes vegetais, sequenciando direto de todo o DNA presente em um ambiente, ou neste caso, tomando o vegetal como um microambiente, o que permitirá avaliar a assembleia endofítica deste em sua totalidade.

Conclusões

Diferentes aspectos acerca da colonização por fungos endofíticos do bambu foram elucidados. Foi notado um gradiente crescente de colonização por fungos em tecidos mais próximos ao colmo e ficou demonstrada a dificuldade do crescimento e desenvolvimento deste fungos em meio de cultura. Foi caracterizada uma assembleia de cinco espécies diferentes de fungos endofíticos cultiváveis a partir dos tecidos do bambu (*Bambusa vulgaris*).

Agradecimentos

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste pelos recursos estruturais, materiais e financeiros que viabilizaram esta pesquisa, e aos colaboradores que contribuíram com a realização do presente trabalho, em especial à taxonomista Flávia Coutinho pelo suporte dado à identificação por microscopia dos fungos.

Referências

- Abedi-Tizaki M, Zafari D, Sadeghi J. 2016. First report of *Fusarium solani* causing stem rot of *Dracaena* in Iran. J Plant Prot Res 56: 100-103.
- Almeida J. 2016. Potencialidades do bambu. Sustentabilidade em Debate 7: 178-195.
- Araújo LW, Lima AOS, Azevedo JL, Marconi J, Sobral JK, Lacava PT. 2002. Manual: isolamento de microrganismos endofíticos. Piracicaba: CalQ, 86p.
- Azevedo JL, Maccheroni Jr W, Pereira JO, Araújo WL. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. Electron J Biotechnol 3: 15-16.
- Azevedo JL. 1998. Microrganismos endofíticos. In: MELO IS, AZAVEDO JL. (Coords) Ecologia microbiana. Jaguariúna: EMBRAPA, p. 117-137.
- Bengyella L, Waikhom SD, Talukdar NC, Roy P. 2015. Black List of Unreported Pathogenic Bambusicolous Fungi Limiting the Production of Edible Bamboo. J Plant Pathol Microbiol 6: 1.
- Bueno CJ, Ambrósio MMQ, Souza NL. 2006. Preservação de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. Summa Phytopathol 32: 42-50.

- Casella TM, Eparvier V, Mandavid H, Bendelac A, Odonne G, Dayan L, Dublais C, Espindola, LS, Stien D. 2013. Antimicrobial and cytotoxic secondary metabolites from tropical leaf endophytes: isolation of antibacterial agent pyrrocidine C from *Lewia infectoria* SNB-GTC2402. *Phytochemistry*, 96: 370-377.
- Chang CW, Chang HS, Cheng MJ, Liu TW, Hsieh SY, Yuan G F, Chen IS. 2014. Inhibitory Effects of Constituents of an Endophytic Fungus *Hypoxyton investiens* on Nitric Oxide and Interleukin-6 Production in RAW264. 7 Macrophages. *Chem Biodivers* 11: 949-961.
- Dai D, Bhat DJ, Liu J, Chukeatirote E, Zhao R, Hyde KD. 2012. *Bambusicola*, a new genus from bamboo with asexual and sexual morphs. *Cryptogam Mycol* 33(3), 363-379.
- Ekanayake PN, Hand ML, Spangenberg GC, Forster J W, Guthridge KM. 2012. Genetic diversity and host specificity of fungal endophyte taxa in fescue pasture grasses. *Crop Sci* 52: 2243-2252.
- Hibbett DS, Ohman A, Glotzer D, Nuhn M, Kirk P, Nilsson RH. 2011. Progress in molecular and morphological taxon discovery in Fungi and options for formal classification of environmental sequences. *Fungal Biol Rev* 25: 38-47.
- Hyde KD, Soyong K. 2008. The fungal endophyte dilemma. *Fungal Divers* 33: 2.
- Hyde KD, Ho WH, Mckenzie EHC, Dalisay T. 2002. Saprobiic fungi on bamboo culms. *Fungal Divers* 7: 35-48.
- Khalil AM, Lee HM, Sharples GP, Sihanonth P, Suwannasai N, Sangvichien E, Whalley MA, Whalley AJ. 2015. *Daldinia*: The nature of its concentric zones. *Mycoscience* 56: 542-548.
- Ko TWK, Stephenson SL, Bahkali AH, Hyde KD. 2011. From morphology to molecular biology: can we use sequence data to identify fungal endophytes?. *Fungal Divers* 50: 113-120.
- Land M, Hauser L, Jun SR, Nookaew I, Leuze MR, Ahn TH, Karpinets T, Lund O, Kora G, Wassenaar T, Poudel S, Ussery DW. 2015. Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. *Funct Integr Genomics* 15: 141-161.
- Liese W, Tang TKH. 2015. Properties of the bamboo culm. In LIESE W, KOHL M. (Eds.) *Tropical forestry, bamboo: the plant and its uses*. Switzerland: Springer International Publishing. p. 227–256.

- Morakotkarn D, Kawasaki H, Seki T. 2007. Molecular diversity of bamboo-associated fungi isolated from Japan. *FEMS Microbiol Lett* 266: 10-19.
- Nilsson RH, Ryberg M, Kristiansson E, Abarenkov K, Larsson KH, Kõljalg U. 2006. Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: a fungal perspective. *PLoS One* 1: e59.
- Oliveira JF, Lemos EEP, Rezende LP. 2012. Desenvolvimento de métodos de micropropagação para produção de mudas de bambu - *Bambusa nutans* G.C. Wall ex Munro. *Ciências Agrícolas* 10: 25-29.
- Redko F, Clavin M, Weber D, Anke T, Martino V. 2006. Search for active metabolites of *Erythrina crista-galli* and its endophyte *Phomopsis* sp. *Mol Med Chem* 10: 24-26.
- Slepecky RA, Starmer WT. 2009. Phenotypic plasticity in fungi: a review with observations on *Aureobasidium pullulans*. *Mycologia* 101: 823-832.
- Sola MC, Oliveira AP, Feistel JC, Rezende CSM. 2012. Manutenção de Microrganismos: Conservação e Viabilidade. *Enciclopédia Biosfera* 8: 1398-1418.
- Tortora GJ, Funke BR, Case AL. 2006. *Microbiologia*. 8ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 934 p.
- Wearn JA, Sutton BC, Morley NJ, Gange AC. 2012. Species and organ specificity of fungal endophytes in herbaceous grassland plants. *J Ecol* 100: 1085-1092.
- White TJ, Bruns T, Lee SJWT, Taylor JW. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications* 18: 315-322.
- Zhang HW, Song YC, Tan RX. 2006. Biology and chemistry of endophytes. *Nat Prod Rep* 23: 753-771.

Figuras e Tabelas

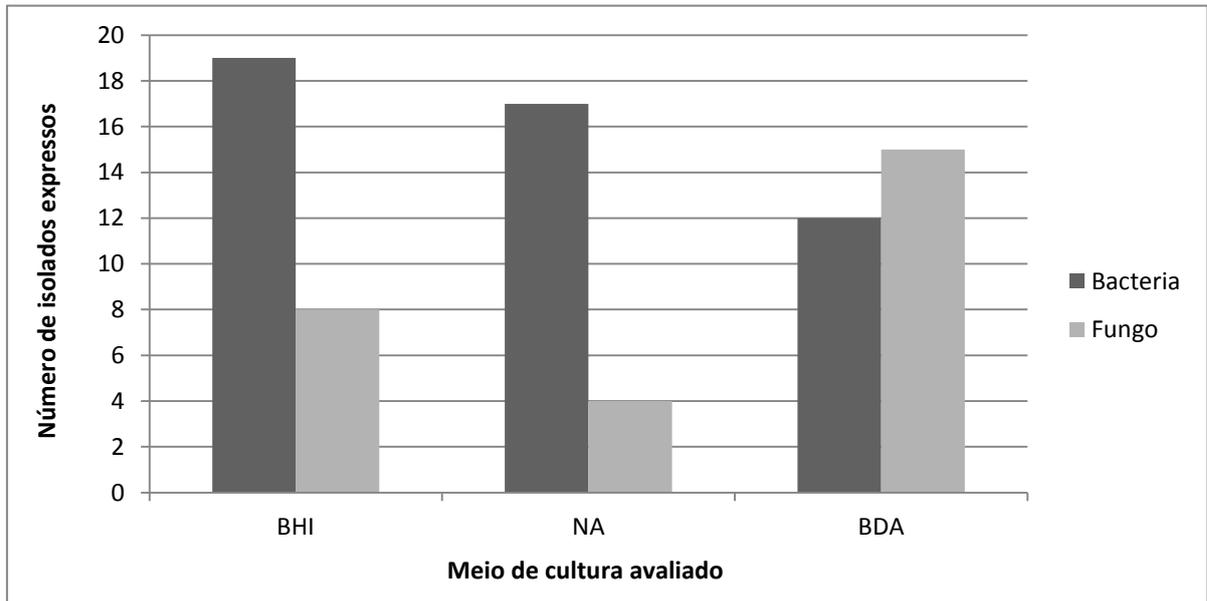


Figura 1. Expressão de microrganismos endofíticos por meio de cultura avaliado.

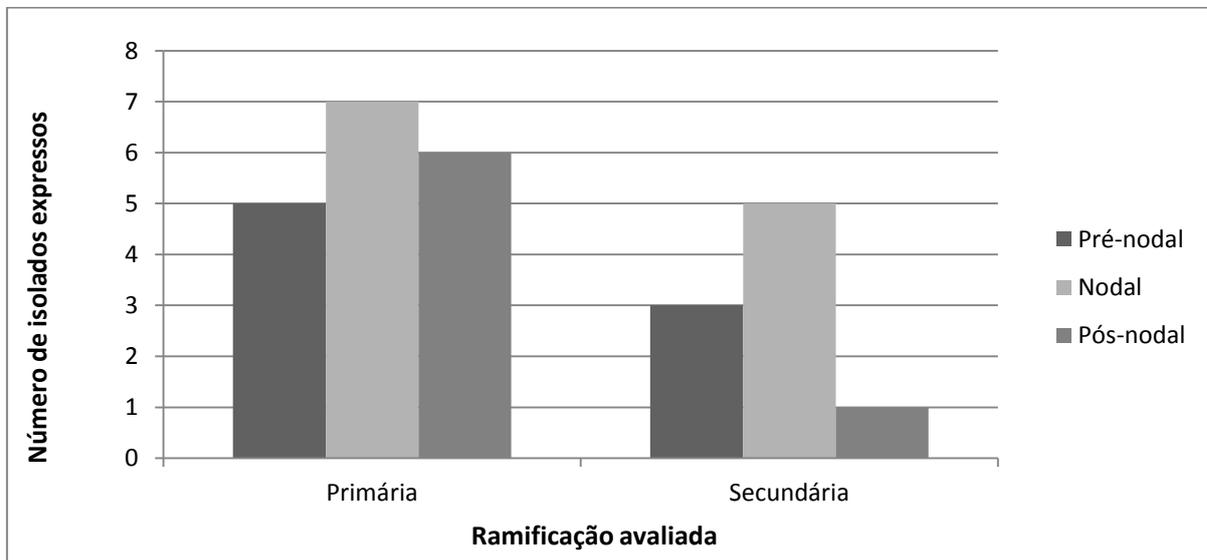


Figura 2. Expressão de fungos filamentosos endofíticos por segmento e ramificação avaliados.

Tabela 1. Distribuição dos isolados de fungos filamentosos cultiváveis obtidos ao longo das ramificações e segmentos do bambu avaliados.

Código	Identificação	
	Ramificação	Segmento
CTNFB01a	Primária	Pós-nodal
CTNFB01b	Primária	Pós-nodal
CTNFB02	Secundária	Nodal
CTNFB03	Primaria	Nodal
CTNFB04	Primaria	Pré-nodal
CTNFB05	Secundária	Nodal
CTNFB06	Secundária	Pré-nodal
CTNFB07	Primária	Nodal

Tabela 2. Identificação através da morfologia macro e microscópica, e através do sequenciamento do fragmento ITS dos isolados de fungos filamentosos cultiváveis obtidos.

Código	Identificação	
	Morfologia	rDNA (ITS)
CTNFB01a	<i>Mycelia sterilia</i>	<i>Hypoxylon investiens</i>
CTNFB01b	<i>Mycelia sterilia</i>	<i>Daldinia eschsholtzii</i>
CTNFB02	<i>Curvularia</i> sp.	<i>Curvularia lunata</i>
CTNFB03	<i>Curvularia</i> sp.	<i>Curvularia lunata</i>
CTNFB04	<i>Mycelia sterilia</i>	Isolado fungico não descrito
CTNFB05	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium solani</i>
CTNFB06	<i>Mycelia sterilia</i>	<i>Bambusicola bambusae</i>
CTNFB07	<i>Mycelia sterilia</i>	Dothideomycetes

CAPÍTULO 3

PERFIL ENZIMÁTICO E ANTIMICROBIANO DE FUNGOS FILAMENTOSOS ENDOFÍTICOS DO BAMBU (*Bambusa vulgaris*)

Resumo: O bambu é uma gramínea cuja cultura foi apontada como potencialmente interessante para a agricultura no Brasil. Pouco se sabe sobre as relações entre o bambu com sua microflora natural, endofítica, que pode apresentar propriedades metabólicas de interesse para aplicação em processos biotecnológicos de valor econômico. Este estudo objetivou a prospecção de fungos endofíticos filamentosos de bambu com potencial competência para a produção de enzimas de interesse biotecnológico, bem como para isolados que produzem metabólitos com atividade antibiótica. Foram realizados testes para produção de amilase e lipase e teste de atividade antimicrobiana. Para produção de enzimas, o isolado fúngico mais promissor foi CTNFB06 (*Bambusicola bambusae*), com produção de ambas as enzimas avaliadas. Para atividade antimicrobiana contra *E. coli*, os isolados CTNFB02 e CTNFB03, ambos de *Curvularia lunata*, foram os mais promissores apresentando concentrações inibitórias de 125 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. Para atividade contra *S. aureus*, os melhores resultados foram os dos isolados CTNFB04 (não identificado), CTNFB05 (*Fusarium solani*) e CTNFB06 (*B. bambusae*) com concentração 7,8 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. O Deuteromiceto não identificado CTNFB07 apresentou a melhor atividade contra cepa MRSA, na concentração de 15,6 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. Deste modo, foi demonstrado o potencial biotecnológico dos fungos filamentosos endofíticos de bambu para produção de enzimas e atividade antimicrobiana.

