UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS

MICROPROPAGAÇÃO DE *Bambusa oldhamii* MUNRO E BIOCARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS MULTIFUNCIONAIS

ANDREIA ALVES DA COSTA SILVEIRA

Orientador(a):
Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov

Goiânia - GO
Brasil

Julho – 2018

sistema de bibliotecas ufg

PRPG

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO

UFG

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **[ ] Dissertação** **[x] Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Andreia Alves da Costa Silveira

Título do trabalho: Micropropagação de *Bambusa oldhamii* Munro e biocaracterização de fungos endofíticos multifuncionais

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento [X] SIM [ ] NÃO[1]

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Andreia Alves da Costa Silveira

Assinatura do(a) autor(a)[2]

Ciente e de acordo:

Assinatura do(a) orientador(a)[2]

Data: 25 / 09 / 2018

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

[2] A assinatura deve ser escaneada.

Versão atualizada em setembro de 2017.

ANDREIA ALVES DA COSTA SILVEIRA

MICROPROPAGAÇÃO DE *Bambusa oldhamii* MUNRO E BIOCARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS MULTIFUNCIONAIS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas.

Orientador:

Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov

Coorientadora:

Profa. Dra. Leila Garcês de Araújo

Goiânia, GO – Brasil

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Alves da Costa Silveira, Andreia
Micropropagação de Bambusa Oldhamii Munro e biocaracterização de fungos endofíticos multifuncionais [manuscrito] / Andreia Alves da Costa Silveira. - 2018.
LXXIV, 74 f.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov; co-orientadora Leila Garcês de Araújo.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos (EAEA), Programa de Pós Graduação em Genética & Melhoramentos de Plantas , Goiânia, 2018.
Bibliografia. Anexos.
Inclui siglas, fotografias, símbolos, gráfico, tabelas.

1. bambu in vitro. 2. LED. 3. microrganismos bioestimulantes. 4. sistema fotomixotrófico. I. Sibov, Sérgio Tadeu , orient. II. Título.

CDU 575

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS

UFG

ATA DE DEFESA PÚBLICA DE TESE DE ANDREIA ALVES DA COSTA SILVEIRA. Aos vinte dias do mês de julho do ano de dois mil e dezoito (20.07.2018), às 14h, no Auditório do Setor de Melhoramento de Plantas, na Escola de Agronomia da da Universidade Federal de Goiás, reuniram-se os membros da Banca Examinadora: Dr. Sérgio Tadeu Sibov – Orientador/Presidente, Dr.ª Marta Cristina Corsi de Filippi, Dr.ª Anna Cristina Lanna, Dr. Fábio José Gonçalves e Dr. Renato Carrer Filho. Sob a presidência do orientador, em sessão pública, procedeu-se à avaliação da defesa da Tese intitulada: "Micropropagação de *Bambusa oldhamii* Munro e biocaracterização de fungos endofíticos multifuncionais", de autoria de Andreia Alves da Costa Silveira, discente do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, no nível de Doutorado, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo presidente da Banca Examinadora, Dr. Sérgio Tadeu Sibov, que fez a apresentação formal dos membros da Banca. A palavra, a seguir, foi concedida à autora da Tese que, em 40 minutos, apresentou o seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a doutoranda, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Ao final, a banca reunida em separado procedeu à avaliação da defesa. A Tese foi considerada Aprovada pela Banca Examinadora, cumprindo integralmente este requisito para fins de obtenção do título de DOUTORA EM GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS, pela Universidade Federal de Goiás, em conformidade com o estabelecido pela resolução nº 1403/2016, do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura da UFG (CEPEC/UFG), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas. Para fins de publicação eletrônica, a doutoranda poderá efetuar as modificações eventualmente sugeridas pela Banca Examinadora e encaminhar à Secretaria do PGMP, respeitando-se o prazo máximo de 30 dias após a data da Defesa. A conclusão do curso e a emissão do diploma dar-se-ão em conformidade com o estabelecido pela Resolução CEPEC nº 1403/2016. Cumpridas as formalidades de pauta, às 19h15 a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de Tese e, para constar eu, Sérgio Tadeu Sibov, Coordenador do PGMP, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, segue assinada pelos membros da Banca Examinadora, em duas vias de igual teor.

Dr. Sérgio Tadeu Sibov
Presidente/Orientador

Dr.ª Marta Cristina Corsi de Filippi
Membro Externo

Dr.ª Anna Cristina Lanna
Membro Externo

Dr. Fábio José Gonçalves
Membro Externo

Dr. Renato Carrer Filho
Membro Externo

Só há duas maneiras de viver a vida: a primeira é vive-la como se os milagres não existissem. A segunda é vive-la como se tudo fosse milagre.

Albert Einstein

Para Railson,

Com todo amor do mundo

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ser meu criador e mentor, fonte de todo o conhecimento;

Ao meu esposo e melhor amigo Railson de Paula, pela dedicação e paciência de todos os dias;

Ao orientador Professor Dr. Sérgio Tadeu Sibov, por aceitar orientar neste trabalho, pela paciência e ensinamentos;

À Professora Doutora Leila Garcês, por aceitar co-orientar neste trabalho, pelos valiosos ensinamentos;

À Universidade Federal de Goiás e todos os professores do Programa de Genética e Melhoramento de Plantas, pela paciência e dedicação empregadas;

A todos do Laboratório de Cultura de tecidos Vegetais (LabCultive/UFG), aos estagiários que fizeram parte deste trabalho, Divina Miranda, Taynara Dias, e Rafael Medeiros; pois sem eles o trabalho não estaria completo.

A todos do Laboratório de Genética de Microrganismos, aos estagiários Priscila, Denner, e Matheus, pelo fato de que mesmo não fazendo parte deste projeto, ajudaram e tudo o que poderiam, mesmo com uma conversa descompromissada.

A todos do Laboratório de Biotecnologia de Fungos (ICB), em especial à Professora Doutora Fabrícia de Paula, que nos acolheu de braços abertos;

À Embrapa Arroz e Feijão, principalmente na pessoa da Professora Doutora Marta Cristina Fillipi, por nos acolher no laboratório de microbiologia agrícola, o que possibilitou todo o desenrolar do segundo capítulo deste trabalho.

Aos colegas pós-graduandos que me acompanharam, tanto os colegas do LabCultive quanto do LGM, em especial à Lívia Cristina, Kellen Cristina, Marlene Moreira, Bárbara Klosouski; Suzy Taeko, Guilherme Carneiro, Bruno Mendes, Jacqueline Carvalho, e tantos outros de outros laboratórios que indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho, tanto nos trabalhos rotineiros quantos nas conversas informais regadas à café e boas risadas.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL **1**

GENERAL ABSTRACT **3**

1. INTRODUÇÃO GERAL **4**

2. CAPÍTULO 1: MICROPROPAGAÇÃO DE *Bambusa oldhamii* MUNRO EM SISTEMA HETEROTRÓFICO, MIXOTRÓFICO E FOTOMIXOTRÓFICO **6**

RESUMO **6**

ABSTRACT **7**

2.1 INTRODUÇÃO 8
2.2 MATERIAL E MÉTODOS 9
2.2.1 Estabelecimento *in vitro* **9**
2.2.1.1 Análise multivariada 11
2.2.2 Sistema heterotrófico, mixotrófico e fotomixotrófico **11**
2.2.3 Multiplicação de brotos **12**
2.2.4 Conteúdos de clorofilas e carotenoides **12**
2.3 RESULTADOS 13
2.3.1 Estabelecimento *in vitro* **13**
2.3.2 Análise multivariada de variáveis climáticas **15**
2.3.3 Sistema heterotrófico, mixotrófico e fotomixotrófico **17**
2.3.4 Multiplicação **18**

2.3.5 Clorofilas e carotenóides 20

2.4 DISCUSSÃO 22

2.5 CONCLUSÕES 26

3. CAPÍTULO 2: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS MULTIFUNCIONAIS DE *Bambusa oldhamii* Munro, APLICADOS COMO BIOESTIMULANTES AO ARROZ E ANTAGONISTA À *Magnaporthe oryzae* 27

RESUMO 27

ABSTRACT 28

3.1 INTRODUÇÃO 17

3.2 MATERIAL E MÉTODOS 18

3.2.1 Isolamento de fungos endofíticos 18

3.2.2 Caracterização morfológica das colônias 20

3.2.3 Extração de DNA e identificação dos isolados 20

3.2.4 Caracterização bioquímica qualitativa 21

3.2.4.1 Produção de pectinases 21

3.2.4.2 Produção de celulases 21

3.2.4.3 Solubilização de fosfato 21

3.2.4.4 Produção de ácido cianídrico 22

3.2.4.5 Produção de polifenol oxidases 22

3.2.4.6 Produção de Ácido indol-acético (AIA) 22

3.2.5 Antagonismo entre isolados endofíticos e *M. oryzae* 23

3.2.6 Quantificação de quitinases e glucanases 24

3.2.7 Microbiolização de sementes de arroz 24

3.3 RESULTADOS 25

3.3.2 Caracterização bioquímica qualitativa 40

3.3.4 Antagonismo entre fungos endofíticos e *M. oryzae* 43

3.3.5 Quantificação enzimática 46

3.3.6 Microbiolização de sementes de arroz 47

3.4 DISCUSSÃO 51

3.5 CONCLUSÕES 55

4. CONCLUSÕES GERAIS 56

5. REFERÊNCIAS 57

6. ANEXOS 69

RESUMO GERAL

SILVEIRA, A. A. C. **MICROPROPAGAÇÃO DE *Bambusa oldhamii* MUNRO E BIOCARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS MULTIFUNCIONAIS.** 2018. 74 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola de agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2018.[1]