Palavras-chave: Amilase, antibiótico, *Bambusa vulgaris*, lipase.

Enzymatic and antimicrobial profile of endophytic filamentous fungi from bamboo (*Bambusa vulgaris*)

Abstract: Bamboo is a grass whose culture has recently gained agricultural interest in Brazil. Little is known about the relations between the bamboo with its natural microflora, endophytic, which may present metabolic properties of interest for application in biotechnological processes with economic value. This study aimed the prospection of bamboo filamentous endophytic fungi with potential competence for the production of enzymes with biotechnological interest, as well as isolates that produce metabolites with antibiotic activity. Tests were performed for amylase and lipase production and antimicrobial activity testing. In concern to the production of enzymes, the most promising fungal isolate was CTNFB06 (*Bambusicola bambusae*), with production of both enzymes evaluated. For antimicrobial activity against *E. coli*, the CTNFB02 and CTNFB03 isolates, both from *Curvularia lunata*, were the most promising with inhibitory concentrations of 125 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. For activity against *S. aureus*, the best results were the isolates CTNFB04 (unidentified), CTNFB05 (*Fusarium solani*) and CTNFB06 (*B. bambusae*) with concentration 7.8 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. The unidentified Deuteromycete CTNFB07 showed the best activity against strain MRSA, at the concentration of 15.6 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. In this way, the biotechnological potential of bamboo endophytic filamentous fungi for the production of enzymes and antimicrobial activity was demonstrated.

Keywords: Amylase, antibiotic, *Bambusa vulgaris*, lipase.

Introdução

O bambu é uma gramínea amplamente utilizada pela sociedade humana desde a construção e movelaria, até a alimentação (Pereira e Beraldo 2007), tendo recentemente ganho interesse por parte do governo brasileiro no tocante à implementação de sua cultura à matriz agrícola do Brasil através da Lei 12.484 de 8 de setembro de 2011 que trata da Política Nacional de Incentivo ao Manejo Sustentado e ao Cultivo do Bambu. Este vegetal embora conhecido e cultivado há muito tempo em todo o planeta, ainda foi pouco estudado e explorado quanto às potencialidades biotecnológicas de sua comunidade microbiana endofítica e as complexas relações estabelecidas por esta comunidade com seu hospedeiro.

Os fungos endofíticos são aqueles capazes de colonizar os tecidos de um vegetal hospedeiro sem causar danos aparentes aos tecidos colonizados, e apresentando comunidades com diferentes composições específicas em diferentes vegetais hospedeiros (Schulz e Boyle 2005). No processo de colonização endofítica os organismos envolvidos nessa relação simbiótica tendem a interagir metabolicamente, e neste sentido os microrganismos endofíticos têm demonstrado propriedades de interesse para além do ecológico, mas comercial, desde a promoção do crescimento do vegetal hospedeiro até a produção de compostos com alto valor biotecnológico (Suryanarayanan *et al.* 2012; Kusari *et al.* 2014).

Fungos endofíticos podem apresentar a capacidade de produzir e excretar em fermentações líquidas compostos com ação antimicrobiana variada, dentre esses compostos é possível citar achados bioativos com atividade igual ou até mesmo superior à de drogas comercializadas atualmente e amplamente empregadas no tratamento de infecções bacterianas (Vaz *et al.* 2012). Além da abordagem no sentido da prospecção de compostos com valor farmacológico que os fungos endofíticos podem apresentar, a propriedade destes fungos de produzir diversas enzimas com valor industrial é frequentemente atribuída a estes, tendo destaque as enzimas amilases e lipases empregadas em diversos segmentos industriais (Corrêa *et al.* 2014; Kharwar *et al.* 2014).

Os mencionados fungos endofíticos apresentam uma relação espécie-específica de tendência na colonização de espécimes vegetais, de modo que diferentes

espécies e cepas fúngicas são caracteristicamente encontradas em diferentes plantas, sendo que a prospecção destes fungos a partir de novas fontes ainda pouco exploradas, como é caso do bambu, faz-se de grande valia. Bem como, a caracterização do perfil de produção de enzimas e compostos com atividade antimicrobiana por meio dos novos isolados é uma ferramenta de alto valor para obtenção de novos produtos biotecnológicos (Azevedo 2014).

Diferentes propriedades com potencial biotecnológico são expressas por microrganismos endofíticos, e nesse sentido, a prospecção de atividades de interesse a partir de microrganismos obtidos de novas fontes, como é o caso do bambu, cuja microbiota ainda foi pouco explorada, pode ser não somente uma fonte para isolados microbianos promissores, como pode ainda elucidar questões inerentes à complexidade de interações entre o vegetal hospedeiro e sua microbiota. Assim sendo, o presente trabalho teve por objetivos avaliar a aplicação biotecnológica dos fungos endofíticos encontrados em plântulas de bambu clonadas *in vitro* para produção de enzimas e de líquidos metabólicos brutos com atividade antimicrobiana.

Material e Métodos

Foram utilizados oito isolados de fungos filamentosos previamente obtidos e preservados a partir da contaminação endofítica expressa *in vitro* quando da introdução de bambu (*Bambusa vulgaris* Schrad. ex J.C.Wendl.) por micropropagação, foram disponibilizados pelo Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE). Os isolados utilizados foram CTNFB01a - *Hypoxylon investiens*, CTNFB01b - *Daldinia eschsholtzii*, CNTFB02 - *Curvularia lunata*, CTNFB03 - *Curvularia lunata*, CTNFB04 – fungo filamentoso não identificado, CTNFB05 - *Fusarium solani*, CTNFB06 - *Bambusicola bambusae* e CTNFB07 - Dothideomiceto não identificado.

- **Avaliação da atividade enzimática**

Para determinação da atividade enzimática os fungos foram inoculados em placas de Petri com meios específicos contendo substratos para a produção de enzimas extracelulares de interesse industrial.

Os testes para avaliar a atividade enzimática foram estabelecidos por meio da avaliação de degradação do amido e a degradação de lipídios, de acordo com o protocolo de Hankin e Anagnostakis (1975). Foram utilizados como substrato de degradação o amido solúvel a 1% (p/v) para atividade amilolítica, e o detergente Tween 20 a 1% (v/v) para atividade lipolítica. Cada isolado foi previamente cultivado em meio de cultura BDA HIMEDIA®, por 5 dias a 32 °C. Blocos padronizados de crescimento fúngico foram retirados dos meios de cultura nos quais estes estavam e foram então sobrepostos ao centro de novos meios de cultura sólidos, contendo os substratos de degradação, distribuídos em placas de Petri. As placas foram vedadas e incubadas em B.O.D. por cinco dias a 37 °C.

Para leitura do teste de atividade amilolítica, foi adicionada à placa de Petri contendo o teste 2 mL de Lugol (solução de iodo com iodeto de potássio 1:5), de modo que o iodo presente na solução é capturado pelas duas moléculas de polissacarídeos (amilose e amilopectina) constituintes da estrutura básica do amido presente no meio, formando um complexo de tom arroxeadado (Macfaddin 2000). Foram considerados como positivos os testes que demonstraram a formação de um halo translúcido ao redor da colônia, mediante adição do revelador, indicando quebra do amido na área não pigmentada.

O teste de atividade lipolítica foi avaliado como positivo mediante a formação de cristais de sal de cálcio em disposição concêntrica no entorno da colônia, oriundos do ácido láurico liberado pela enzima lipase, ou mediante a formação de zonas claras em volta da colônia, oriundas da degradação completa de sal do ácido gorduroso, quando da placa visualizada a olho nu contra uma fonte luminosa. Deste modo, este teste não necessitou da adição de soluções reveladoras (Hankin e Anagnostakis 1975).

A determinação da atividade enzimática (Pz) para os substratos avaliados foi realizada conforme descrito por Cuzzi *et al.* (2011), de modo que a atividade (Pz) de cada isolado decorreu da razão entre o diâmetro da colônia (dc) e o diâmetro da colônia mais a área de precipitação (dcp), ou seja, o diâmetro de crescimento

fúngico mais a área do halo de degradação. O valor de Pz foi obtido pela média das triplicatas dos testes e os resultados destes foram classificados como negativos (não ocorrência de halos, ou $Pz = 1$, classe 1), positivos (ocorrência de halo, sendo que $0,64 = Pz < 1$, classe 2) e fortemente positivos (ocorrência de halo, sendo que $Pz < 0,64$, classe 3), onde $Pz = dc / dcp$.

- **Avaliação da atividade antimicrobiana**

Para a atividade antimicrobiana *in vitro* os isolados fúngicos foram cultivados em meio de cultura líquido Caldo Sabouraud HIMEDIA® e após 15 dias de incubação sob agitação periódica, a temperatura ambiente, o líquido metabólico foi separado da massa micelial por filtração em papel de filtro estéril e posteriormente, por filtro de 0,45 µm Millipore®. Para os testes de atividade antimicrobiana foram utilizados os líquidos metabólicos brutos dos fungos.

Foram utilizados para os testes de atividade antimicrobiana três linhagens de bactérias patogênicas ao ser humano, sendo duas provenientes de coleção de cultura de modo que foram empregadas uma Gram-negativa, *Escherichia coli* ATCC 25922, e uma Gram-positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, além de cepa clínica de MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.

O teste de atividade antimicrobiana foi conduzido segundo técnica M07-A9 do CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2012) adaptada em triplicata. Foram distribuídos 80 µL do meio caldo Mueller-Hinton (MH) HIMEDIA® em todos os poços da placa, em seguida, foi adicionado 80 µL de cada líquido bruto na 1ª fileira da placa (sentido vertical). Posteriormente, com auxílio do multipipetador foi feita a diluição dos líquidos até os poços da fileira 11. Foi preparada uma suspensão bacteriana correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland com solução salina 0,9%, correspondente a uma concentração de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ para bactérias. Depois, foram distribuídos 20 µL da suspensão bacteriana a cada poço na placa, exceto os poços das 11 e 12 fileiras. Quando depositada nos poços a suspensão bacteriana foi diluída na proporção de 1:9, mantendo aproximadamente $1,5 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹. Os poços da fileira 11 contiveram apenas o caldo MH e os líquidos, ao passo que os da fileira 12 contiveram os controles de crescimento bacteriano positivo (meio de cultura adicionado do inóculo), controle de esterilidade

do meio (meio de cultura puro), e controle de atividade antimicrobiana positiva (meio de cultura acrescido do inóculo e o agente antibiótico Cloranfenicol 0,05 mg.mL⁻¹). A placa foi vedada e incubada na estufa a 37 °C por 24 h, sendo observada a menor concentração dos metabólitos que teve ação de inibir o crescimento bacteriano.

Após a incubação de crescimento, adicionou-se 10 µL de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) (5% v/v) em água, a cada poço das placas, que foram levadas para incubação de revelação durante 30 minutos a 36 °C ± 1 °C, para verificar o crescimento bacteriano. Nos poços onde as amostras não apresentam ação antimicrobiana, ocorre a formação da coloração vermelha. Essa coloração se deve à reação do TTC com os íons hidrogênio formados durante a respiração celular, e que origina uma substância vermelha e insolúvel, conhecida como Formazan, indicando a presença de células bacterianas viáveis no meio (Johnson *et al.* 1985; Rahman *et al.* 2004). O uso do TTC permitiu verificar a CIM (Concentração Inibitória Mínima) de ação dos líquidos brutos, sendo considerado como o correspondente à CIM o primeiro poço de menor concentração em que não houve mudança na coloração do meio, o que indica ausência de células viáveis.

Como no presente trabalho os líquidos metabólicos foram testados em seu estado bruto, sem a separação dos compostos neles contidos, a atividade antimicrobiana foi avaliada no tocante às concentrações inibitórias determinadas para o método: 500,00; 250,00; 125,00; 62,50; 31,25; 15,63; 7,81 3,91; 1,95 e 0,97 µL.mL⁻¹.

- **Análise estatística dos ensaios**

Os ensaios para atividade enzimática foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado com três repetições. Os dados experimentais obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e a comparação de médias pelo Teste de Tukey, para os testes enzimáticos, a 5% de significância, através do software estatístico Assistat na versão 7.7 Beta. Quanto aos ensaios dos testes para atividade antimicrobiana, estes foram conduzidos em delineamento experimental em blocos casualizados com três repetições. Os dados experimentais obtidos foram submetidos à análise de variância não-paramétrica, pelo Teste de

Kruskal-Wallis a 5% de significância, também através do software estatístico Assistat na versão 7.7 Beta.