Na micropropagação, mudas são produzidas em larga escala com homogeneidade, o que pode ser potencializado com sistemas fotomixotróficos, os quais melhoram a qualidade fisiológica das mudas. Fungos endofíticos de bambu possuem potencial de produção de substâncias que podem promover biofertilização e antagonismo contra patógenos. Exemplo de aplicação se dá com o antagonismo contra *Magnaporhe oryzae*, considerado o principal patógeno do arroz. O objetivo deste trabalho foi o estabelecimento de protocolo de micropropagação de *Bambusa oldhamii*; além de caracterizar fungos endofíticos desta espécie, verificar o potencial biofertilizante em arroz e potencial antagonista contra *M. oryzae*. Brotos foram inoculados em meio MS suplementado com 0,45 µM de Tidiazuron – TDZ, 0,2% (p/v) de PPM (*Plant Preservative Mixture*) e 50 mg L^{-1} de canamicina. Os tratamentos consistiram de: diferentes meses de coleta (março-dezembro de 2016) x tipos de tampa (sistema heterotrófico e fotomixotrófico) x condições luminosas [100% azul (455nm), 100% vermelho (630nm), 30% azul + 70% vermelho, 30% vermelho + 70% azul ou branco fluorescente]. Para a multiplicação, brotos foram inoculados em meio MS + 2,27 µM de TDZ ou 3,40 µM de Paclobutrazol - PBZ. Os isolados fúngicos que foram observados no cultivo *in vitro* foram identificados e caracterizados bioquimicamente, além de antagonismo à *M. oryzae* e microbiolização de sementes de arroz. Junho e Julho se constituíram nos melhores meses de coleta, e as variáveis climáticas que mais interferiram na morfogênese foram temperatura mínima, e média compensada. LEDs 30% azul + 70% vermelho obtiveram maiores médias, com aumento de 81,79% no número de folhas. Sistema fotomixotrófico foi superior na multiplicação com TDZ, com aumento de 59,51% em 30% azul + 70% vermelho, 70,80% em 30% vermelho + 70% azul, e 50,49% em luzes brancas fluorescentes. PBZ foi superior em produção de carotenoides, com médias de 128,02 µg/mL em luz azul e tampas convencionais. Foram identificados cinco isolados fúngicos potenciais, denominados: 29 (*Acrocalymma* sp.), 122 (*Botryobambusa fusicoccum*) 711 (*Phoma* sp.), 712 (*Phoma sp.*) e 27 (*Arthrinium marii*) Os isolados 711, 712, 27 e 29 produziram PPO. O isolado 29 produziu maior quantidade de AIA, com 31,55 mg/mL no quarto dia. Observou-se redução do crescimento micelial de *M. oryzae* por todos os isolados, com destaque para o isolado 122. O isolado 711 apresentou solubilização de fosfato, e maiores médias de comprimento da parte aérea, massa fresca e seca na microbiolização em arroz. Pôde-se estabelecer um protocolo eficiente de micropropagação de *B. oldhamii* utilizando sistema fotomixotrófico com LEDs 30% azul + 70% vermelho, assim como foi possível identificar um isolado fúngico promissor para a biofertilização, dados estes que podem ser o alicerce para novos estudos com enraizamento de *B. oldhamii* e promoção de crescimento em espécies recém-aclimatizadas.

Palavras-chave: bambu *in vitro*, LED, microrganismos bioestimulantes, sistema fotomixotrófico.

---

[1]Orientador: Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov, ICB-UFG.
Co-orientadora: Profa. Dra. Leila Garcês Araújo, ICB-UFG.

GENERAL ABSTRACT

SILVEIRA, A. A. C. **MICROPROPAGATION OF *Bambusa oldhamii* MUNRO AND BIOCARACTERIZATION OF MULTIFUNCTIONAL ENDOFITIC FUNGUS.** 2018. 83 p. Thesis (PhD in Genetics and Plant Breeding) - School of Agronomy, Federal University of Goiás, Goiânia, 2018.[1]

In micropropagation, seedlings are produced in large scale with homogeneity, which can be potentiated with photomixotrophic systems, which improve the physiological quality of the seedlings. Endophytic fungi of bamboo have the potential of producing substances that can promote biofertilization and antagonism against pathogens. An example of application is antagonism against *Magnaporhe oryzae*, considered the main pathogen of rice. The objective of this work was to establish the micropropagation protocol of *Bambusa oldhamii*; besides characterizing endophytic fungi of this species, verify the biofertilizer potential in rice and potential antagonist against *M. oryzae*. Buds were inoculated in MS medium supplemented with 0.45 µM Tidiazuron-TDZ, 0.2% (w / v) PPM (Plant Preservative Mixture) and 50 mg L-1 kanamycin. The treatments consisted of: different months of collection (March-December 2016) x types of cap (heterotrophic and photomixotrophic system) x luminous conditions (100% blue (455nm), 100% red (630nm), 30% blue + 70% For the multiplication, shoots were inoculated in MS medium + 2.27 µM TDZ or 3.40 µM Paclobutrazol - PBZ. The fungal isolates that were observed in the in vitro culture were identified and characterized biochemically, besides antagonism to *M. oryzae* and microbiolization of rice seeds, June and July were constituted in the best months of collection, and the climatic variables that most interfered in the morphogenesis were minimum temperature and compensated mean. Photomixotrophic system was superior in the multiplication with TDZ, with increase of 59.51% in 30% blue + 70% red, 70.80% in 30% red + 7 0% blue, and 50.49% in white fluorescent lights. PBZ was higher in carotenoid production, with a mean of 128.02 µg / mL in blue light and conventional lids. TDZ was higher than PBZ when blue was not present. Five potential fungal isolates were identified, 29 (*Acrocalymma* sp.), 122 (*Botryobambusa fusicoccum*) 711 (*Phoma* sp.), 712 (*Phoma* sp.) And 27 (*Arthrinium marii*) isolates 711, 712, 27 and 29 produced PPO. The isolate 29 produced higher amounts of AIA, with 31.55 mg / mL on the fourth day. It was observed a reduction of mycelial growth of *M. oryzae* by all isolates, with emphasis on isolate 122. Isolate 711 presented phosphate solubilization, and higher mean shoot length, fresh and dry mass in rice microbiolization. An efficient micropropagation protocol of *B. oldhamii* using a photomixotrophic system with 30% blue + 70% red LEDs could be established, as well as the identification of a fungal isolate promising for biofertilization, which could be the basis for new studies with rooting of *B. oldhamii* and promotion of growth in newly acclimatized species.

Key words: *in vitro* bamboo, LED, biostimulating microorganisms, photomixotrophic system.

---

[1]Adviser: Prof. Dr. Sérgio Tadeu Sibov, ICB-UFG.

Co-adviser: Profa. Dra. Leila Garcês Araújo, ICB-UFG.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Comumente chamado de "ouro verde" ou "madeira dos pobres", os bambus possuem uma antiga relação com o homem, o que remonta ao começo da civilização na Ásia. Desde o Pleistoceno, os hominídeos podem ter tido o primeiro contato com o bambu para a fabricação de instrumentos de corte, muito antes do contato com instrumentos de pedra lascada (Westergaard & Suomi, 1995; Bar-Yosef et al., 2012). Nos últimos anos a utilização de recursos de bambu tem tido alto crescimento (Singh et al., 2013). Este mercado se baseia na produção de produtos derivados principalmente da madeira do bambu, a qual possui propriedades de resistência que podem ser comparáveis ao aço (Rivas, 2015). Dentre os principais produtos fabricados com o bambu, cita-se utensílios domésticos (talheres, vasilhas, copos, etc.), tapetes, cortinas, tecidos, objetos de arte, papel, biocombustível e o bambu laminado colado - BaLC, em que, a partir deste, tem-se a fabricação de móveis de excelente qualidade (Flander & Rovers, 2009; Abdul Khalil et al., 2012; Kuttiraja et al., 2013).

Os bambus lenhosos podem ser propagados tradicionalmente tanto por via sexuada quanto assexuada. No primeiro caso, a propagação se dá via sementes, e no segundo caso, pode ser dada, por exemplo, por estaquia ou divisão de rizomas (Vongvijitra, 1988). No entanto, com a utilização das técnicas convencionais, algumas espécies podem até produzir mudas, mas a produção em larga escala esbarra em empecilhos, tal como pragas ou baixa taxa de multiplicação, o que torna este tipo de propagação inviável do ponto de vista financeiro (Maoyi et al., 2007). Neste sentido, a escolha do método de propagação é crucial na multiplicação de espécies de bambus. Assim, a cultura de tecidos de plantas é uma boa alternativa para a o cultivo e produção em larga escala, já que os propágulos são multiplicados em proporção geométrica (Gielis et al., 2001). A época de coleta de brotos também é um fator preponderante, pois variáveis climáticas aparentemente influenciam na morfogênese dos explantes, como ocorre em *Bambusa balcooa* (Das & Pal, 2005). Somado a isso, o uso de sistemas fotomixotróficos compostos de Diodos Emissores de Luz – LED e tampas que permitem trocas gasosas entre o ambiente dos frascos de cultivo e ambiente externo, podem potencializar os resultados na micropropagação tais como aumento no número de brotos e produção de clorofila (Folta & Childers, 2008).

Assim como os demais grupos da natureza, os bambus também possuem relações ecológicas mutualísticas com microrganismos, as quais são importantes para manutenção dos sistemas biológicos, além de serem utilizados na biotecnologia. Fungos endofíticos de bambus são relatados como produtores de agentes antimicrobianos, antitumorais e antioxidantes (Liu et al., 2012; Oyetayo et al., 2009), características estas que fazem destes fungos potenciais antagonistas contra fitopatógenos.

Do ponto de vista filogenético, o *Oriza sativa* (arroz) é a espécie cultivada mais próxima à subfamília Bambusoidea (Scoles et al., 2008a; Gui et al., 2010). Com inquestionável importância alimentar, o arroz, assim como todas as espécies vegetais, necessita de fosfato para o seu desenvolvimento. Somado a isso, existem patógenos que atacam esta espécie, para os quais existe a necessidade de aplicação de agrotóxicos. Entretanto, o uso excessivo de fertilizantes e pesticidas químicos tem gerado uma série de problemas ambientais, tais como contaminação do solo e do lençol freático por metais pesados (Rai, 2006). *Magnaporthe oryzae*, fungo causador da brusone, é considerada a doença mais importante da cultura do arroz, a qual pode provocar perdas de até 100% na produção. Esta doença pode se manifestar em toda a parte aérea da planta, desde os estágios iniciais de desenvolvimento até a fase final de produção de grãos. O controle da doença pode ser feito uso de variedades resistentes e fungicidas químicos, entretanto, além do uso de fungicidas ser prejudicial ao meio ambiente, o aparecimento de novas raças pode desencadear a quebra da resistência genética (Silva et al., 2009). Neste sentido, a utilização de controle biológico se faz necessário como um método alternativo para controlar a doença, o que favorece o uso de biofertilizantes, pois, além de nutrir a planta, microrganismos deste tipo podem protegê-la do ataque contra patógenos (Boraste et al., 2009).

Assim, os objetivos deste trabalho foram desenvolver protocolo de micropropagação de *Bambusa oldhamii* Munro avaliando diferentes épocas de coleta de brotos na cidade de Goiânia, em sistema de crescimento heterotrófico e fotomixotrófico, e identificar os fungos encontrados em tecidos de B. oldhamii, introduzido in vitro, e avaliar a aplicação biotecnológica dos fungos endofíticos na obtenção de isolados c/ atividade enzimática e antimicrobiana.

2. CAPÍTULO 1: MICROPROPAGAÇÃO DE *Bambusa oldhamii* MUNRO EM SISTEMA HETEROTRÓFICO, MIXOTRÓFICO E FOTOMIXOTRÓFICO

RESUMO

A propagação convencional de bambus é entendida com uma série de empecilhos, tais como baixo enraizamento, falta de padronização no tamanho de mudas, e ataque de patógenos que inviabilizam a produção em larga escala. Em micropropagação, o uso de sistemas fotomixotróficos promove melhoria da qualidade das mudas, pelo uso de lâmpadas LED e de tampas que permitem trocas gasosas. O objetivo deste trabalho foi o estabelecimento de protocolo de brotação e multiplicação de *B. oldhamii* analisando diferentes épocas de coleta, tipos de tampas, e diferentes comprimentos de onda de LED. Após a assepsia, estes foram inoculados em meio MS suplementado com 0,45 µM de Thidiazuron - TDZ, 0,2% de Plant Preservative Mixture - PPM® e 50 $mg.L^{-1}$ de canamicina. Os tratamentos consistiram de diferentes épocas de coleta (março a dezembro de 2016) combinados à diferentes tipos de tampa (com ou sem trocas gasosas) e à diferentes condições luminosas (LEDs): 100% azul (455 nm), 100% vermelho (630 nm), 30% azul + 70% vermelho, 30% vermelho + 70% azul ou branco fluorescente como controle. Para a multiplicação, brotos foram inoculados em meio MS + 2,27 µM de TDZ ou 3,40 µM de Paclobutrazol - PBZ. Melhores respostas morfogenéticas foram observadas em coletas realizadas em junho e julho, meses mais secos e com temperaturas médias de 23ºC. Observou-se aumento de 81,79% no número de folhas em comparação com o controle em LEDs 30% azul + 70% vermelho. Tampas que permitem a troca gasosa foram superiores na multiplicação, com aumento de brotos de 59,51% em 30% azul + 70% vermelho, 70,80% em 30% vermelho + 70% azul, e 50,49% em luzes brancas fluorescentes. LEDs 30% vermelhos + 70% azuis foram estáveis na produção de clorofilas. PBZ foi superior em produção de carotenoides, com 128,02 µg/mL em luz azul e tampas convencionais. LEDs azuis foram eficientes na multiplicação de brotos, independente da intensidade. Entretanto, TDZ foi superior ao PBZ quando azul não estava presente. Estes resultados compõem um alicerce para o desenvolvimento de protocolos com LEDs para outras espécies de bambu, assim como o desenvolvimento e otimização de protocolos de enraizamento para esta espécie.

Palavras-chave: Bambu, cultivo *in vitro*, lâmpadas LED, trocas gasosas.

ABSTRACT

The conventional propagation of bamboos is understood with a series of hindrances, such as low rooting, lack of standardization in the size of seedlings, and attack of pathogens that prevent the production in large scale. In micropropagation, the use of photomixotrophic systems improves the quality of the seedlings, by the use of LED lamps and covers that allow gas exchanges. The objective of this work was to establish budding and multiplication protocol of *B. oldhamii* by analyzing different harvesting times, types of lids, and different LED wavelengths. After asepsis, they were inoculated in MS medium supplemented with 0.45 µM Thidiazuron-TDZ, 0.2% Plant Preservative Mixture-PPM® and 50 mg.L-1 kanamycin. The treatments consisted of different collection times (March to December 2016) combined with different types of cover (with or without gas exchange) and different light conditions (LEDs): 100% blue (455 nm), 100% red (630 nm), 30% blue + 70% red, 30% red + 70% blue or white fluorescent as a control. For the multiplication, shoots were inoculated in MS medium + 2.27 µM TDZ or 3.40 µM Paclobutrazol - PBZ. Better morphogenetic responses were observed in samples collected in June and July, drier months and with average temperatures of 23ºC. There was an increase of 81.79% in the number of leaves compared to the control in 30% blue + 70% red LEDs. Caps that allowed the gas exchange were superior in the multiplication, with increase of shoots of 59.51% in 30% blue + 70% red, 70,80% in 30% red + 70% blue, and 50,49% in white lights fluorescents. 30% red + 70% blue LEDs were stable in chlorophyll production. PBZ was higher in carotenoid production, with 128.02 µg / mL in blue light and conventional lids. Blue LEDs were efficient in shoot multiplication, regardless of intensity. However, TDZ was superior to PBZ when blue was not present. These results compose a foundation for the development of protocols with LEDs for other species of bamboo, as well as the development of optimization of rooting protocols for this species.

Keywords: Bamboo, *in vitro* culture, LED lamps, gas exchanges.

2.1 INTRODUÇÃO

Bambusa oldhamii Munro é uma espécie de bambu lenhoso, originária da China, possui potencial econômico principalmente na fabricação de móveis, pisos, utensílios domésticos, dentre outras, além de ser utilizada como brotos comestíveis. A espécie pode ser propagada por vias convencionais, tal como estaquia e mergulhia. Entretanto, enfrenta vários problemas neste tipo de propagação, tais como falta de homogeneidade no fenótipo das mudas e ataque de patógenos, o que inviabiliza sua propagação em larga escala (Mohanan, 1997; Vongvijitra, 1988). Com isso, a propagação *in vitro*, ou micropropagação, pode ser uma opção para a produção de mudas desta espécie. Outro fator importante a ser pesquisado é a época de coleta de brotos de bambu para serem utilizados como explantes em cultura de tecidos vegetais. Além da taxa de contaminação por microrganismos aumentar nos períodos chuvosos, variações de umidade, temperatura e índice de evaporação podem influenciar a resposta do material coletado no campo, durante a morfogênese *in vitro* (Das & Pal, 2005).

Em cultura de tecidos vegetais se utiliza basicamente o sistema de cultivo denominado heterotrófico, caracterizado por fontes exógenas de carboidratos adicionados ao meio de cultura, frascos com vedação que não permitem trocas gasosas, e luzes do tipo fluorescente. Entretanto, este tipo de sistema possui vários entraves. A total vedação dos frascos aumenta a umidade e o teor de gases (como o etileno) no interior dos frascos, o que pode causar decréscimo no número de folhas (Kozai & Kubota, 2005). Além disso, a taxa fotossintética pode ser comprometida em várias espécies pelo uso de lâmpadas fluorescentes, que possuem o espectro de luz descontínuo e intensidade luminosa não eficiente para a realização da fotossíntese (Kozai & Kubota, 2005; Yeh & Chung, 2009). No sistema mixotrófico, a possibilidade de frascos com trocas gasosas com o ambiente externo sem a entrada de microrganismos em seu interior, melhora a morfologia da planta, a taxa de transpiração, e consequentemente melhora a taxa de sobrevivência de mudas na aclimatização (Zobayed et al., 1999).

No cultivo *in vitro*, a fotossíntese ocorre de forma eficiente na presença de lâmpadas do tipo PAR (*Photosynthetically Active Radiation*). Lâmpadas do tipo diodo emissor de luz, também conhecidas pela sigla em inglês LED (*Light Emitting Diode*), permitem até 100% de eficiência PAR (Darko et al., 2014). Lâmpadas LED destacam-se

no cultivo *in vitro*, pois podem melhorar a qualidade nutricional e fisiológica da planta aumentando a produção de pigmentos fotossintéticos e outros metabólitos essenciais (Darko et al., 2014). A combinação entre LEDs azuis e vermelhos são capazes de aumentar o conteúdo de clorofilas e carotenoides, além de compostos antioxidantes (Lee et al, 2016). Além de aspectos bioquímicos, a luz também atua como reguladora de crescimento, modelando a arquitetura vegetal. Este mecanismo ocorre devido à ativação de genes ligados a vias metabólicas que podem desencadear respostas semelhantes à dos fitormônios, como giberelinas, auxinas e citocininas (Ouyang et al., 2015). Sendo assim, LEDs podem, por exemplo, aumentar o tamanho do limbo foliar (Lee et al., 2016) ou a quantidade de brotos (Lin et al., 2011) interferindo na morfogênese.

Sistemas fotomixotróficos aliam o uso de lâmpadas LED e o uso de frascos com tampas que permitem trocas gasosas (Kozai et al., 2005; Nhut et al., 2003). Dentre os sistemas de cultivo descritos (heterotrófico, mixotrófico e fotomixotrófico), este último é relatado como o mais eficiente, pois se observa melhor morfogênese e produção de pigmentos fotossintéticos, o que reflete diretamente na melhoria das taxas de sobrevivência na aclimatização (Kozai & Kubota, 2005). A interação entre a combinação de sistemas fotomixotróficos (com o uso de LEDs) e citocininas também é aplicada (Vandenbussche et al., 2007), pois as trocas gasosas são facilitadas tanto pelos níveis fotônicos de luz azul que interferem na abertura de estômatos (Mott & Peak, 2011), quanto pela facilitação das trocas gasosas dentro dos frascos de cultura, o que reflete em melhorias na fisiologia e arquitetura da planta (Terfa et al., 2013).

Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo de brotação e multiplicação de brotos para *Bambusa oldhamii* Munro avaliando diferentes épocas de coleta de brotos, diferentes comprimentos de onda utilizando lâmpadas LED, e em sistemas de crescimento heterotrófico, mixotrófico e fotomixotrófico.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Estabelecimento *in vitro*

Brotos secundários de *B. oldhamii* medindo de 55-60 mm de comprimento foram coletados na coleção de bambus da Universidade Federal de Goiás (Goiânia – GO). Estes foram seccionados de forma que medissem 50 mm e a gema axilar

permanecesse no meio. Os brotos foram lavados superficialmente com solução de detergente neutro (20 µl para cada 100 ml de água) e em seguida, após tríplice lavagem, estes foram imersos em solução de hipoclorito de sódio 0,1% e armazenados à 5ºC por 24 h.