Resultados

Dentre os oito isolados testados, cinco apresentaram atividade enzimática positiva, sendo um destes capaz de degradar ambos substratos avaliados, conforme Tabela 1. Os testes, avaliados em conjunto, apresentaram um coeficiente de variação (CV%) de 3,09 e 5 grupos estatisticamente distintos. As atividades enzimáticas positivas obtidas no teste amilolítico variaram de 0,25 a 0,86, ao passo que no teste lipolítico as atividades enzimáticas variaram entre 0,41 e 0,81.

A análise dos dados demonstra que o isolado CTNFB06 da espécie *Bambusicola bambusae* apresentou os melhores resultados, com atividade enzimáticas inferiores a 0,64, sendo a atividade amilolítica de 0,25 e a lipolítica de 0,43. O destaque para este isolado se dá não só em termos de intensidade da atividade enzimática, mas em espectro de degradação, sendo que o mesmo apresentou resultados categorizados fortemente positivos para ambos os substratos testados, amido e Tween 20, de modo que este se apresentou como promissor para processos biotecnológicos enzimáticos.

Todos os líquidos brutos dos isolados avaliados apresentaram atividade antimicrobiana frente a bactérias patogênicas ao homem (Tabela 2), sendo esta demonstrada em diferentes concentrações para as categorias microbianas avaliadas, sendo os resultados mais promissores relativos aos testes frente a bactérias Gram-positivas não resistentes.

No tocante aos resultados obtidos quanto à atividade antimicrobiana frente à *Escherichia coli*, é possível observar que os líquidos metabólicos que apresentaram melhores atividades foram os oriundos dos isolados CNTFB02 e CTNFB03, ambos da espécie *Curvularia lunata*, e CNTFB05, da espécie *Fusarium solani*, ativos até a diluição de 150 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. Os demais líquidos testados apresentaram atividade em concentrações de 250 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, a exceção do Dothideomiceto CNTFB07 que só apresentou atividade na concentração de 500 $\mu\text{L.mL}^{-1}$.

Quanto aos testes frente à linhagem de *Staphylococcus aureus*, não resistente, os líquidos metabólicos apresentaram atividades a concentrações ainda

menores quando comparados aos resultados para a linhagem de *E. coli*. Os isolados cujos líquidos apresentaram resultados mais promissores foram o fungo não identificado CTNFB04, o *F. solani* CNTFB05 e o *B. bambusae* CTNFB06, todos com CIM de $7,81 \mu\text{L.mL}^{-1}$. É possível ainda observar que à exceção do *Hypoxylon investiens* CTNFB01a, todos os outros isolados geraram líquidos com atividade em CIM ainda mais baixas frente à bactéria Gram-positiva não resistente, em detrimento da Gram-negativa.

A avaliação dos testes de atividade antimicrobiana frente à linhagem de *S. aureus* resistente apresentou os resultados menos promissores em termos de número de líquidos com atividade, com apenas três resultados positivos, entretanto, vale notar que o líquido oriundo do Dothideomiceto CTNFB07, que havia apresentado a atividade mais baixa frente à bactéria Gram-negativa, mas que apresentou atividade mesmo em concentrações baixas ($15,63 \mu\text{L.mL}^{-1}$) frente à linhagem Gram-positiva não resistente, manteve atividade antimicrobiana frente à linhagem resistente em concentração equiparável à anteriormente citada.

Discussão

Quanto à atividade amilolítica, apenas dois isolados apresentaram atividade positiva, sendo eles CTNFB03 - *Curvularia lunata* e CTNFB06 - *Bambusicola bambusae*. Este resultado se contrapõe à expectativa de que fungos endofíticos apresentem atividade degradativa alta para substratos aos quais estão sujeitos em seu ambiente natural. Enquanto polissacarídeo de reserva energética vegetal, o amido se apresenta na forma de pequenos grânulos nos tecidos fotossintéticos em muitos tipos de órgãos de armazenamento das plantas, tais como sementes, caules e raízes. Segundo Azzini e Ciaramello (1971) os colmos de bambu apresentam teor de amido na ordem de 8,53%, portanto seria esperado que os fungos capazes de habitar estes colmos tivessem atividade degradativa sobre este substrato, e uma vez que essa atividade não se traduziu nos testes realizados, os resultados indicam que estes fungos podem estar em equilíbrio tal com o vegetal hospedeiro que os nutrientes disponibilizados pelo último por si só satisfazem as necessidades nutricionais de sua comunidade endofítica. Em contrapartida, segundo Tamolang *et al.* (1980), 45% do lenho da espécie *B. vulgaris* é composto por celulose de modo

que a ausência de atividade degradativa para o polissacarídeo amido pode se configurar numa indicação possível de que os fungos em questão se utilizem de outras fontes de polissacarídeos presentes nos vegetais, tais como celulose e xilose, para obtenção de carbono.

Mais da metade dos isolados apresentou atividade lipolítica positiva, essa propriedade pode estar ligada à promoção de processos que ataquem a parede celular, sendo uma competência coerente para fungos que precisam transpor as barreiras dos tecidos envoltórios dos vegetais para colonizá-los. A produção de enzimas líticas tais como pectinases, celulases e lipases, pode estar associada à facilitação da entrada dos endofíticos no tecido vegetal por mecanismos ativos, sendo que essas enzimas funcionam também como um mecanismo de resistência dos microrganismos frente às defesas do hospedeiro contra a colonização microbiana (Tan e Zou 2001).

Segundo Jimenez *et al.* (1996), é possível serem observadas baixas atividades enzimáticas por isolados de regiões tropicais, sendo este comportamento ocasionado por dificuldades de visualização da produção destas enzimas em meio sólido, especialmente quando da avaliação dos testes após um curto período de incubação. Entretanto Mendes *et al.* (2015) obtiveram resultados positivos para produção enzimática fúngica em um intervalo de incubação relativamente curto (5 dias), e semelhante ao adotado no presente trabalho. Esta prospecção por isolados que apresentem atividade satisfatória em tempo diminuto se justifica ao passo que, segundo Bon *et al.* (2008), a prospecção deve visar atividades com potencial biotecnológico que aperfeiçoem os processos, aumentando sua eficiência.

O comportamento verificado nos testes de atividade antimicrobiana em serem obtidos resultados mais promissores frente a bactérias Gram-positivas em detrimento das Gram-negativas era esperado uma vez que segundo Guimarães *et al.* (2010), bactérias Gram-negativas são mais resistentes à ação de antibióticos, em decorrência da natureza complexa da parede celular das mesmas, que não permite que os antibióticos transpassem efetivamente a barreira lipídica da camada externa dessas bactérias.

No tocante à cepa de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), esta produz β -lactamases que inativam antimicrobianos β -lactâmicos, os quais correspondem às

penicilinas naturais e às semissintéticas, sendo que as últimas compreendem a maior parte dos antibióticos correntemente empregados (Gelband *et al.* 2015). Deste modo a manifestação de resultados positivos para ação antimicrobiana frente à cepa MRSA, obtida para os produtos metabólicos dos fungos *Daldinia eschsholtzii* CTNFB01b, *Curvularia lunata* CTNFB02, e principalmente do Dothideomiceto CTNFB07, que apresentou atividade mesmo em concentrações baixas (15,63 $\mu\text{L.mL}^{-1}$) e ainda mantendo os resultados observados frente à cepa não-resistente pode ser uma indicação de que estes fungos produzam compostos promissores com ação antimicrobiana que tenham estruturas diferentes das β -lactâmicas. De fato, é descrito por Kongyen *et al.* (2015), o isolamento de compostos não β -lactâmicos com atividade frente *S. aureus* e MRSA, a partir tanto de extratos do micélio como do meio de cultura de um isolado endofítico de *Daldinia eschscholtzii*. O comportamento de alguns líquidos em não manter atividade antimicrobiana frente à cepa resistente pode ter ocorrido como uma indicação de que os líquidos destes fungos apresentem como produtos de seu metabolismo secundário compostos com propriedade antibacteriana de estrutura β -lactâmica à qual a cepa MRSA é resistente.

É importante salientar que a resistência aos agentes antimicrobianos é uma questão preocupante em termos de saúde pública global, de modo que a resistência à metilicina por parte de cepas de *S. aureus* torna difícil o tratamento e o controle de infecções causadas por estes, ao passo que o grupo referido é resistente à maioria dos antibióticos disponíveis no mercado (Rodvold e McConeghy 2014). Neste contexto a atividade de metabólitos secundários fúngicos frente a bactérias resistentes, como o apresentado pelos isolados endofíticos avaliados, é uma importante ferramenta para a prospecção de novos compostos antibióticos capazes de auxiliar no controle e tratamento das infecções causadas pelos referidos organismos.

No processo de co-evolução do qual são partes os fungos endofíticos e suas plantas hospedeiras é estabelecida uma intimidade metabólica tal capaz de permitir que estes fungos cheguem a produzir os mesmos compostos bioativos, ou similares, aos produtos classicamente originários da planta hospedeira (Zhao *et al.* 2011). Segundo Ogunjinmi *et al.* (2009) e Solanki (2011), em estudos etnobotânicos sobre

o bambu, *B. vulgaris*, foi relatado o uso do bambu para tratamento de diarreia, disenteria e doenças de pele, perturbações frequentemente ocasionadas por *E. coli* e *S. aureus* respectivamente (Santos *et al.* 2007; Pércope 2015). No presente trabalho, os fungos endofíticos avaliados apresentaram atividade frente a linhagens de *S. aureus* e *E. coli*, os mesmos patógenos para os quais foram testados extratos de folhas e broto de *Bambusa vulgaris*, os quais apresentaram atividade inibitória positiva (Wu *et al.* 2008; Naidu 2012). Neste sentido, a atividade antibiótica apresentada pelos fungos endofíticos *in vitro* frente aos mesmos organismos para os quais é relatada atividade dos extratos vegetais de bambu. *S. aureus* e *E. coli*, pode indicar a conseqüente ocorrência da mencionada coesão metabólica estabelecida entre a microbiota endofítica com seu vegetal hospedeiro.

O bambu tradicionalmente é relatado como um vegetal que apresenta poucas doenças, sendo reportados como agentes causadores destas um total de 440 fungos, dois vírus, um fitoplasma e uma bactéria (CBTC 2007). Portanto a atividade antibacteriana dos metabólitos de fungos endofíticos do bambu, embora obtida no presente trabalho para bactérias patogênicas ao ser humano, pode estar associada à presença de fungos endofíticos que tenham a propriedade de inibir ou controlar o crescimento de bactérias fitopatogênicas.

Conclusões

Alguns fungos endofíticos de *Bambusa vulgaris* apresentam potencial para aplicação biotecnológica na produção de enzimas industriais, sendo capazes de produzir amilase e lipase, bem como apresentaram ainda atividade antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e MRSA até mesmo em baixas concentrações.

Agradecimentos

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste pelos recursos estruturais e financeiros que viabilizaram esta pesquisa, e aos colaboradores que contribuíram com o trabalho.

Referências

- Azevedo, J.L. 2014. Endophytic Fungi from Brazilian tropical hosts and their biotechnological applications. In: Kharwar, R.N.; Upadhyay, R.S.; Dubey, N.K.; Raghuwanshi, R. (Ed.). *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security*. Springer India, p. 17-22.
- Azzini, A.; Ciaramello, D. 1971. Bamboo as a raw material for the pulp and paper industry. IV - Study of *Bambusa tuldoides*, *B. textilis*, *B. ventricosa*, *B. malingensis* and *B. dissimulator* in the production of kraft pulp. *Bragantia*, 30: 305-3019.
- Bon, E.P.S.; Pereira Jr., N.; Gottschalk, L.M.F.; Sá-Pereira, P.; Roseiro, J.C.; Ferrara, M.A. 2008. Bioprocessos para a produção de enzimas. In: Bon, E.P.S.; Ferrara, M.A.A.; Corvo, M.L. (Ed.). *Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. Interciência, Rio de Janeiro, p. 95-122.
- Casella, T.M; Eparvier, V.; Mandavid, H.; Bendelac, A.; Odonne, G.; Dayan, L.; Dublais, C.; Espindola, L.S.; Stien, D. 2013. Antimicrobial and cytotoxic secondary metabolites from tropical leaf endophytes: isolation of antibacterial agent pyrrocidine C from *Lewia infectoria* SNB-GTC2402. *Phytochemistry*, 96: 370-377.
- CBTC - Cane and Bamboo Technology Center. *Training manual on nursery raising, commercial plantation, preservation and primary processing of bamboo*. India: Bamboo Technical Support Group for National Bamboo Mission. 2007. Disponível em: < <http://www.drcsc.org/VET/library/Nursery/Bamboo%20nursery.pdf>>. Acesso em: 15 Fev. 2016.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; Approved Standard, Ninth Edition (M07-A9), 2012.
- Corrêa, R.C.G.; Rhoden, S.A.; Mota, T.R.; Azevedo, J.L.; Pamphile, J.A.; Souza, C.G.M.; Polizeli, M.L.T.M.; Bracht, A.; Peralta, R.M. 2014. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 41: 1467-1478.
- Cuzzi, C.; Link, S.; Vilani, A.; Onofre, S. B.. 2011. Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de *Baccharis Dracunculifolia* DC (ASTERACEAE). *Global Science and Technology*, 4(2).