Em condições assépticas os brotos foram imersos em solução de Tween 80® (20 µl para cada 100 ml de água) por 10 min, álcool 70% por 5 minutos e hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) por 15 minutos, seguido de tríplice lavagem em água destilada e autoclavada após cada etapa. Após assepsia preliminar, os brotos foram imersos em solução de PPM® (*Plant Preservative Mixture*) 5% por 24 h segundo recomendações do fabricante. Em seguida, as extremidades dos brotos foram seccionadas de forma que medissem 30 mm. Estes foram colocados em tubos de ensaio contendo meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 30% de sacarose (p/v), 0,45 µM de Tidiazuron (TDZ) (Lin et al., 2007), 0,2% de PPM£ (v/v) e 103,5 µM de canamicina (Miyazaki et al., 2010). Os tubos de ensaio receberam tampas plásticas, e então foram lacrados com três camadas de filme PVC, e permaneceram quinze dias no escuro. Explantes que não apresentavam contaminação por microrganismos foram submetidos aos tratamentos, os quais consistiram de 12 diferentes épocas de coleta de brotos (realizadas na última semana de cada mês do ano de 2016), combinadas a diferentes condições luminosas: luz branca fluorescente – controle (40 µmol m^{-2} s^{-1}), 100% LED azul; 100% LED vermelho; 30% vermelho + 70% azul; e 30% azul + 70% vermelho. O fotoperíodo foi de 16 h de luz e temperatura de 25 ± 1°C. Os explantes permaneceram nestas condições por 60 dias, e o meio de cultura foi renovado a cada 20 dias. O equipamento de LEDs utilizado foi o Sistema de iluminação LED TEC-LUX Tecnal®, o qual possui lâmpadas LED nas cores azul (455 nm), e vermelho (630 nm), prateleiras com 900 mm de largura x 120 mm de comprimento x 80 mm de altura, e cinco fileiras de lâmpadas LED de cada comprimento de onda.

A avaliação ocorreu aos 60 dias, observando-se altura do maior broto, número de brotos e número de folhas. O delineamento experimental foi o inteiramente ao acaso com fatorial 12 x 5 (12 meses de coleta e 5 tipos de condições luminosas), totalizando 60 tratamentos e 30 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram analisadas pelo teste de Scott-Knott com nível de significância 5%. O software utilizado para análise dos dados foi o R (Versão 3.4.3) (R

Core Team, 2017) e para os gráficos, o Graph Pad Prism (Versão 5.01) (Radushev, 2007).

2.2.1.1 Análise multivariada

Foram utilizadas médias de brotos estabelecidos *in vitro* de cada coleta mensal obtida no item anterior das variáveis: altura do maior broto, número de brotos e número de folhas. Estes dados foram comparados a dados climatológicos mensais de índice de evaporação, precipitação total, temperatura máxima média, temperatura compensada média, temperatura mínima média, e umidade relativa média. Os dados climatológicos foram compilados do sítio do Instituto Nacional de Meteorologia - INMET (Brasil, 2017). As médias foram submetidas à análise de componentes principais (PCA) para resumir a quantidade de variáveis do modelo (Wright et al., 2005). O software utilizado para análise dos dados foi o R (Versão 3.4.3) (R Core Team, 2017) e para os gráficos, o Graph Pad Prism (Versão 5.01) (Radushev, 2007).

2.2.2 Sistema heterotrófico, mixotrófico e fotomixotrófico

Duzentos brotos de *B. oldhamii* foram coletados no mês de junho. A assepsia foi realizada como descrito no item anterior, e os explantes foram inoculados em meio MS suplementado com 3% de sacarose (p/v), 0,45 µM de TDZ (Lin et al., 2007), 0,2% de PPM£ (v/v) e 103,5 µM de canamicina (Miyazaki et al., 2010). Metade dos explantes foram inoculados em tubos de ensaio com tampas que continham um orifício de 5 mm com membrana que permitia trocas gasosas desenvolvida por Saldanha et al., (2012) (aqui denominadas tampas TG), e a outra metade com tampas convencionais de polipropileno. Os tubos de ensaio contendo os explantes foram mantidos no escuro por 15 dias, em temperatura de 25 ± 1°C. Em seguida, cada grupo foi subdividido em cinco grupos com 20 tubos de ensaio, correspondentes às 5 condições luminosas descritas no item anterior. Os explantes foram avaliados após 40 dias quanto à altura do maior broto, número de brotos e número de folhas e o meio de cultura foi renovado a cada 20 dias.

O delineamento foi inteiramente casualizado com fatorial 2 x 5 (2 tipos de tampas x 5 condições luminosas), em 10 tratamentos e 20 repetições. Os dados foram submetidos à transformação Box-Cox para atender às pressuposições da análise de

variância, e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott com nível de significância de 5%. O software utilizado para análise dos dados foi o R (Versão 3.4.3) (R Core Team, 2017) e para os gráficos, o Graph Pad Prism (Versão 5.01) (Radushev, 2007).

2.2.3 Multiplicação de brotos

Para a proliferação de brotos, foram utilizados brotos resultantes do experimento do item anterior, e estes foram divididos em agrupamentos de 2 a 3 brotos. Os explantes foram mantidos em suas respectivas condições luminosas e tipos de tampas as quais estavam anteriormente alocados, e, para padronização, foram inoculados em meio MS suplementado com 3% de sacarose (p/v), 103,5 µM de canamicina e 0,2% de PPM® (p/v) (Miyazaki et al., 2010) por 20 dias. Em seguida, explantes foram submetidos aos seus tratamentos compostos por meio MS suplementado com 2,27 µM de TDZ (Lin et al., 2007), ou meio MS suplementado com 3,40 µM de PBZ (Lorenzo et al., 1998), dentro das mesmas condições luminosas e tipos de tampas anteriormente alocadas.

A avaliação se deu aos 40 dias do início do ensaio. Os parâmetros avaliados foram número de brotos e número de folhas. O número de folhas foi calculado diminuindo-se a quantidade final de folhas da quantidade inicial. O número de brotos foi calculado pela razão entre a quantidade final de brotos e a quantidade inicial (Lin et al., 2007). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com fatorial 2 x 5 x 2 (2 tipos de reguladores x 5 tipos de condições luminosas x 2 tipos de tampas), totalizando 20 tratamentos e 10 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias analisadas pelo teste de Scott-Knott com nível de significância 5%. O software utilizado para análise dos dados foi o R (Versão 3.4.3) (R Core Team, 2017) e para os gráficos, o Graph Pad Prism (Versão 5.01) (Radushev, 2007).

2.2.4 Conteúdos de clorofilas e carotenoides

Para análise de clorofilas e carotenoides foram retiradas 150 mg de folhas de *B. oldhamii* resultantes dos explantes do item anterior. Estas folhas foram fragmentadas e acondicionadas em Eppendorfs de microcentrífuga com capacidade para 2 mL. Estes foram imersos em 1,5 mL de acetona, lacrados com Parafilm®, e mantidos

no escuro sob agitação (100 rpm) por 24 h em temperatura de 10ºC. Em seguida, a solução cetônica foi retirada dos tubos e submetida a leitura em espectrofotômetro para a quantificação de clorofila a (662 nm), clorofila b (645 nm) e carotenoides (470 nm). O cálculo da concentração da clorofila a, b, e carotenoides foi realizado segundo as equações de Lichtenthaler (1987).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com fatorial 2 x 5 x 2 (2 tipos de reguladores x 5 tipos de condições luminosas x 2 tipos de tampas), totalizando 20 tratamentos e 3 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias analisadas pelo teste de Scott-Knott com nível de significância de 5%. O software utilizado para análise dos dados foi o R (Versão 3.4.3) e para os gráficos, o Graph Pad Prism (Versão 5).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Estabelecimento *in vitro*

Para as variáveis mensuradas, a altura foi influenciada para as coletas feitas nos meses de maio, junho e julho. Para a variável número de brotos, houve interação para os meses de junho e julho, além da interação do mês de maio com a condição luminosa 30% azul + 70% vermelho, além de branco fluorescente. Já para a variável número de folhas, houve interação para o mês de junho com luminosidade, apresentando o melhor tratamento na condição luminosa 30% azul + 70% vermelho (Figura 2.1).

Foram observados explantes albinos em todos os tratamentos, entretanto, esta frequência aumentou quando esses foram submetidos à LED 100% vermelhos (Figura 2.2), frequência esta que não pôde ser quantificada pela ocorrência de folhas albinas, variegadas, ou verdes em um mesmo explante.