- Gelband, H., Miller-Petrie, M., Pant, S., Gandra, S., Levinson, J., Barter, D., White, A. Laxminarayan, R. 2015. The state of the world's antibiotics 2015. *Wound Healing Southern Africa*, 8: 30-34.
- Guimarães, D.O.; Momesso, L.S.; Pupo, M.T. 2010. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, 33: 667-679.
- Hankin, L.; Anagnostakis, S.L. 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycologia*, 67: 597-607.
- Jimenez, Z.J.I.; Mateos, P.F.; Dazzo, F.B.; Martinez, M.E. 1996. Cell-bound cellulase and polygalacturonase production by Rhizobium and Bradyrhizobium species. *Soil Biology Biochemistry*, 28: 917-921.
- Johnson, T.L.; Forbes, B.A.; O'connor-Scarlet, M.; Machinski, A.; McClatchey, K.D. 1985. Rapid method of MIC determinations utilizing tetrazolium reduction. *American Journal of Clinical Pathology*, 83: 374-378.
- Kharwar, R.N.; Mishra, A.; Sharma, V.K.; Gond, S.K.; Verma, S.K.; Kumar, A.; Kumar, J.; Singh, D.K.; Goutam, J. 2014. Diversity and biopotential of endophytic fungal flora isolated from eight medicinal plants of Uttar Pradesh, India. In: Kharwar, R.N.; Upadhyay, R.S., Dubey, N.K., Raghuwanshi, R. (Ed.). *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security*. Springer India, p. 23-39.
- Kongyen, W.; Rukachaisirikul, V.; Phongpaichit, S.; Sakayaroj, J. 2015. A new hydronaphthalenone from the mangrove-derived *Daldinia eschscholtzii* PSU-STD57. *Natural product research*, 29: 1995-1999.
- Kusari, S.; Singh, S.; Jayabaskaran, C. 2014. Biotechnological potential of plant-associated endophytic fungi: hope versus hype. *Trends in biotechnology*, 32: 297-303.
- Macfaddin, J. F. 2000. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 3ra ed. Williams & Wilkins Co., Baltimore. 912p.
- Mendes, M.M.G.S.; Pereira, S.A.; Oliveira, R.L.; Duvoisin Jr., S; Albuquerque, P.M. 2015. Screening of Amazon fungi for the production of hydrolytic enzymes. *African Journal of Microbiology Research*, 9: 741-748.

- Naidu, M.A. 2013. Antimicrobial activity of methanolic extracts of bamboo shoots *Bambusa vulgaris*. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive*, 3: 1547-1549.
- Ogunjinmi, A.A.; Ijeomah, H.M.; Aiyeloja, A.A. 2009. Socio-economic importance of bamboo (*Bambusa vulgaris*) in Borgu local government area of Niger State, Nigeria. *Journal of Sustainable Development in Africa*, 10: 284-289,
- Pércope, S. 2015. Diarreia aguda. *Pediatria moderna*, 51: 141-148.
- Pereira, M.A.R.; Beraldo A.L. 2007. Bambu de corpo e alma. 2da ed. Editora Canal 6, Bauru, 240p.
- Rahman, M.; Kuhn, I.; Rahman, M.; Olsson-Liljequist, B.; Molby, R. 2004. Evaluation of a scanner-assisted colorimetric MIC method for susceptibility testing of gram-negative fermentative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 2398-2403,
- Rajeshwari, E. 2012. Evaluation of anti-microbial activity of *Bambusa vulgaris* leaves. *International Journal of Phytotherapy Research*, 2: 36-39.
- Rodvold, Keith A., and Kevin W. McConeghy. 2014. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* therapy: past, present, and future. *Clinical infectious diseases*, 58: S20-S27.
- Santos, A.; Santos, D.O.; Freitas, C.C.; Ferreira, B.L.A.; Afonso, I.F.; Rodrigues, C.R.; Castro, H.C. 2007. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 43: 413-423.
- Schulz, B.; Boyle, C. 2005. The endophytic continuum. *Mycological research*, 109: 661-686.
- Solanki, R. 2011. Treatment of skin diseases through medicinal plants in different regions of the world. *International Journal of Biomedical Research*, 2: 73-88.
- Suryanarayanan, T.S.; Thirunavukkarasu, N.; Govindarajulu, M.B.; Gopalan, V. 2012. Fungal endophytes: an untapped source of biocatalysts. *Fungal Diversity*, 54: 19-30.
- Tamolang, F.N. 1980. Properties and utilization of Philippine erect bamboos. *Forpridge digest*, 9: 14-27.
- Tan, R.X.; Zou, W.X. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Products Reports*, 18: 448- 459.

Vaz, A.B.; Brandão, L.R.; Vieira, M.L.; Pimenta, R.S.; Morais, P.B.; Sobral, M.E.; Rosa, L.H.; Rosa, C.A. 2012. Diversity and antimicrobial activity of fungal endophyte communities associated with plants of Brazilian savanna ecosystems. *African Journal of Microbiology Research*, 6: 3173-3185.

Wu, Y.H.; Zeng, C.Z.; Gong, Y.F. 2008. Study on antimicrobial effect of *Bambusa vulgaris* cv. *Vittata* leaf extracts. *Food Science and Technology*, 1: 194-196.

Zhao, J.; Shan, T.; Mou, Y.; Zhou, L. 2011. Plant-derived bioactive compounds produced by endophytic fungi. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 11: 159-168.

Tabelas

Tabela 1. Atividade enzimática (Pz) dos fungos filamentosos para degradação de amido e lipídios.

Identificação	Amilase		Lipase	
	Pz	Resultado	Pz	Resultado
CTNFB01a <i>Hypoxyylon investiens</i>	1	N	1	N
CTNFB01b <i>Daldinia eschsholtzii</i>	1	N	N	N
CTNFB02 <i>Curvularia lunata</i>	1	N	0,81 ab	P
CTNFB03 <i>Curvularia lunata</i>	0,86 a	P	1	N
CTNFB04 Fungo não descrito	1	N	1	N
CTNFB05 <i>Fusarium solani</i>	1	N	0,79 b	P
CTNFB06 <i>Bambusicola bambusae</i>	0,25 d	FP	0,43 c	FP
CTNFB07 Dothideomycetes	1	N	0,41 c	FP

CV% = 3,9

Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente, pelo Teste de Tukey a 5% de probabilidade. (CV%) Coeficiente de variação em %; (N) Negativo; (P) Positivo; (FP) Fortemente Positivo.

Tabela 2. Concentrações inibitórias mínimas dos líquidos metabólicos de fungos endofíticos frente às bactérias.

Identificação	Diluição mínima com atividade antimicrobiana		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA
	ATCC 25922	ATCC 29213	(isolado clínico)
CTNFB01a <i>Hypoxyylon investiens</i>	250	500	-
CTNFB01b <i>Daldinia eschsholtzii</i>	250	62,50	500
CTNFB02 <i>Curvularia lunata</i>	125	15,63	500
CTNFB03 <i>Curvularia lunata</i>	125	15,63	-
CTNFB04 Fungo não descrito	250	7,81	-
CTNFB05 <i>Fusarium solani</i>	125	7,81	-
CTNFB06 <i>Bambusicola bambusae</i>	250	7,81	-
CTNFB07 Dothideomycetes	500	15,63	15,63

CV% = 67,74

Concentrações expressas em $\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$; (CV%) Coeficiente de variação; (-) não inibiu.

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou através do processo de micropropagação vegetal a possibilidade do isolamento de diferentes espécies de fungos filamentosos que compõem a microbiota endofítica cultivável do bambu. Os resultados sugerem que tecidos coletados em porções mais próximas ao colmo apresentam maior intensidade de colonização com relação aos mais distantes. Este comportamento da colonização se mostrar mais intensa em porções basais em detrimento dos apicais é coerente com o que é relatado por Torres et al. (2016) em estudos acerca da contaminação em *Bambusa vulgaris* introduzido *in vitro*. Deste modo, se torna recomendável que para fins de prospecção de novos isolados a fim de obter produtos ou processos de interesse biotecnológico, os tecidos próximos ao colmo seriam mais interessantes para serem coletados como fonte para isolamento. Ao passo que para a cultura de tecidos vegetal, tecidos mais distais apresentariam menores taxas de contaminação e seriam mais promissores para introdução *in vitro*.

Vale ressaltar que conforme os resultados evidenciaram, embora os tecidos próximos ao como do bambu sejam potencialmente promissores para obtenção de novos isolados fúngicos com valor biotecnológico, o cultivo destes nem sempre é possível pelas técnicas tradicionais. De acordo com Hyde e Soyong (2008) é comum que a prospecção de endofíticos relate fungos que, crescem apenas em meios com composição muito específica ou que crescem muito lentamente, ou ainda que não crescem em meio artificial. É possível que a elaboração de meios de cultura que se aproximem mais das condições fisiológicas dos tecidos do bambu possa gerar uma otimização do processo de prospecção neste vegetal, permitindo a recuperação de um maior número de isolados ainda não estudados.

Os fungos filamentosos avaliados no presente trabalho apresentaram propriedades de degradação enzimática, e de fato, segundo Zaferanloo et al. (2014) e Moraes et al. (2015), a prospecção a partir de fungos endofíticos já demonstrou a obtenção de enzimas promissoras para uso industrial. A continuação deste estudo seria de grande valia para purificação e caracterização das enzimas excretadas

pelos fungos endofíticos de bambu com atividade degradativa positiva, de modo que estas enzimas possam ser avaliadas comparativamente a enzimas comerciais para verificar o rendimento e aplicabilidade industrial das mesmas.

Quanto à atividade antimicrobiana demonstrada pelos fungos endofíticos do bambu no presente trabalho, esta é consonante com os resultados reportados para fungos endofíticos filamentosos de bambu de outras espécies que já foram relatadas, mas cujos compostos com ação antimicrobiana ainda foram descritos (SHEN et al., 2012; SHEN et al., 2014). Neste sentido, a identificação dos compostos com valor antimicrobiano para prosseguimento em testes com estes em suas formas purificadas pode levar à identificação de drogas com alto valor farmacológico para o combate de infecções antimicrobianas, mesmo que no caso de estirpes resistentes às drogas comercializadas atualmente.

REFERÊNCIAS

- AGUSTA, A. et al. Biotransformation of protoberberine alkaloids by the endophytic fungus *Coelomyces* AFKR-3 isolated from yellow moonseed plant (*Archangelisia flava* (L.) Merr.). **Procedia Chemistry**, v. 13, p. 38-43, 2014.
- AHAMED, A.; AHRING, B. K. Production of hydrocarbon compounds by endophytic fungi *Gliocladium* species grown on cellulose. **Bioresource technology**, v. 102, n. 20, p. 9718-9722, 2011.
- ALMEIDA, J. Potencialidades do bambu. **Sustentabilidade em Debate**, v. 7, n. 3, p. 178-195, 2016.
- ALVES, C. et al. A cultura de Tecidos na Agricultura. In: JORNADA CIENTÍFICA, 1; FIPA, 6., 2008, Bambuí. **Anais...** Centro Federal de Educação Tecnológica de Bambuí–CEFET-Bambuí, 2008. Disponível em: <http://www.cefetbambui.edu.br/str/artigos_aprovados/Ci%C3%A4ncias%20Agrarias/14-PT-12.pdf> Acesso em: 20 nov. 2014.
- ALY, A. H.; DEBBAB, A.; PROKSCH, P. Fungal endophytes—secret producers of bioactive plant metabolites. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, n. 7, p. 499-505, 2013.
- AMÉRICO, L. Eco-Design e a utilização de materiais alternativos renováveis: o Bambu e sua inter-relação com o design. In: Simpósio Brasileiro de Design Sustentável; 2009, São Paulo. **Anais do 2º Simpósio Brasileiro de Design Sustentável (II SBDS)**. São Paulo: Rede Brasileira de Design Sustentável, 2009.
- ANDRADE, S.R.M. **Princípios da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: Embrapa Cerrado, 2002. 16 p.
- ANJOS, M. A. S.; GHAVAMI, K.; BARBOSA, N. P. Compósitos à base de cimento reforçados com polpa celulósica de bambu. Parte I: Determinação do teor de r arte I: Determinação do teor de reforço ótimo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 7, n. 2, p. 339-345, 2003.
- ATTAR, F.; AMINIFAR, M. Spectroscopic techniques used for enzyme evaluation in food industry. **International conference on nutrition and food sciences**, v. 71, p. 23-27, 2014.
- AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada?. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 2, p. 225-229, 1999.