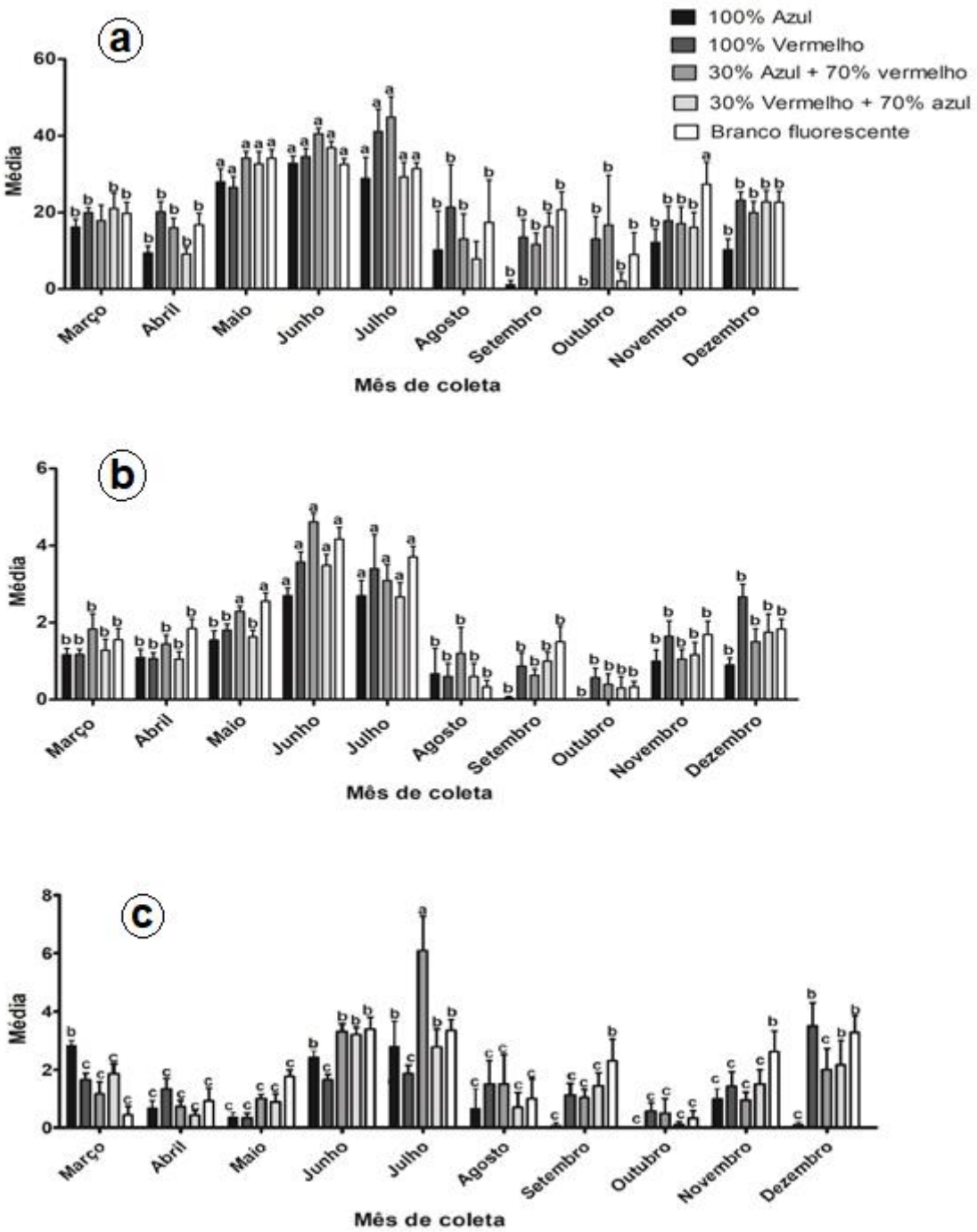

Figura 2.1. Médias e erros padrão do estabelecimento *in vitro* de *Bambusa oldhamii*, avaliando altura do maior broto (a), número de brotos (b), e número de folhas (c) em relação ao mês de coleta, combinadas a diferentes condições luminosas: 100% azul, 100% vermelho, 30% azul + 70% vermelho, 30% vermelho + 70% azul e branco fluorescente. Médias seguidas pela mesma letra na horizontal não são significativamente diferentes pelo teste de Scott-Knott com nível de significância de 5%.

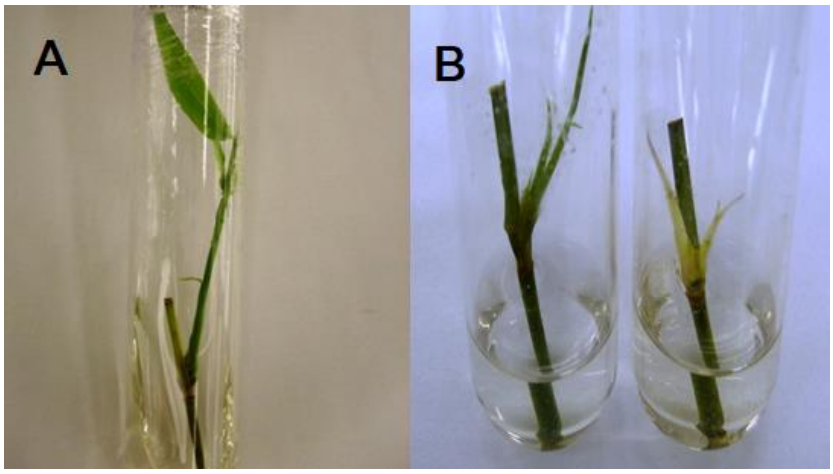

Figura 2.2. Estabelecimento *in vitro* de explantes de *Bambusa oldhamii* em meio MS líquido suplementado com 3% de sacarose (p/v), 0,45 µM de TDZ, 0,2% de PPM£ (v/v) e 103,5 µM de canamicina. **A**: Tratamento com luz branca fluorescente e tampa proporcionando trocas gasosas (sistema mixotrófico) com 40 dias de tratamento. **B**: Tratamentos com tampa fechada com luz branca fluorescente à esquerda, e LED 100% vermelho à direita (apresentando albinismo), com 25 dias de tratamento.

2.3.2 Análise multivariada de variáveis climáticas

Na análise de multivariada foram obtidos nove componentes principais - CP, em que foram observados 59,53% da variação no primeiro componente (CP1) e 27,89% no segundo componente (CP2), o que resulta 87,42% da variação dos dados nos dois primeiros componentes. Os demais componentes representaram 6,98%, 3,21%, 1,28%, 0,82%, 0,21%, 0,05% e 0,0001% da variação total dos dados, respectivamente.

CP1 foi negativamente correlacionado nas variáveis: altura, número de brotos e número de folhas (respectivos *loadings*: -0,40346; -0,37385 e -0,31096) enquanto foi positivamente correlacionado nas variáveis: temperatura mínima, taxa de evaporação, temperatura compensada média, precipitação total, umidade relativa e temperatura máxima (*loadings*: 0,40186; 0,37213; 0,35873; 0,3374; 0,19438 e 0,14307). Em CP2, as variáveis: número de folhas, número de brotos e altura foram positivamente correlacionadas (0,19613; 0,18097; e 0,14199), assim como as variáveis climáticas: umidade relativa, evaporação, precipitação total, e temperatura mínima (0,55875, 0,3018, 0,2973, e 0,11996). Por outro lado, neste mesmo componente, temperatura máxima e temperatura compensada média foram negativamente correlacionadas (-0,56657 e -0,28557).

Na análise de *scores*, CP1 foi positivamente correlacionado com outubro, março, setembro, abril, dezembro e novembro (3,1709; 1,6272; 1,1473; 0,97633; 0,9104 e 0,73655, respectivamente), enquanto que este foi negativamente correlacionado com julho, junho, maio e agosto (-4,1365; -3,8025; -0,54629 e -0,083296). CP2 foi positivamente correlacionado com novembro, dezembro, março, junho e maio (2,3482; 1,8599; 1,3283; 0,49651 e 0,31394); e negativamente correlacionado com setembro, agosto e abril, (-2,667; -1,6228 e -1,1712). Em CP1, foram observados maiores scores nas coletas realizadas nos meses de julho e junho, os quais correspondem às maiores médias de número de brotos, folhas e altura na fotomorfogênese de *B. oldhamii in vitro*. Neste referido período, observou-se temperatura mínima de 16,22ºC junho e 16,05ºC em julho, e temperatura condensada média de 23,37ºC em junho e 23,93 em julho. Estes meses se aproximaram das variáveis da micropropagação (altura, brotos e folhas) na análise de vetores, pelo fato destas últimas estarem negativamente correlacionadas e possuir natureza inversamente proporcional (Figura 2.3). Com isto, sugere-se que a variação da fotomorfogênese de *B. odldhamii* pode ser resumida nestes dois meses, e, segundo estes estudos preliminares, podem ser considerados os melhores meses para coleta de explantes para uso em cultura de tecidos na localidade.

As variáveis analisadas na micropropagação de *B. oldhamii* (altura do maior broto, número de brotos e número de folhas) foram correlacionadas negativamente com variáveis climáticas, o que sugere relação inversamente proporcional. Exemplo disto se dá no fato de que quando a temperatura diminuiu para 16,22ºC no mês de junho e 16,05ºC no mês de julho, houve melhor resposta morfogenética na altura das plantas (Tabela 2.1). O mês de setembro foi o mês em que se observou a menor umidade relativa (média mensal de 39,07%), com as temperaturas mais elevadas do ano (temperatura mínima 20,58ºC, média compensada de 27,54% e máxima de 35,67ºC). Neste mês observou-se a menor média geral de altura de brotos (média 11,81 mm), com decréscimo em relação ao mês de junho (média 37,24 mm). Por este motivo, a análise vetorial apontou aproximação entre o mês de setembro e temperatura máxima e com maior distância em relação às variáveis altura, número de brotos e número de folhas (Figura 2.1). Estas últimas variáveis são mais fortemente correlacionadas com a temperatura mínima, evaporação e temperatura compensada média, o que é explicado pelo alto valor de *loadings*.

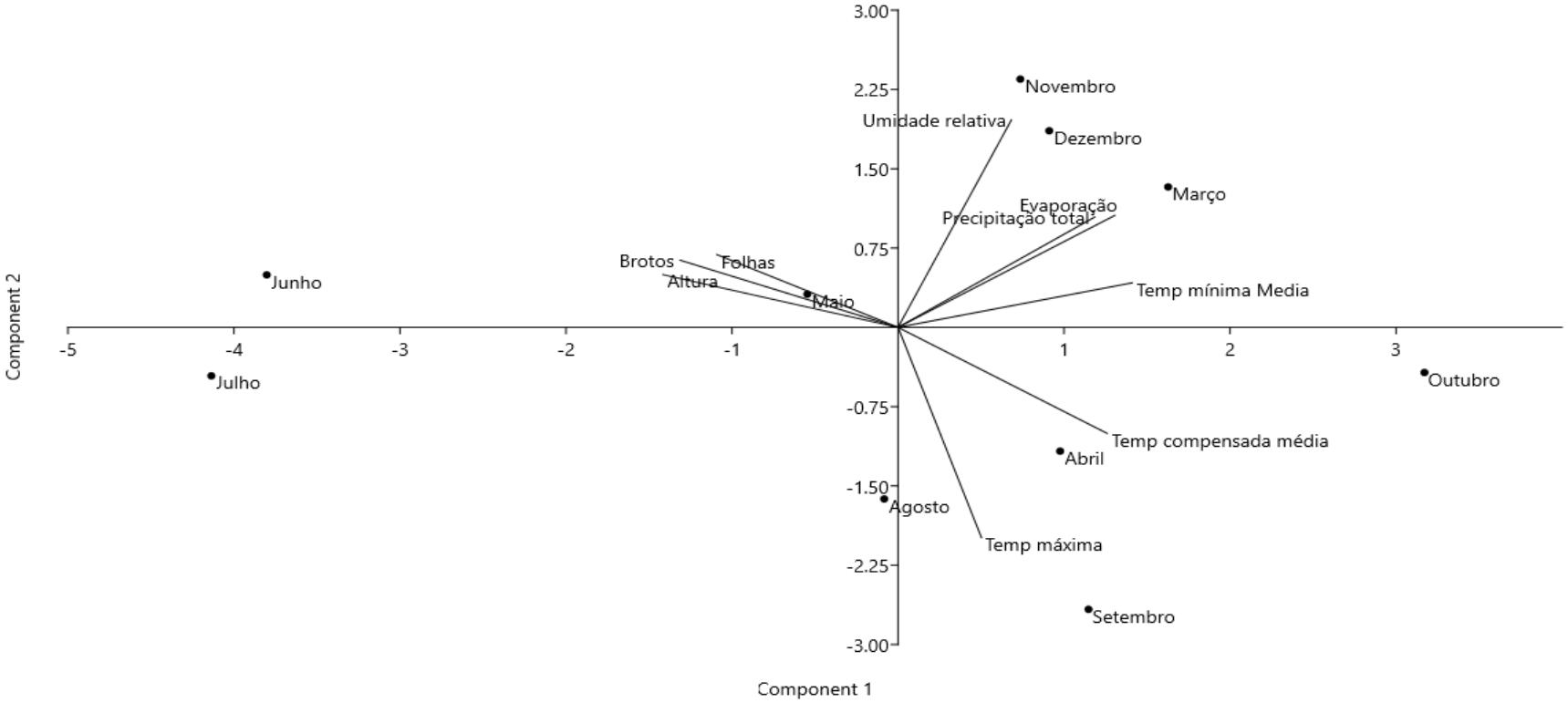

Figura 2.3. *Scatter plot* da análise de componentes principais. Primeiro e segundo componente com variáveis climáticas (temperatura máxima média, temperatura compensada média, temperatura mínima média, índice de evaporação total média, precipitação total média, e umidade relativa média) e variáveis da micropropagação de *Bambusa oldhamii* (altura do maior broto, número de brotos e número de folhas), em relação a diferentes meses do ano (março até dezembro de 2016).

Tabela 2.1. Dados climatológicos referentes ao ano de 2016 para a cidade de Goiânia – GO, Brasil. Dados compilados do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais – INPE (www.inpe.br)

Mês	Evaporação real (mm)	Precipitacao total (mm)	Temperatura máxima média (ºC)	Temperatura compensada média (ºC)	Temperatura mínima média (ºC)	Umidade relativa média (%)
Janeiro	119,74	484,80	29,79	24,45	21,00	80,29
Fevereiro	130,08	155,10	33,23	26,02	21,02	68,92
Março	131,29	156,20	32,32	25,87	21,22	67,85
Abril	74,80	1,30	33,46	26,64	20,20	50,37
Maio	47,87	33,20	32,26	25,15	18,92	53,23
Junho	6,82	0,00	31,23	23,37	16,22	48,26
Julho	3,09	0,00	32,44	23,93	16,05	40,66
Agosto	16,91	15,70	33,39	25,29	17,93	42,11
Setembro	26,99	26,50	35,67	27,54	20,58	39,07
Outubro	143,28	209,20	33,34	26,43	20,62	55,59
Novembro	116,92	110,40	30,47	24,90	20,65	71,21
Dezembro	136,36	169,60	31,79	25,49	20,77	67,35

2.3.3 Sistema heterotrófico, mixotrófico e fotomixotrófico

A interação entre condição luminosa e o tipo de tampa foi para as variáveis altura e número de folhas, o que infere que o tipo de tampa interfere nos resultados quando combinado a diferentes condições luminosas nestas variáveis. No geral, foram observadas maiores médias para a variável altura e número de folhas em tratamentos com tampas que permitem trocas gasosas (tampas TG). A condição luminosa 30% azul + 70% vermelho combinada á tampas TG (sistema fotomixotrófico) promoveu aumento de 43,33% na altura de explantes em comparação á tampas convencionais na mesma condição luminosa. O tratamento com luzes brancas fluorescentes combinadas às tampas TG (sistema mixotrófico) também promoveu aumento significativo em altura, observando-se aumento de 95,77% em comparação á tampas convencionais com a mesma condição luminosa (Figura 2.4).

LEDs 30% azul + 70% vermelho apresentaram maiores médias em número de brotos, independente do tipo de tampa (sem diferença significativa entre estas), com 4,62 brotos em tampa convencional e 4,12 brotos em tampa TG, e aumento em relação a luzes brancas fluorescentes de 10,79% e 26,77% brotos, respectivamente (Figura 2.4). Foram observadas médias superiores em número de folhas nos tratamentos correspondentes a tampas TG combinadas a misturas de LEDs 30% azul + 70% vermelho e 30% vermelho + 70% azul ou luzes brancas fluorescentes, em que não se observou diferença entre estas condições luminosas. O aumento de número de folhas em tampas TG em relação a tampas convencionais correspondeu a 59,51% em 30% azul + 70% vermelho, 70,80% em 30% vermelho + 70% azul, e 50,49% em luzes brancas fluorescentes (Figura 2.4).

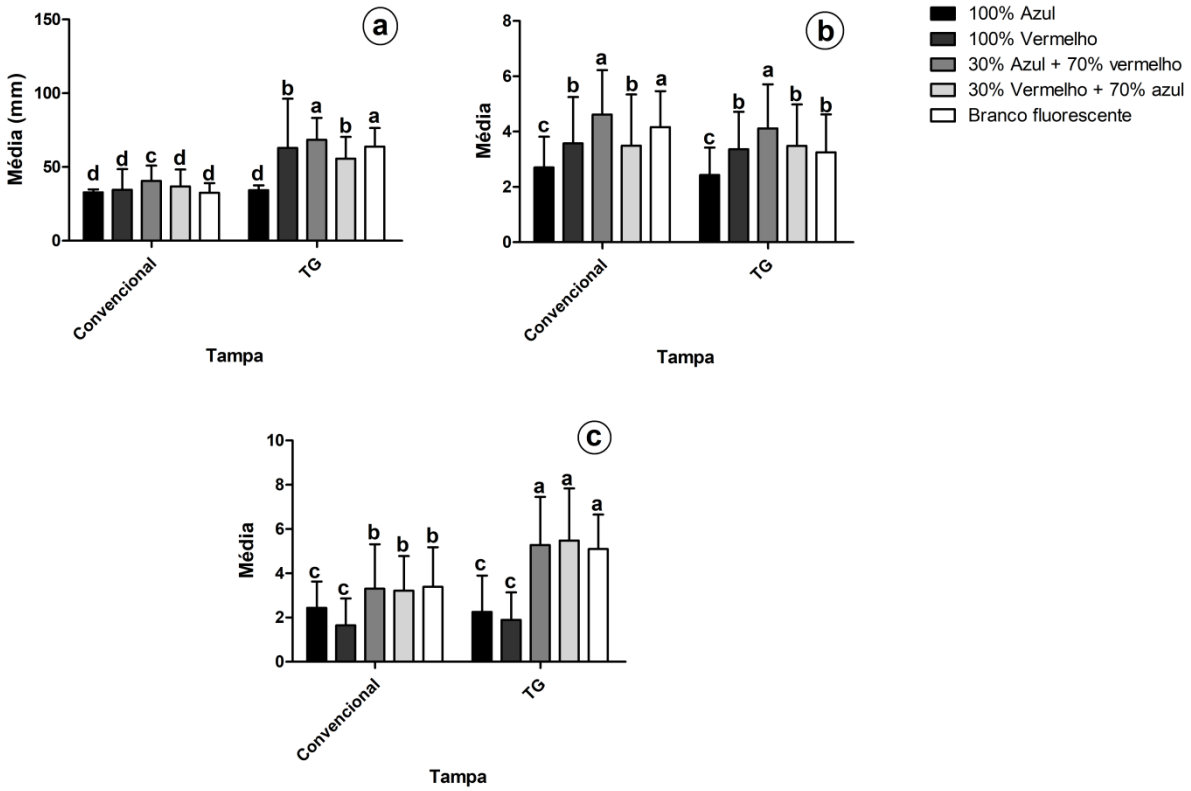

Figura 2.4. Médias e erros padrão do estabelecimento *in vitro* de brotos de *Bambusa oldhamii* coletados no mês de julho, avaliando altura de explantes (a), número de brotos (b) e número de folhas (c), os quais foram submetidos a diferentes tipos de tampas (convencionais ou TG que permitem trocas gasosas) combinadas a distintas condições luminosas (100% vermelho; 100% Azul; 30% azul + 70% vermelho; 30% vermelho + 70% azul; e branco fluorescente). Médias seguidas pela mesma letra em cada gráfico não diferenciam pelo teste de Scott-Knott com nível de significância 5%.

2.3.4 Multiplicação

Observou-se aumento no número de brotos em tratamentos submetidos à TDZ. Quando LED 100% azul foi combinado a esta citocinina, observou-se aumento de 80,72% em tampas convencionais e 78,37% em tampas TG em comparação à mesma condição luminosa com o uso de PBZ.

Houve decréscimo no número de folhas em 100% azul quando combinadas à tampas convencionais, em que se observou média de 1,3 folhas, enquanto que em tampas TG, o número de folhas quadriplicou, com média de 5,37 folhas para a mesma condição luminosa. Desta forma, ao se empregar tampas que permitem trocas gasosas, o número de folhas aumentou significativamente.

LEDs 30% azul + 70% vermelho promoveram aumento de folhas tanto em TDZ quanto em PBZ, independente do tipo de tampa (Figura 2.5). Observaram-se médias superiores em número de folhas em 100% vermelho quando combinado à TDZ, com aumento de 344,42% em tampa convencional e 17,36% em tampa TG em relação à mesma condição luminosa em PBZ. Este aumento também ocorreu em número de brotos quando se utilizou tampas TG, nas quais se obteve média de 1,84 brotos, valor este 64,9% a mais que PBZ na mesma condição luminosa e tipo de tampa. Observaram-se explantes com limbo foliar mais largo em tratamentos submetidos à PBZ no geral, quando comparados com TDZ (Figura 2.6), os quais apresentaram folhas reduzidas, principalmente em 100% azul.