- AZEVEDO, J. L. Endophytic Fungi from Brazilian Tropical Hosts and Their Biotechnological Applications. In: **Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security**. Springer India, 2014. p. 17-22.
- AZEVEDO, J. L. Microrganismos endofíticos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998. cap. 4, p. 117-137.
- AZZINI, A.; ARANHA, C.; PIO, R. M. Flowering and seeding of bamboo (*Melocanna baccifera*). **Bragantia**, v. 41, n. 1, p. 175-180, 1982.
- AZZINI, A.; CIARAMELLO, D.; NAGAI, V. Vegetative multiplication of *Dendrocalamus giganteus* munro. **Bragantia**, v. 37, n. 1, p. 1-3, 1978.
- BALAKUMARAN, M. D.; RAMACHANDRAN, R.; KALAICHELVAN, P. T. Exploitation of endophytic fungus, *Guignardia mangiferae* for extracellular synthesis of silver nanoparticles and their *in vitro* biological activities. **Microbiological Research**, v. 178, p. 9-17, 2015.
- BANO, N. et al. Production of Bioactive Secondary Metabolites from Endophytic fungi. **International Research Journal of Engineering and Technology**, v. 6, n. 6, p. 1859-1866, 2016.
- BARY, A. **Morphologie und physiologie der pilze, flechten und myxomyceten**. W. Leipzig: Engelmann, 1866, 316 p.
- BATTISTELLE, R. A. G.; MARCILIO, C.; LAHR, F. A. R. Emprego do bagaço da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) e das folhas caulinares do bambu da espécie *Dendrocalamus giganteus* na produção de chapas de partículas. **Revista Minerva**, v. 3, p. 297-305, 2009.
- BEHIE, S. W.; ZELISKO, P. M.; BIDOCHKA, M. J. Endophytic insect-parasitic fungi translocate nitrogen directly from insects to plants. **Science**, v. 336, n. 6088, p. 1576-1577, 2012.
- BPG, BAMBOO PHYLOGENY GROUP. An updated tribal and subtribal classification of the bamboos (Poaceae: Bambusoideae). **Bamboo Science and Culture**, v. 24, p. 1-10, 2012.
- BRASIL. Lei n. 10.711, de 5 de agosto de 2003. Dispõe sobre o Sistema Nacional de Sementes e Mudanças e dá outras providências. **Diário oficial da República Federativa do Brasil**, Poder executivo, Brasília, DF, 5 ago. 2003.
- BRASIL. Lei n. 12.484, de 8 de setembro de 2011. Dispõe sobre a Política Nacional de Incentivo ao Manejo Sustentado e ao Cultivo do Bambu e dá outras providências. **Diário oficial da República Federativa do Brasil**, Poder executivo, Brasília, DF, 8 set. 2011.

BUENO, C. J.; AMBRÓSIO, M. M. Q.; SOUZA, N. L. de. Preservação de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Summa Phytopathologica**, v. 32, n. 1, p. 42-50, 2006.

CALCUL, L. et al. Screening mangrove endophytic fungi for antimalarial natural products. **Marine drugs**, v. 11, n. 12, p. 5036-5050, 2013.

CARVALHO, A. C. P. P.; RODRIGUES, A. A. DE J.; SANTOS, E. O. **Panorama da produção de mudas micropropagadas no Brasil**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2012. 42 p.

CARVALHO, A. L. et al. Bamboo-dominated forests of the southwest Amazon: detection, spatial extent, life cycle length and flowering waves. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e54852, 2013.

CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S. **Noções de cultivo de tecidos vegetais**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003. 40 p.

CASTRO, H. F. et al. Aplicação de lipases no tratamento de águas residuárias com elevados teores de lipídeos. **Química nova**, v. 28, p. 296-305, 2005.

CHANDRA, S. Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 95, n. 1, p. 47-59, 2012.

CHEN, L. et al. Endophytic fungi with antitumor activities: Their occurrence and anticancer compounds. **Critical reviews in microbiology**, n. 0, p. 1-20, 2014.

CHONGTHAM, N.; BISHT, M. S.; HAORONGBAM, S. Nutritional properties of bamboo shoots: potential and prospects for utilization as a health food. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 3, p. 153-168, 2011.

CORRÊA, R. C. G. et al. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 41, n. 10, p. 1467-1478, 2014.

DABA, M. Industrial, Carbon Sequestration and Climate Change Mitigation Potentials of Bamboo. **Journal of Scientific Research & Reports**, v. 12, n. 3, p. 1-8, 2016.

DASH, A. K.; GUPTA, S. Bamboo wall structure: A step towards sustainable construction paper. **International Journal of Advances in Computer Science & Its applications**, v. 4, n. 4, p. 238-240, 2014.

DEBERGH, P.C.; READ, P.E. Micropropagation. In: DEBERGH, P.C.; READ, P.E. (Ed). **Micropropagation technology and application**. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 1991. p.1-13.

DEY, P.; BANERJEE, J.; MAITI, M. K. Comparative lipid profiling of two endophytic fungal isolates—*Colletotrichum* sp. and *Alternaria* sp. having potential utilities as biodiesel feedstock. **Bioresource technology**, v. 102, n. 10, p. 5815-5823, 2011.

ESPOSITO-POLESI, N. P. Microrganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 4, p. 533, 2011.

FERREIRA, E. J. L. O bambu é um desafio para a conservação e o manejo de florestas no sudoeste da Amazônia. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 3, p. 46-51, 2014.

FERREIRA, V. L. P. et al. Broto-de-bambu: uma opção alimentar; II. Processamento e aceitabilidade. **Coletânea do Instituto de Tecnologias e Alimentos**, v. 20, n. 2, p. 129-43, 1990.

FESTER, T. et al. Plant–microbe interactions as drivers of ecosystem functions relevant for the biodegradation of organic contaminants. **Current opinion in biotechnology**, v. 27, p. 168-175, 2014.

GEORGE, E.F.; HALL, M.A; KLERK, G. DE (orgs.). **Plant Propagation by Tissue Culture**. 3 ed. Dordrecht: Springer. 1984. 709 P.

GPWG, GRASS PHYLOGENY WORKING GROUP. Phylogeny and subfamilial classification of the grasses (Poaceae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 8, n. 3, p. 373-457, 2001.

HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235–25, 2006.

HAZALIN, N. A. M. N. et al. Induction of apoptosis against cancer cell lines by four ascomycetes (endophytes) from Malaysian rainforest. **Phytomedicine**, v. 19, n. 7, p. 609-617, 2012.

HEINIG, U.; SCHOLZ, S.; JENNEWEIN, S. Getting to the bottom of Taxol biosynthesis by fungi. **Fungal Diversity**, v. 60, n. 1, p. 161-170, 2013.

HYDE, K. D.; SOYTONG, K. The fungal endophyte dilemma. **Fungal Diversity**, v. 33, n. 163, p. 163-173, 2008.

JUDZIEWICZ, E.J.; CLARK, L.G. Classification and biogeography of new world grasses: Anomochlooideae, Pharoideae, Ehrhartoideae, and Bambusoideae. **Aliso**, v. 23, n. 1, p. 303-314, 2007.

JUDZIEWICZ, E.J. et al. **American Bamboos**. 1 ed. Washington: Smithsonian. 1999. 392p.

- KANTARIAN, C. et al. Screening of bioactive compounds from bacterial endophytes isolated from micropropagated plants. **Suranaree Journal of Science & Technology**, v. 23, n. 1, p. 59-67, 2016.
- KAUL, S. et al. Endophytic fungi from medicinal plants: a treasure hunt for bioactive metabolites. **Phytochemistry reviews**, v. 11, n. 4, p. 487-505, 2012.
- KHAN, A. L. et al. Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. **BMC microbiology**, v. 12, n. 1, p. 3, 2012.
- KHARWAR, R. N. et al. Diversity and Biopotential of Endophytic Fungal Flora Isolated from Eight Medicinal Plants of Uttar Pradesh, India. In: **Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security**. Springer India, 2014. p. 23-39.
- KOGEL, K.; FRANKEN, P.; HÜCKELHOVEN, R. Endophyte or parasite—what decides?. **Current opinion in plant biology**, v. 9, n. 4, p. 358-363, 2006.
- KUMAR, S. et al. Endophytic fungi: as a source of antimicrobials Bioactive compounds. **World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences**, v. 3, n. 2, p. 1179-1197, 2014.
- KUMAR, S.; KAUSHIK, N. Endophytic fungi isolated from oil-seed crop *Jatropha curcas* produces oil and exhibit antifungal activity. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e56202, 2013.
- KUSARI, P. et al. Endophytic fungi harbored in *Cannabis sativa* L.: diversity and potential as biocontrol agents against host plant-specific phytopathogens. **Fungal diversity**, v. 60, n. 1, p. 137-151, 2013.
- KUSARI, S.; HERTWECK, C.; SPITELLER, M. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. **Chemistry & biology**, v. 19, n. 7, p. 792-798, 2012.
- KUSARI, S.; SINGH, S.; JAYABASKARAN, C. Biotechnological potential of plant-associated endophytic fungi: hope versus hype. **Trends in biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 297-303, 2014.
- LI, H. Y. et al. Endophytes and their role in phytoremediation. **Fungal Diversity**, v. 54, n. 1, p. 11-18, 2012.
- LIU, D. et al. Bamboo fiber and its reinforced composites: structure and properties. **Cellulose**, v. 19, n. 5, p. 1449-1480, 2012.
- MARTINS, R.; GUERREIRO, L. Resposta Técnica. Serviço Brasileiro de Normas Técnicas. 2006. Disponível em: <<http://www.sbrt.ibict.br>>. Acesso em: 20 outubro de 2014.

MORAES, J. et al. Production of lipolytic enzymes by endophytic fungi and its use in the hydrolysis of crude oil. **International Journal of Scientific Research**, v. 4, n. 6, 2015.

NAIR, D. N.; PADMAVATHY, S. Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

NETTO, L. G.; GIANNETTI, B. F. Contabilidade dos Fluxos de CO₂ em uma Plantação Comercial de Bambu Visando a Produção Papeleira. **Key Elements for a Sustainable World: Energy, Water and Climate Change**, São Paulo, 2009.

OLIVEIRA, J. F.; LEMOS, E. E. P.; REZENDE, L. P. Desenvolvimento de métodos de micropropagação para produção de mudas de bambu - *Bambusa nutans* G.C. Wall ex Munro. **Ciências Agrícolas**, v. 10, n. 1, p. 25-29, 2009/2012.

OSSE, V. C.; MEIRELLES, C. R. M. O potencial do bambu na minimização dos problemas climáticos nos espaços urbanos. **Revista LABVERDE**, n. 3, p. 36-53, 2011.

PARK, E. Y.; SATO, M.; KOJIMA, S. Fatty acid methyl ester production using lipaseimmobilizing silica particles with different particle sizes and different specific surface areas. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 889-896, 2006.

PAWAR, S. Bamboo in Construction Technology. **Research India Publications**, v. 4, n. 4, p. 347-352, 2014.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 29, p. 62-77, 2002.

PEREIRA, M. A. R. Bambu: espécies, características e aplicações. **Departamento de Engenharia Mecânica/Unesp. Apostila. Bauru**, 1999.

PEREIRA, M. A. R.; BERALDO A. L. **Bambu de corpo e alma**, Bauru: Editora Canal 6, 2007. 240 p.

RAI, M. et al.. Fungal growth promotor endophytes: a pragmatic approach towards sustainable food and agriculture. **Symbiosis**, v. 62, n. 2, p. 63-79, 2014.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

ROBL, D. et al. The capability of endophytic fungi for production of hemicellulases and related enzymes. **BMC biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 94, 2013.

RUSSELL, J. R. et al. Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 17, p. 6076-6084, 2011.

- SAARELA, J. M. The North American flowering of the cultivated fountain bamboo, *Fargesia nitida* (Poaceae: Bambusoideae), in Vancouver, British Columbia, Canada; **Davidsonia**, v. 18, n.2, p. 43–55, 2007.
- SANTIAGO, I. F. et al. Leishmanicidal and antitumoral activities of endophytic fungi associated with the Antarctic angiosperms *Deschampsia antarctica* Desv. and *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. **Extremophiles**, v. 16, n. 1, p. 95-103, 2012.
- SANTOS, L. S. et al. Potencial herbicida da biomassa e de substâncias químicas produzidas pelo fungo endofítico *Pestalotiopsis guepinii*. **Planta daninha**, v. 26, n. 3, p. 539-48, 2008.
- SANTOS, T. T.; VARAVALLO, M. A Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 32, n. 2, p. 199-212, 2011.
- SARANRAJ, P.; STELLA, D. Fungal Amylase-A Review. **International Journal of Microbiology Research**, v. 4, p. 203-211, 2013.
- SATYA, S. et al. Bamboo shoot: a potential source of food security. **Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2012.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological research**, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.
- SHEN, X. Y. et al. Diversity and antimicrobial activity of culturable endophytic fungi isolated from moso bamboo seeds. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e95838, 2014.
- SHEN, X. et al. Isolation and evaluation of endophytic fungi with antimicrobial ability from *Phyllostachys edulis*. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 7, n. 4, p. 249-257, 2012.
- SIEBER, T. N. Endophytic fungi in Florest trees: are they mutualists? **Fungal Biology Reviews**, v. 21. n. 2-3, p. 75-89, 2007.
- SILVA, J. C. B. V.; LIMA, N.; OLIVEIRA, V. M. **Estufa Ecológica: Uso do bambu em bioconstruções**. Curitiba: CPRA, 2011.
- SINGHAL, P. et al. Bamboo shoots: A novel source of nutrition and medicine. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 53, n. 5, p. 517-534, 2013.
- SOUSA, J. P. B. et al. Chemical constituents and their antibacterial activity from the tropical endophytic fungus *Diaporthe* sp. F2934. **Journal of applied microbiology**, v. 120, n. 6, p. 1501-1508, 2016.
- SOUZA, A. P. C. C. Bambu na habitação de interesse social no Brasil. **Cadernos de Arquitetura e Urbanismo**, v. 11, n. 12, p 217-245, 2009.

SOUZA, D. M. G. de; LOBATO, E.; REIN, T. A. Adubação com fósforo. In: SOUZA, D. M. G.; LOBATO, E. (Ed.). **Cerrado: correção do solo e adubação**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 147-168.

SOUZA, P. M.; MAGALHÃES, P. O. Application of microbial α -amylase in industry-A review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 850-861, 2010.

SPRICIGO, G.; MOMBACH, H. B. Oportunidades de Negócios para Micropropagação *in vitro* de Vegetais. **São Leopoldo, RS: Universidade do Vale do Rio dos Sinos–UNISINOS**, 2008.