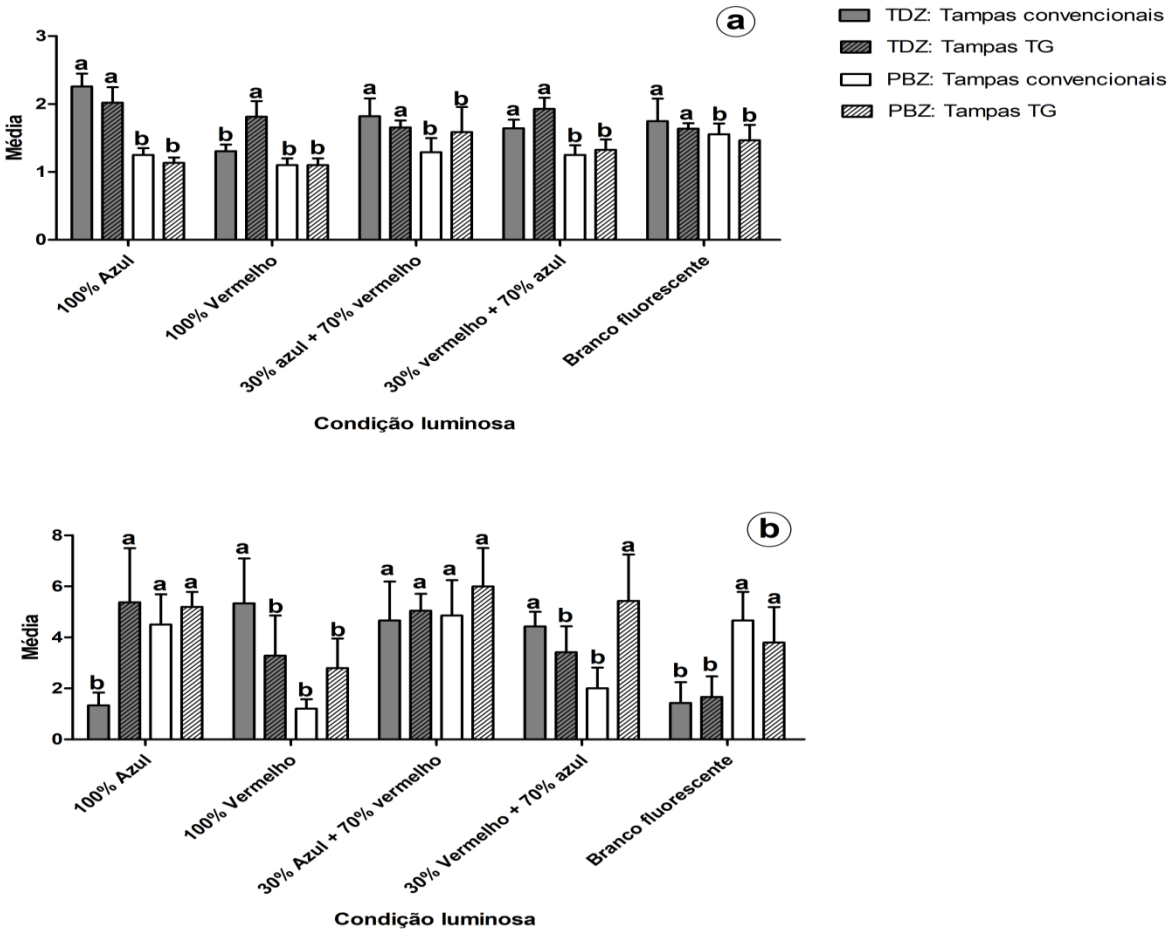

Figura 2.5. Multiplicação de explantes de *Bambusa oldhamii* avaliando-se número de brotos (a) e número de folhas (b), sob dois tipos de reguladores (Tidiazuron - TDZ ou Paclobutrazol - PBZ) combinados a cinco condições luminosas (100% azul; 100% vermelho; 30% azul + 70% vermelho; 30% vermelho + 70% azul; branco fluorescente) e dois tipos de tampas (tampa convencional ou tampa TG que permite troca gasosa). Médias seguidas pela mesma letra não diferenciam pelo teste de Scoot-Knot com 95% de probabilidade.

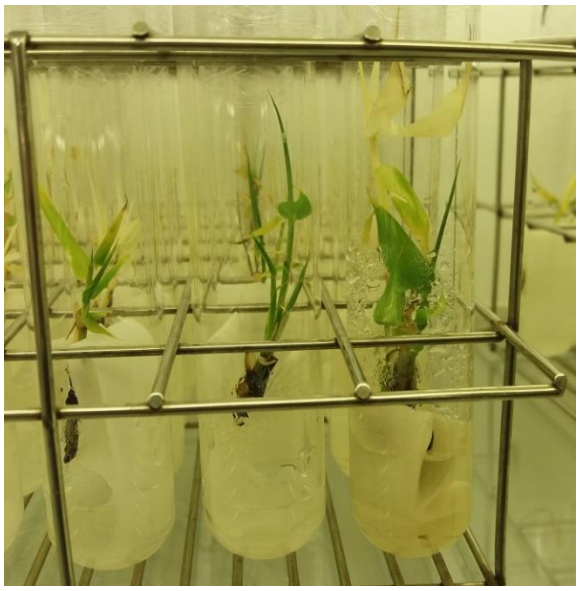

Figura 2.6. Explantes de *Bambusa oldhamii* submetidos à multiplicação de brotos. Primeiro explante (da esquerda para direita): TDZ. Segundo e terceiro explante (da esquerda para direita): PBZ.

2.3.5 Clorofilas e carotenóides

Tratamentos em que se utilizou o PBZ apresentaram maiores médias de clorofila *a* para a maioria das condições luminosas (com exceção de 100% vermelho e branco fluorescente) independente do tipo de tampa. Nos tratamentos submetidos a luzes brancas fluorescentes não se observou diferenças quanto aos tipos de tampas ou entre os reguladores, condição esta em que TDZ equiparou-se com PBZ, independente do tipo de tampa (Figura 2.7).

LEDs 30% azul + 70% vermelho promoveram aumento de clorofila *b* tanto em TDZ quanto em PBZ, independente do tipo de tampa. Isto sugere que esta condição luminosa possa ser a mais estável para esta variável. Entretanto, tratamentos com esta condição luminosa também se equipararam a outras condições luminosas: Branco fluorescente somado à PBZ e tampas convencionais; 30% azul + 70% vermelho somado à PBZ e tampas convencionais; 100% vermelho somado à TDZ e tampas convencionais; 100% azul somado à TDZ e ambos os tipos de tampas; e 100% azul somado PBZ e tampas convencionais (Figura 2.7).

No geral, LEDs 100% vermelhos apresentaram médias inferiores em clorofilas e carotenoides. Por outro lado, quando o TDZ era empregado nesta condição luminosa, ouve aumento significativo de clorofilas *a* e *b*, o que infere que o TDZ compense a falta de luz azul nesta condição luminosa (Figura 2.7).

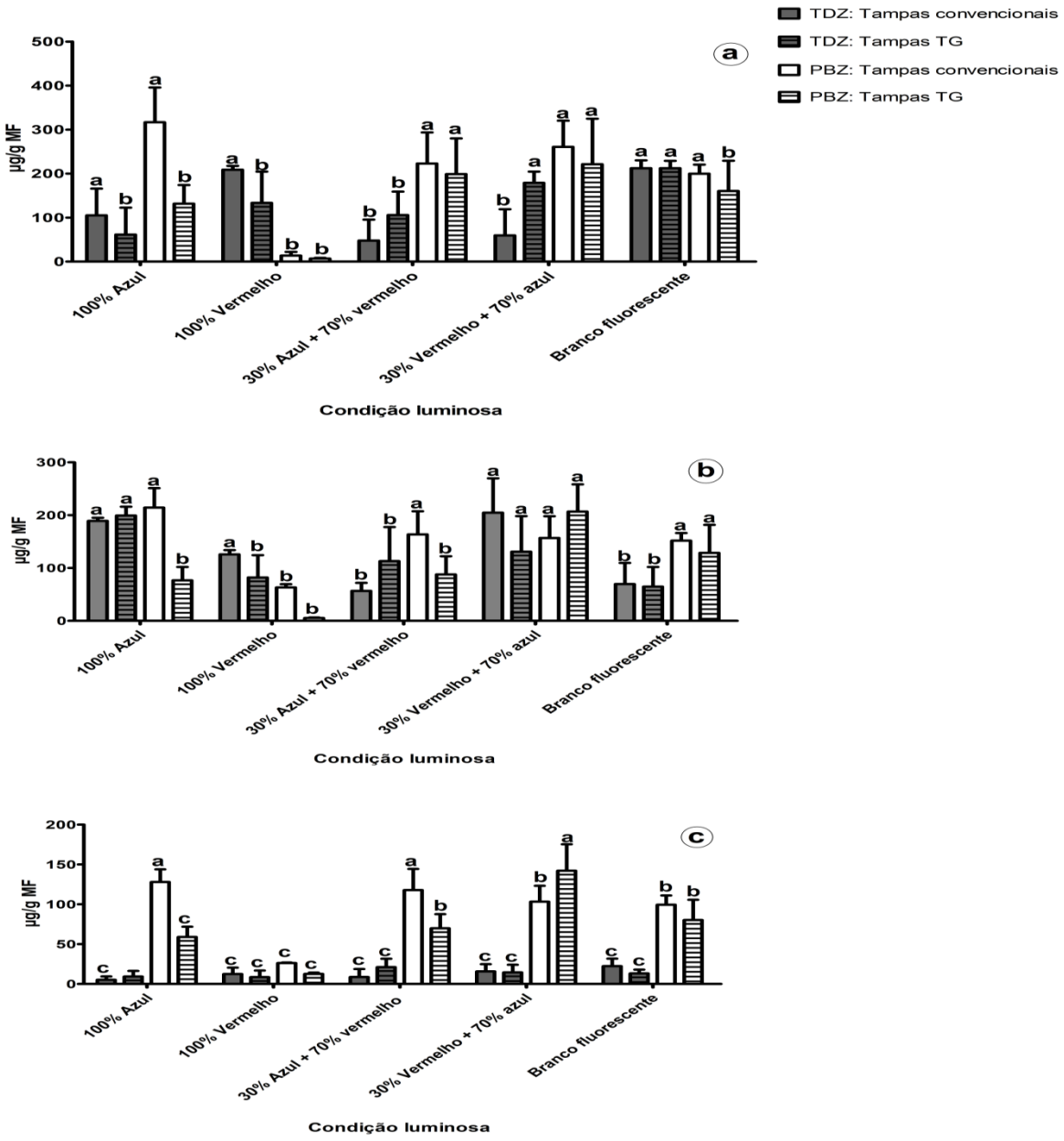

Figura 2.7. Médias de µg/g MF (gramas de Massa Fresca) de clorofila *a* (a), *b* (b) e carotenoides (c) de explantes de *Bambusa oldhamii*, obtidos em cinco condições luminosas (100% Azul, 100% Vermelho, 30% Azul + 70% vermelho, 30% Vermelho + 70% azul e Branco fluorescente), combinados a dois tipos de reguladores de crescimento (µm de TDZ ou µm de PBZ).