SRINIVAS, R. P. et al. Antimicrobial activity in cultures of endophytic fungi isolated in some medicinal plant species. **International Journal of Advanced Research in IT and Engineering**, v. 4, n. 2, p. 1-24, 2015.

STROBEL, G. A. Methods of discovery and techniques to study endophytic fungi producing fuel-related hydrocarbons. **Natural product reports**, v. 31, n. 2, p. 259-272, 2014.

STROBEL, G. The use of endophytic fungi for the conversion of agricultural wastes to hydrocarbons. **Biofuels**, v. 5, n. 4, p. 447-455, 2014.

SUDHA, V. et al. Biological properties of Endophytic Fungi. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, 2016.

SUN, X.; GUO, L.; HYDE, K. D. Community composition of endophytic fungi in *Acer truncatum* and their role in decomposition. **Fungal Diversity**, v. 47, n. 1, p. 85-95, 2011.

SURYANARAYANAN, T. S. et al. Fungal endophytes: an untapped source of biocatalysts. **Fungal Diversity**, v. 54, n. 1, p. 19-30, 2012.

TEIXEIRA JUNIOR, A. B.; KENUPP, L. K.; CAMPOS, R. Q. Utilização de bambu na construção civil - Uma alternativa ao uso de madeira. **Revista Ciências do Ambiente On-Line**, v. 5, n. 1, 2010. Disponível em <<http://sistemas.ib.unicamp.br/be310/index.php/be310/article/view/177/130>> Acesso em: 20 out. 2014.

TORRES, G. R.C.; HOULLOU, L. M.; SOUZA, R. A. Control of contaminants during introduction and establishment of *Bambusa vulgaris in vitro*. **Research in Biotechnology**, v. 7, p. 58-67, 2016.

TORRES, G. R. C. et al. Efeito da posição de segmentos nodais sobre a contaminação e brotação na micropopagação do bambu. **Ciência & Tecnologia**, v. 8, n. 1, p. 1-15, 2016.

VAZ, A. B. et al. Diversity and antimicrobial activity of fungal endophyte communities associated with plants of Brazilian savanna ecosystems. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, p. 3173-3185, 2012.

VIEIRA, M. L. et al. The diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi associated with medicinal plant *Baccharis trimera* (Asteraceae) from the Brazilian savannah. **Canadian journal of microbiology**, v. 60, n. 12, p. 847-856, 2014.

WANG, W. X. et al. Antibacterial azaphilones from an endophytic fungus, *Colletotrichum* sp. BS4. **Journal of natural products**, v. 79, n. 4, p. 704-710, 2016.

WELLENSIEK, B. P. et al. Inhibition of HIV-1 replication by secondary metabolites from endophytic fungi of desert plants. **The open virology journal**, v. 7, p. 72, 2013.

YANG, Y. et al. Genome sequencing and analysis of the paclitaxel-producing endophytic fungus *Penicillium aurantiogriseum* NRRL 62431. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 69, 2014.

ZAFERANLOO, B. et al. A. Amylase production by *Preussia minima*, a fungus of endophytic origin: optimization of fermentation conditions and analysis of fungal secretome by LC-MS. **BMC microbiology**, v. 14, n. 1, p. 55, 2014.

ZHAO, J. et al. Plant-derived bioactive compounds produced by endophytic fungi. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 11, n. 2, p. 159-168, 2011.

ZINNIEL, D.K. et al.. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2198-2208, 2002.

ANEXOS

ANEXO A

Imagens suplementares para ilustração e demonstração de aspectos visuais alusivos aos processos e resultados descritos nos Capítulos 2 e 3, referentes aos artigos propostos.

1. Imagens suplementares ao Capítulo 2



Figura Suplementar 2.1 – Matriz do bambu *Bambusa vulgaris* apresentando vigor vegetal aparente a partir da qual foram coletados os ramos para introdução *in vitro*.

Fonte: o Autor (2017).

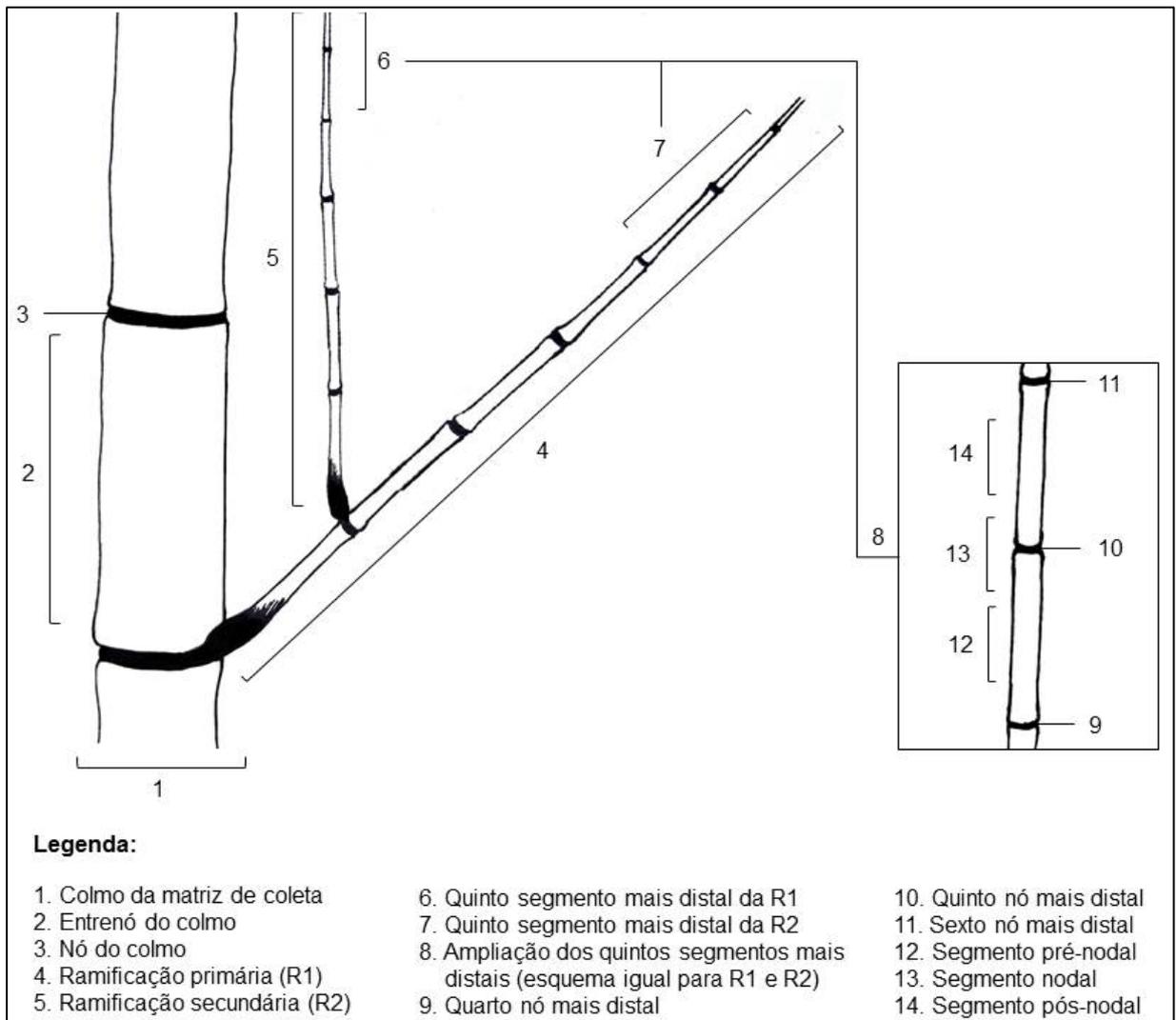


Figura Suplementar 2.2 – Esquema do colmo do bambu *Bambusa vulgaris* e suas ramificações primárias e secundárias. É colocado em detalhe ampliado a disposição dos segmentos pré-nodal, nodal e pós-nodal do quinto segmento nodal mais distal do colmo de ambas ramificações avaliadas.

Fonte: o Autor (2017).

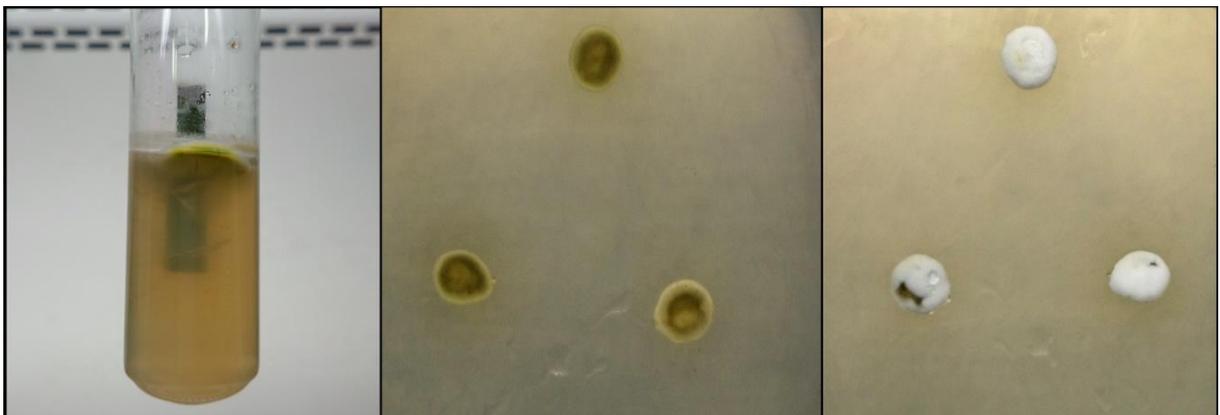


Figura Suplementar 2.3 – Fungo endofítico CTNFB06 *Bambusicola bambusae*. Da esquerda para a direita: expressão em meio BDA quando da introdução *in vitro* do explante de *Bambusa vulgaris*; colônias no meio BDA em placa de Petri (verso e frente da cultura).

Fonte: o Autor (2017).

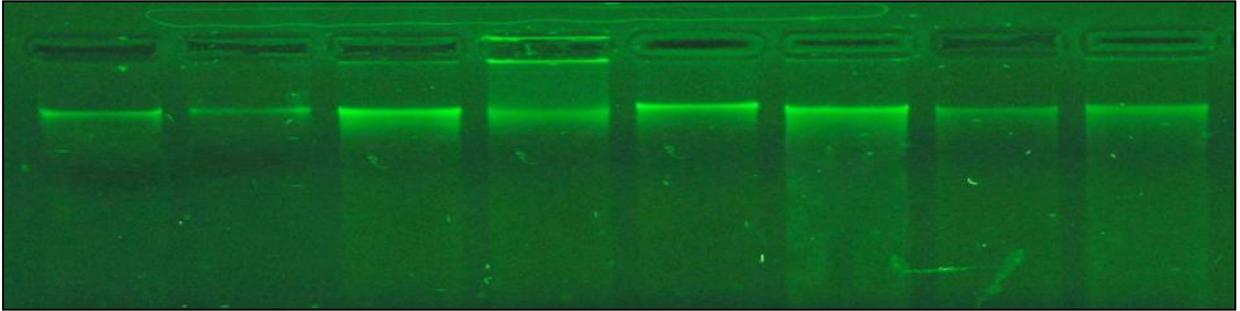


Figura Suplementar 2.4 – Gel de Agarose (1%) das extrações de DNA de fungos filamentosos endofíticos do bambu.

Fonte: o Autor (2017).

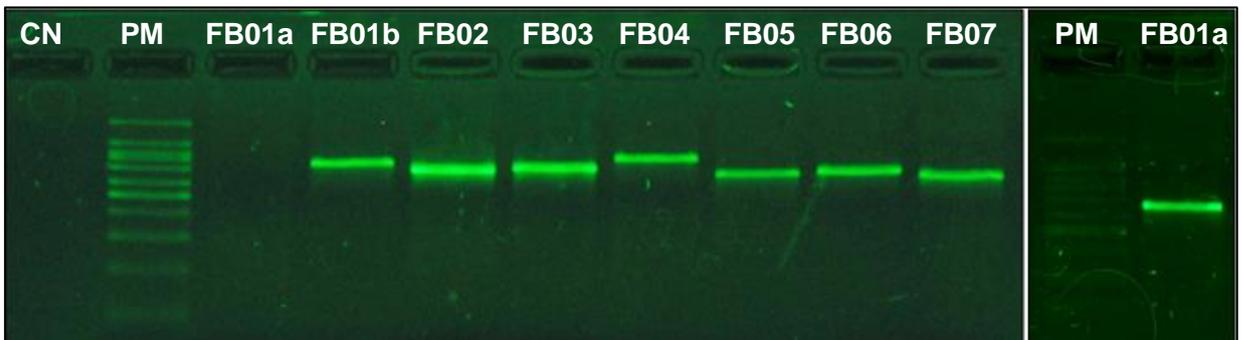


Figura Suplementar 2.5 – Gel de Agarose (2%) das PCRs da região ITS do fungos filamentosos endofíticos do bambu. A amostra referente ao isolado FB01a precisou de mais de uma tentativa de amplificação para gerar a banda indicando material amplificado (à direita da imagem). CN= controle negativo (branco); PM= marcador de peso molecular.

Fonte: o Autor (2017).

1. Imagens suplementares ao Capítulo 3

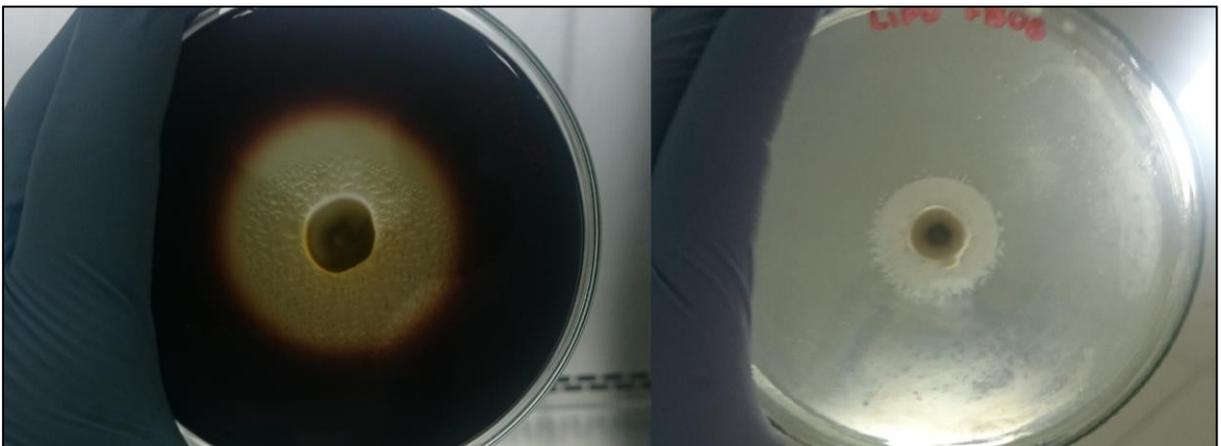


Figura Suplmentar 3.1 – Testes enzimáticos do fungo CTNFB06 *Bambusicola bambusae*, demonstrando os halos de degradação no entorno das colônias crescidas. Amilolítico à esquerda revelado pela adição de lugol e lipolítico à direita visível naturalmente contra a luz.

Fonte: o Autor (2017).

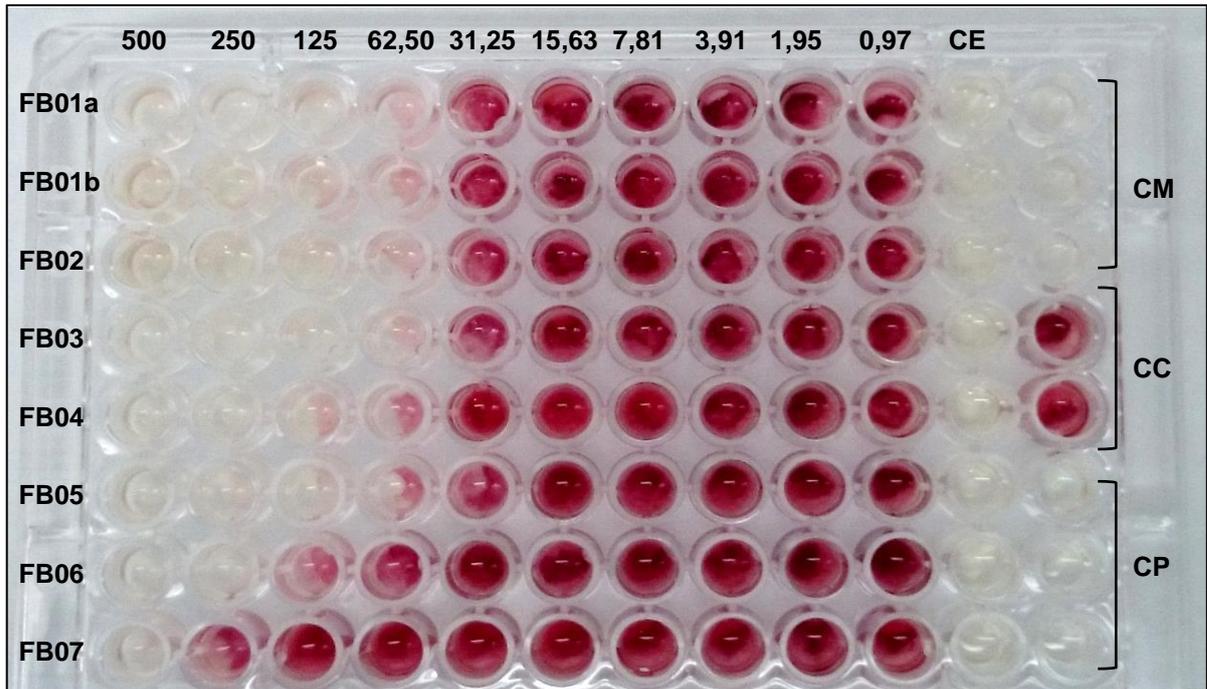


Figura Suplementar 3.2 – Testes de atividade antimicrobiana dos líquidos dos fungos endofíticos de bambu frente à bactéria *Escherichia coli*. Concentrações expressas na linha vertical em $\mu\text{L.mL}^{-1}$; Código dos fungos aos quais pertencem os líquidos dispostos na vertical ao lado esquerdo. CE= controle de esterilidade dos líquidos; CM= controle de esterilidade do meio de cultura; CN= controle de crescimento da bactéria de teste; CP= controle positivo de atividade antimicrobiana (Cloranfenicol).

Fonte: o Autor (2017).

ANEXO B

Normas editoriais do periódico *Annals of The Brazilian Academy of Sciences*, ISSN 1678-2690. Informações disponíveis em <http://www.scielo.br/revistas/aabc/iinstruc.htm>

All submitted manuscripts should contain original research not previously published and not under consideration for publication elsewhere. The primary criterion for acceptance is scientific quality. Papers should avoid excessive use of abbreviations or jargon, and should be intelligible to as wide an audience as possible. Particular attention should be paid to the Abstract, Introduction, and Discussion sections, which should clearly draw attention to the novelty and significance of the data reported. Failure to do this may result in delays in publication or rejection of the paper. Articles accepted for publication become property of the journal.

Texts can be published as a review, a full paper (article) or as a short communication. Issues appear in March, June, September and December.

1. Types of papers

a. Reviews

Reviews are published by invitation only. However, a proposal for a Review may be submitted in the form of a brief letter to the Editor at any time. The letter should state the topics and authors of the proposed review, and should state why the topic is of particular interest to the field.

b. Articles

Whenever possible the articles should be subdivided into the following parts: 1. Front Page; 2. Abstract (written on a separate page, 200 words or less, no abbreviations); 3. Introduction; 4. Materials and Methods; 5. Results; 6. Discussion; 7. Acknowledgments, if applicable; 8. References. Articles from some areas such as Mathematical Sciences should follow their usual format. In some cases it may be advisable to omit part (4) and to merge parts (5) and (6). Whenever applicable, the Materials and Methods section should indicate the Ethics Committee that evaluated the procedures for human studies or the norms followed for the maintenance and experimental treatments of animals.

c. Short communications

Short communications aim to report on research which has progressed to the stage when it is considered that results should be divulged rapidly to other workers in the field. A short communication should also have an Abstract and should not exceed 1,500 words. Tables and Figures may be included but the text length should be

proportionally reduced. Manuscripts submitted as articles but found to fit these specifications will be published as short communications upon the author's agreement.

After the first screening, the articles will be evaluated by at least two reviewers, them being from educational and/or national and international research institutions, with proven scientific production. After due corrections and possible suggestions, the paper may be accepted or rejected, considering the reviews received.

We use the integrated Crossref Similarity Check program to detect plagiarism.

There are no APC and submission charges in the AABC.

2. Preparation of manuscripts

All parts of the manuscript should be double-spaced throughout. After acceptance, no changes will be made in the manuscript so that proofs require only corrections of typographical errors. The authors should send their manuscript in electronic version only.

a. Length of manuscript

While papers may be of any length required for the concise presentation and discussion of the data, succinct and carefully prepared papers are favored both in terms of impact as well as in readability.

b. Tables and Illustrations

Only high-quality illustrations will be accepted. All illustrations will be considered figures including drawings, graphs, maps, photographs as well as tables with more than 12 columns or more than 24 lines (maximum of 5 figures free of charge). Their tentative placement in the text should be indicated.

c. Digitalized figures

Figures should be sent according to the following specifications: 1. Drawings and illustrations should be in format EPS (PostScript) or AI (Adobe Illustrator) and never be inserted in text; 2. Images or figures in grayscale should be in format TIF and never be inserted in text; 3. Each figure should be saved in a separate file; 4. Figures should be submitted at high quality (minimum resolution of 300dpi) at the size they are to appear in the journal, i.e., 8 cm (one column) or 16.5 cm (two columns) wide, with maximal height for each figure and respective legend smaller than or equal to 22 cm. The legends to the figures should be sent double-spaced on a separate page. Each linear dimension of the smallest characters and symbols should not be less than 2 mm after reduction; 5. Manuscripts on Mathematics, Physics or Chemistry may be typesetted in ,

or . The TEX, PDF and BIB files should be sent, and EPS files if there are any figures;
6. Manuscripts without mathematical formulae may be sent in RTF, DOC or DOCX.

d. Front page

The front page of the manuscript should present the following items: 1. Title of the article (the title should be short, specific, and informative); 2. Full name(s) of the author(s); 3. Full professional address of each author (institution, street, number, zip code, city/county, state if applicable, country, etc.); 4. Key words (four to six in alphabetical order); 5. Running title (up to 50 characters); 6. Academy Section (one out of our 10 areas) to which the content of the work belongs; 7. Name and e-mail address of the author to whom all correspondence and proofs should be provided.

e. Acknowledgments

These should be included at the end of the text. Personal acknowledgments should precede those of institutions or agencies. Footnotes should be avoided; when necessary they must be numbered. Acknowledgments to grants and scholarships, and of indebtedness to colleagues as well as mention to the origin of an article (e.g. thesis) should be added to the Acknowledgments section.

f. Abbreviations

Abbreviations should be defined at their first occurrence in the text, except for official, standard abbreviations. Units and their symbols should conform to those approved by the ABNT or by the Bureau International des Poids et Mesures (SI).

g. References

Authors are responsible for the accuracy of the References. Published articles and those in press may be included. Personal communications (Smith, personal communication) must be authorized in writing by those involved. References to thesis, meeting abstracts (not published in indexed journals) and manuscripts in preparation or submitted, but not yet accepted, should be cited in the text as (Smith et al., unpublished data) and should NOT be included in the list of references.

The references should be cited in the text as, for example, 'Smith 2004', 'Smith and Wesson 2005' or, for three or more authors, 'Smith et al. 2006'. Two or more papers by the same author(s) in the same year should be distinguished by letters, e.g. 'Smith 2004a', 'Smith 2004b' etc. Letters should also distinguish papers by three or more authors with identical first author and year of publication. References should be listed according to the alphabetical order of the first author, always in the order SURNAME XY in which X and Y are initials. If there are more than ten authors, use et al. after the first author. References must contain the title of the article. Names of the journals

should be abbreviated. For the correct abbreviations, refer to lists of the major databases in which the journal is indexed or consult the World List of Scientific Periodicals. The abbreviation to be used for the Anais da Academia Brasileira de Ciências is An Acad Bras Cienc. The following examples are to be considered as guidelines for the References.

3. References

Albe-Fessard D, Condes-Lara M, Sanderson P and Levante A. 1984a. Tentative explanation of the special role played by the areas of paleospinothalamic projection in patients with deafferentation pain syndromes. *Adv Pain Res Ther* 6: 167-182.

Albe-Fessard D, Sanderson P, Condes-Lara M, Deland-Sheer E, Giuffrida R And Cesaro P. 1984b. Utilisation de la depression envahissante de Leão pour l'étude de relations entre structures centrales. *An Acad Bras Cienc* 56: 371-383.

Knowles RG and Moncada S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298: 249-258.

Pinto ID and Sanguinetti YT. 1984. Mesozoic Ostracode Genus *Theriosynoecum* Branson, 1936 and validity of related Genera. *An Acad Bras Cienc* 56: 207-215.

a. Books and book chapters

Davies M. 1947. *An outline of the development of Science*. Thinker's Library, n. 120. London: Watts, 214 p.

Prehn RT. 1964. Role of immunity in biology of cancer. In: NATIONAL CANCER CONFERENCE, 5., Philadelphia. *Proceedings ...*, Philadelphia: J. B. Lippincott, p. 97-104.

Uytenbogaardt W And Burke EAJ. 1971. *Tables for microscopic identification of minerals*, 2nd ed., Amsterdam: Elsevier, 430 p.

Woody Rw. 1974. Studies of theoretical circular dichroism of polipeptides: contributions of B-turns. In: BLOUTS ER ET AL. (Eds), *Peptides, polypeptides and proteins*, New York: J Wiley & Sons, New York, USA, p. 338-350.

b. Other publications

International Kimberlite Conference, 5, 1991. Araxá, Brazil. *Proceedings...* Rio de Janeiro: CPRM, 1994, 495 p.

Siatycki J. 1985. *Dynamics of Classical Fields*. University of Calgary, Department of Mathematics and Statistics, 1985, 55 p. Preprint no. 600.

ANEXO C

Normas editoriais do periódico Acta Amazonica, ISSN 1809-4392. Informações disponíveis em <http://submission.scielo.br/index.php/aa/about/submissions#authorGuidelines>

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

O tamanho máximo do arquivo deve ser 3 MB.

O manuscrito deve ser acompanhado de uma carta de submissão indicando que: a) os dados contidos no trabalho são originais e precisos; b) que todos os autores participaram do trabalho de forma substancial e estão preparados para assumir responsabilidade pública pelo seu conteúdo; c) a contribuição apresentada à Revista não foi previamente publicada e nem está em processo de publicação, no todo ou em parte em outro veículo de divulgação. A carta de submissão deve ser carregada no sistema da Acta Amazonica como “documento suplementar”.

Os manuscritos são aceitos em português, espanhol e inglês, mas encorajam-se contribuições em inglês. A veracidade das informações contidas numa submissão é de responsabilidade exclusiva dos autores.

A extensão máxima para artigos e revisões é de 30 páginas (ou 7500 palavras, excluindo a primeira página, ver item 8) incluindo bibliografia, tabelas, figuras e legendas, dez páginas (2500 palavras) para comunicações e notas científicas e cinco páginas para outros tipos de contribuições. Tabelas e figuras devem ser inseridas ao final do texto, nesta ordem. Uma cópia das figuras deve ser submetida em formato eletrônico na página do Periódico (ver itens 24-31).

Os manuscritos formatados conforme as Normas da Revista (Instruções para os autores) são enviados aos editores associados para pré-avaliação. Neste primeiro julgamento são levados em consideração a relevância científica, a inteligibilidade do manuscrito e o escopo no contexto amazônico. Nesta fase, contribuições fora do escopo ou de pouca relevância científica são rejeitadas. Manuscritos aprovados na pré-avaliação são enviados para revisores (pelo menos dois), especialistas de outras instituições diferentes daquelas dos autores, para uma análise mais detalhada.

Uma contribuição pode ser considerada para publicação, se tiver recebido pelo menos dois pareceres favoráveis no processo de avaliação. A aprovação dos manuscritos está fundamentada no conteúdo científico e na sua apresentação conforme as Normas da Revista.

Os manuscritos que necessitam correções são encaminhados aos autores para revisão. A versão corrigida deve ser encaminhada ao Editor no prazo de DUAS semanas. Uma carta de encaminhamento deve ser carregada no sistema da Revista, detalhando as correções efetuadas. Nessa carta, recomendações não incorporadas ao manuscrito devem ser explicadas. Todo o processo de avaliação pode ser acompanhado no endereço, <http://submission.scielo.br/index.php/aa/login>.

A organização do manuscrito deve seguir esta ordem, na primeira página: Título, nome(s) e endereço institucional e eletrônico do(s) autor(es). Nas páginas seguintes: Título, Resumo, Palavras-Chave, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos (incluído apoio financeiro), Bibliografia Citada e finalmente, tabelas e figuras com as suas respectivas legendas.

Importante: Toda submissão deve incluir antes da Introdução: título, abstract e palavras-chave (keywords) em inglês.

As comunicações e notas científicas são redigidas separando os tópicos (Introdução, etc) em parágrafos, mas sem incluir os seus respectivos títulos. Estas contribuições, como no caso do artigo completo, também devem conter: Título, nome(s) e endereço institucional e eletrônico do(s) autor(es), Resumo, Palavras Chave e os tópicos do artigo completo incluindo título, abstract e palavras-chave (keywords) em inglês. São permitidas até três figuras e duas tabelas.

O(s) nome(s) completo(s) do(s) autor(es) deve(m) ser escrito(s) com o último nome em letras maiúsculas. Nomes e instituição(ões) com o endereço completo, incluindo telefone, fax, e-mail devem ser cadastrados no sistema da Revista no ato da submissão.

Importante: Os manuscritos não formatados conforme as Normas da Revista NÃO são aceitos para publicação.

1. Os manuscritos devem ser preparados usando editor de texto (e salvos em formato doc, docx ou rtf), utilizando fonte "Times New Roman", tamanho 12 pt, espaçamento

- duplo, com margens de 3 cm. As páginas e as linhas devem ser numeradas de forma contínua.
- a. O título deve ser justificado à esquerda; com a primeira letra maiúscula.
 - b. O resumo, com até 250 palavras ou até 150 palavras no caso de notas e comunicações, deve conter de forma sucinta, o objetivo, a metodologia; os resultados e as conclusões. Os nomes científicos das espécies e demais termos em latim devem ser escritos em itálico.
 - c. As palavras-chave devem ser em número de três a cinco. Cada palavra-chave pode conter dois ou mais termos. Porém, não repetir palavras utilizadas no título.
 - d. Introdução. Esta seção deve enfatizar o propósito do trabalho e fornecer de forma sucinta o estado do conhecimento sobre o tema em estudo. Nesta seção devem-se especificar claramente os objetivos ou hipóteses a serem testados. Não incluir resultados ou conclusões na Introdução.
 - e. Material e Métodos. Esta seção deve ser organizada cronologicamente e explicar os procedimentos realizados, de tal modo que outros pesquisadores possam repetir o estudo. O procedimento estatístico utilizado deve ser descrito nesta seção. Procedimentos-padrão devem ser apenas referenciados. As unidades de medidas e as suas abreviações devem seguir o Sistema Internacional e, quando necessário, deve constar uma lista com as abreviaturas utilizadas. Equipamento específico utilizado no estudo deve ser descrito (modelo, fabricante, cidade e país de fabricação). Material testemunho (amostra para referência futura) deve ser depositado em uma ou mais coleções científicas e informado no manuscrito. Resultados. Os resultados devem apresentar os dados obtidos com o mínimo julgamento pessoal. Não repetir no texto toda a informação contida em tabelas e figuras. Algarismos devem estar separados de unidades. Por exe., 60 °C e NÃO 60° C, exceto para percentagem (p. exe., 5% e NÃO 5 %). Utilizar unidades e símbolos do sistema internacional e simbologia exponencial. Por exe., cmol kg^{-1} em vez de meq/100g.
 - f. Discussão. A discussão deve ter como alvo os resultados obtidos. Evitar mera especulação. Entretanto, hipóteses bem fundamentadas podem ser incorporadas. Apenas referências relevantes devem ser incluídas. As conclusões devem conter uma interpretação sucinta dos resultados e uma mensagem final que destaque as implicações científicas do trabalho. As conclusões podem ser apresentadas como um tópico separado ou incluídas como parte da seção Discussão.
 - g. Agradecimentos (incluindo apoio financeiro). Devem ser breves e concisos.

- h. Bibliografia citada. Pelo menos 70% das referências devem ser artigos de periódicos científicos. As referências devem ser preferencialmente dos últimos 10 anos e de preferência não exceder o número de 40. Os nomes dos autores devem ser citados em ordem alfabética. As referências devem se restringir a citações que aparecem no texto. Nesta seção, o título do periódico NÃO deve ser abreviado.

- Artigos de periódicos:

Walker, I. 2009. Omnivory and resource – sharing in nutrient – deficient Rio Negro waters: Stabilization of biodiversity? *Acta Amazonica*, 39: 617-626.

Alvarenga, L.D.P.; Lisboa, R.C.L. 2009. Contribuição para o conhecimento da taxonomia, ecologia e fitogeografia de briófitas da Amazônia Oriental. *Acta Amazonica*, 39: 495-504.

- Dissertações e teses:

Ribeiro, M.C.L.B. 1983. *As migrações dos jaraquis (Pisces: Prochilodontidae) no rio Negro, Amazonas, Brasil*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 192p.

- Livros:

Steel, R.G.D.; Torrie, J.H. 1980. *Principles and procedures of statistics: a biometrical approach*. 2da ed. McGraw-Hill, New York, 1980, 633p.

- Capítulos de livros:

Absy, M.L. 1993. Mudanças da vegetação e clima da Amazônia durante o Quaternário. In: Ferreira, E.J.G.; Santos, G.M.; Leão, E.L.M.; Oliveira, L.A. (Ed.). *Bases científicas para estratégias de preservação e desenvolvimento da Amazônia*. v.2. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, p.3-10.

- Citação de fonte eletrônica:

CPTEC, 1999. Climanalise, 14: 1-2 (www.cptec.inpe.br/products/climanalise). Acesso em 19/05/1999.

No texto, citações de referências seguem a ordem cronológica. Para duas ou mais referências do mesmo ano citar conforme a ordem alfabética. Exemplos:

- Um autor:

Pereira (1995) ou (Pereira 1995).

- Dois autores:

Oliveira e Souza (2003) ou (Oliveira e Souza 2003).

- Três ou mais autores:

Rezende *et al.* (2002) ou (Rezende *et al.* 2002).

- Citações de anos diferentes (ordem cronológica)

Silva (1991), Castro (1998) e Alves (2010) ou (Silva 1991; Castro 1998; Alves 2010).

- Citações no mesmo ano (ordem alfabética)

2. Figuras

- Fotografias, desenhos e gráficos devem ser de alta resolução, em preto e branco com alto contraste, numerados sequencialmente em algarismos arábicos. A legenda da figura deve estar em posição inferior a esta. NÃO usar tonalidades de cinza em gráfico dispersão (linhas ou símbolos) ou gráficos de barra. Em gráfico de dispersão usar símbolos abertos ou sólidos (círculos, quadrados, triângulos, ou losangos) e linhas em preto (contínuas, pontilhadas ou tracejadas). Para gráfico de barra, usar barras pretas, bordas pretas, barras listradas ou pontilhadas. Na borda da área de plotagem utilizar uma linha contínua e fina, porém NÃO usar uma linha de borda na área do gráfico. Evitar legendas desnecessárias na área de plotagem. Nas figuras, NÃO usar letras muito pequenas (< tamanho 10 pt), nos títulos dos eixos ou na área de plotagem. Nos eixos (verticais, horizontais) usar marcas de escala internas. NÃO usar linhas de grade horizontais ou verticais, exceto em mapas ou ilustrações similares. O significado das siglas utilizadas deve ser descrito na legenda da figura.
- O número máximo de figuras é de sete em artigos e de três em comunicações e notas científicas e devem ser de alta qualidade.
- As figuras devem estar dimensionadas de forma compatível com as dimensões da Revista, ou seja, largura de uma coluna (8 cm) ou de uma página 17 cm e permitir espaço para a legenda. As ilustrações podem ser redimensionadas durante o processo de produção para otimizar o espaço da Revista. Na figura, quando for o caso, a escala deve ser indicada por uma linha ou barra (horizontal) e, se necessário, referenciadas na legenda da figura, por exemplo, barra = 1 mm.
- No texto, a citação das figuras deve ser com letra inicial maiúscula, na forma direta ou indireta (entre parêntesis). Por exe.: Figura 1 ou (Figura 1). Na legenda, a figura deve ser numerada seguida de ponto antes do título. Por exe.: “Figura 1. Análise...”.
- Para figuras não originais ou publicadas anteriormente, os autores devem informar explicitamente no manuscrito que a permissão para reprodução foi concedida e carregar no sistema da Revista, como documento suplementar, o comprovante outorgado pelo detentor dos direitos autorais.
- Fotografias e ilustrações (Bitmap) devem estar no formato tiff ou jpeg, em alta resolução (mínimo de 300 dpi). Em gráficos de dispersão ou de barras utilizar o formato xls,xlsx, eps, cdr ou ai. Cada uma das figuras inseridas no texto deve

também ser carregada no sistema da Acta Amazonica em arquivo separado, como um “documento suplementar”.

- g. Fotografias devem estar, preferencialmente, em preto e branco. Fotografias coloridas podem ser aceitas, mas o custo de impressão é por conta dos autores. Como alternativa, pode ser usada figura em preto e branco na versão impressa e colorida (se for necessário) na versão eletrônica, sem custo para os autores.
- h. Os autores podem ser convidados a enviar uma fotografia colorida, para ilustrar a capa da Revista. Nesse caso, não há custos para os autores.

3. Tabelas

- a. As tabelas devem ser organizadas e numeradas sequencialmente em algarismos arábicos. O número máximo de tabelas é de cinco para os artigos e de duas para as comunicações e notas científicas. A numeração e o título (autoexplicativo) devem estar em posição superior à tabela. A tabela pode ter notas de rodapé. O significado das siglas utilizadas na tabela (cabecinhos, etc) deve ser descrito no título.
- b. As tabelas devem ser elaboradas em editor de texto (extensão rtf, doc ou docx) e não devem ser inseridas no texto como figura (p. exe. no formato jpeg).
- c. A citação no texto pode ser na forma direta ou indireta (entre parêntesis), por extenso, com a letra inicial maiúscula. Por exe. Tabela 1 ou (Tabela 1). Na legenda, a tabela deve ser numerada seguida de ponto antes do título. Por exe. “Tabela 1. Análise...”.

4. Informações adicionais

- a. A Acta Amazonica pode efetuar alterações de formatação e correções gramaticais no manuscrito para ajustá-lo ao padrão editorial e linguístico. As provas finais são enviadas aos autores para a verificação. Nesta fase, apenas os erros tipográficos e ortográficos podem ser corrigidos. Nessa etapa, NENHUMA alteração de conteúdo pode ser feita no manuscrito, se isso acontecer, o manuscrito pode retornar ao processo de avaliação.
- b. A Acta Amazonica não cobra taxas para publicação. Informações adicionais podem ser obtidas por e-mail acta@inpa.gov.br. Para informações sobre um determinado manuscrito, deve-se fornecer o número de submissão.
- c. As assinaturas da Acta Amazonica podem ser pagas com cheque ou vale postal. Para o exterior, a assinatura institucional custa US\$ 100,00 e a assinatura individual US\$ 75,00. Para contato: valda@inpa.gov.br. Tel.: (55 92) 3643-3643 ou fax: (55 92) 3643-3029.