O tipo de tampa não influenciou na síntese de carotenoides nos tratamentos compostos por TDZ, assim como tratamentos submetidos à esta citocinina apresentaram médias significativamente inferiores em comparação com o PBZ analisando-se este fator. Entretanto, o tipo de tampa influenciou nos tratamentos com PBZ, com superioridade de tampas convencionais em 100% azul (128,02 µg/mL) e 30% azul + 70% vermelho (117,89 µg/mL). 30% vermelho + 70% azul combinado às tampas TG (média 117,89 µg/mL) também obtiveram médias elevadas, sem diferença entre as condições luminosas citadas (Figura 2.7).

2.4 DISCUSSÃO

A melhor resposta morfogenética em *B. oldhamii* foi observada em materiais coletados nos meses de junho e julho, momento de transição entre o outono e inverno no Brasil, com temperaturas mais amenas na Região Centro-Oeste (Tabela 2.1). Observou-se que a precipitação foi a quarta variável climática que mais influenciou a resposta morfogenética de *B. oldhamii*, perdendo para evaporação, temperatura mínima e média compensada. Com isto, o modelo pode ser resumido nestas três últimas variáveis. Morfogênese *in vitro* de bambus relacionada à épocas de coleta também foi relatada em *B. balcooa* brotos (Das & Pal, 2005). Os autores observaram melhor resposta morfogenética *in vitro* em brotos coletados no mês de outubro na Índia. Este mês corresponde ao outono neste país, com temperaturas mínimas de 19ºC e máximas de 33ºC. Entretanto, entre os meses de janeiro a maio observou-se menor habilidade morfogenética de brotos. Estes meses correspondem ao final do inverno e toda a primavera na Índia, com menor precipitação (média 20 mm) e temperaturas mínimas que variam de 8ºC (janeiro) no inverno, até 26ºC na primavera (maio) (Tutiempo Network, 2017). Com isto, os dados do presente trabalho concordam com os dados obtidos em *B. balcooa*, pois, observou-se maior brotação sob precipitação mínima e temperatura moderada em ambos os estudos, entretanto, este trabalho observou maior correlação entre a temperatura mínima e taxa de evaporação, a qual, esta última, de certa forma está relacionada com o índice de precipitação pela aproximação de vetores observada na figura 2.1.

A correlação entre morfogênese de *B. oldhamii* e variáveis ambientais também foi relatada em estudo de enraizamento em casa de vegetação de estacas desta espécie, objetivando estabelecer melhor temperatura para crescimento de mudas. Observou-se que temperaturas entre 13-15ºC e 25-30ºC correlacionaram-se com o crescimento do colmo, número de ramificações e número de folhas. Entretanto, a taxa de mortalidade de mudas foi

mais alta em temperaturas elevadas (30-35°C), com 34,9%, e a menor taxa ocorreu entre 20-25°C, com 16,6%, o que infere que a temperatura é fator preponderante no cultivo desta espécie (Liu et al., 2008). A morfogênese em plantas está diretamente relacionada, além de fatores genéticos, a fatores ambientais, os quais incluem, por exemplo, temperatura e umidade. Muitas espécies têm esta produtividade acentuada quando são submetidas a condições ambientais similares de seus centros de origem (Boyer, 1982). *B. oldhamii* é uma espécie originária da Ásia, na região da China e Taiwan, localidade de clima temperado de grande amplitude térmica no decorrer do ano (Thiruvengadam et al., 2011), o que sugere uma relação com o decréscimo da temperatura no presente estudo e o aumento das variáveis analisadas. (COPE; SNOWDEN; BUGBEE, 2014; WU et al., 2007)

Outro fator importante no estudo em propagação de bambus é o fato de que agentes contaminantes também dificultam a realização do estabelecimento de um protocolo eficiente pelo fato da correlação existente entre umidade e ocorrência de microrganismos associados ou não à planta (Felber & Pamphile, 2013). Em estudo realizado com *B. balcooa*, foi visto que a ocorrência de explantes contaminados aumentou em explantes coletados entre os meses de junho até setembro, meses estes correspondentes à estação chuvosa na Índia, com altos índices de precipitação. Fato este que justificou a impossibilidade de coleta de dados neste período pelos altos índices de contaminação microbiana endofítica nos frascos de cultura (Das & Pal, 2005). Neste trabalho também foi observada taxa de contaminação de 100% nos meses entre janeiro e fevereiro, meses estes em que normalmente são observados os maiores índices de precipitação total do ano, com 484,80 mm em janeiro e 155,1 mm em fevereiro (Brasil, 2017) o que impossibilitou o estabelecimento *in vitro* neste período. Nos meses subsequentes, a taxa de contaminação oscilou entre 50% - 70%, o que permitiu a realização do trabalho.

No estabelecimento *in vitro* e na multiplicação, a luz azul se mostrou essencial para o desenvolvimento dos explantes. Nos tratamentos com misturas de LEDs combinadas a tampas TG (sistema fotomixotrófico), os explantes apresentaram altura, brotação, e número de folhas satisfatórias, apesar de não se observar diferença entre as proporções de LEDs para a maioria das variáveis. A luz possui papel essencial para regular o crescimento em plantas, pois pode atuar como reguladora de crescimento em cultivo *in vitro*, pois regula a produção de brotos, folhas, e biossíntese de clorofila, o que pode representar melhor qualidade das mudas produzidas e maior taxa de sobrevivência na aclimatização (Wu et al., 2007; Cope et al., 2014). Em estudo com *Dendrobium officinale in vitro*, LEDs azuis foram eficientes por

aumentarem a taxa de brotação em 85% sob esta condição luminosa (Lin et al., 2011b). Em alface, foi observado aumento na massa seca de plantas submetidas à LED azul, assim como aumento na taxa de produção de polifenóis e clorofilas (Johkan et al., 2010).

Relação contrária pode ser feita quando os explantes foram submetidos à LEDs 100% vermelhos, os quais apresentaram baixa produção de clorofila em relação aos demais tratamentos, principalmente quando os explantes foram submetidos ao PBZ. A luz azul possui papel essencial na síntese de pigmentos fotossintéticos. Ela é responsável pela alocação de plastídeos na folha, o que não ocorre com a luz vermelha (Brenner et al., 2005). LEDs vermelhos quando utilizados de forma isolada tendem a promover a chamada "síndrome da luz vermelha", na qual é observado albinismo parcial ou total nas mudas. Isto também foi relatado em pepino, em que se observou, além de albinismo, comprometimento da condutância estomática e atividade fotossintética. Esta condição foi parcialmente reestabelecida ao submeter esta plantas à misturas de LEDs vermelhos e azuis, ou luz azul puro; o que resultou em capacidade fotossintética e condutância estomática parcialmente reestabelecidas (Trouwborst et al., 2016). A melhora na condutância estomática se dá pelo efeito que a luz azul possui no controle da abertura e fechamento de estômatos (Wu et al., 2007; Cope et al., 2014), o que influencia diretamente na capacidade fotossintética pela facilitação da entrada de CO_2 no mesofilo. Estudo realizado em arroz também verificou albinismo em plantas irradiadas com LED 100% vermelho, com baixas taxas de produção de clorofila. Esta condição pôde ser revertida com a adição de citocinina ao meio de cultura, e foi potencializado com a suplementação de luz azul (Roy et al., 2016).

Apesar do albinismo, observou-se desenvolvimento de folhas e crescimento relativamente normal dos explantes em LED 100% vermelho, com a segunda maior média em altura no mês de julho (41,16 mm) sem diferença entre as demais LEDs. Isto ocorre pelo fato desta luz possuir funções específicas ao longo do ciclo de vida da planta, as quais são sobrepostas com outros fotorreceptores (por exemplo, controle de senescência e emergência do hipocótilo também realizado por criptocromos) (Galvão & Fankhauser, 2015), o que explica o desenvolvimento em altura sem diferença significativa entre os outros tratamentos com LEDs azuis ou luz branca fluorescente.

No ensaio de comparação entre sistema heterotrófico, mixotrófico e fotomixotrófico observou-se aumento de número de folhas em tampas TG em relação a tampas convencionais, com maior aumento de 70,80% em 30% vermelho + 70% azul, o que se infere que o sistema fotomixotrófico possa ser a mais indicado para o estabelecimento *in*

vitro desta espécie. Provavelmente, este aumento se deu pelo acúmulo de etileno dentro dos frascos oriundos de sistema com tampa convencional, o que resulta em decréscimo no número de folhas (Kozai & Kubota, 2005). Sistemas fotomixotróficos além de permitirem trocas gasosas entre o frasco de cultura e o ambiente externo, também promovem melhorias na fisiologia da planta (Zobayed et al., 1999).

Misturas de LEDs azuis e vermelhos foram mais favoráveis na emissão de brotos de *B. oldhamii*. Isto também foi relatado em estudo de propagação de *Dendrobium officinalle*, em que se observou aumento de 1,5 vezes no número de brotações quando os explantes foram submetidos à LEDs 100% azuis à misturas de LED azuis e vermelhos (Lin et al., 2011b). Em *Arabdopsis*, criptocromos ativados por luz azul afetam a expressão de genes relacionados à biossíntese de giberelinas e auxinas, com efeito de inibição no alongamento do hipocótilo e estiolamento do caule. Como consequência, as plantas adquirem baixa estatura e a proliferação de brotos é facilitada (Folta et al., 2003). Além disto, a luz azul regula a abertura e fechamento de estômatos, o que é realizado por meio de fosforilação e ativação de potencial elétrico com íons H+ na membrana plasmática, processo este intermediado por zeaxantinas, o que afeta as relações hídricas e a troca de CO_2, o alongamento do caule e o fototropismo (Pedmale et al., 2016).

Observou-se que luzes brancas fluorescentes não diferiram dos tratamentos com LEDs em número de brotos quando TDZ estava presente. Esta condição luminosa possui espectro de emissão de luz largo, entretanto difuso; o qual se caracteriza por três picos: azul, verde e vermelho. Para algumas espécies, como *Vanilla planifolia*, esta condição luminosa é suficiente para a multiplicação de brotos (Bello-Bello et al., 2016), o que concorda com os resultados deste trabalho.

A citocinina TDZ foi superior na multiplicação de brotos (principalmente onde a luz azul estava presente), apesar de se notar visualmente explantes com folhas mais largas e verdes-amareladas com o uso de PBZ, o que foi confirmado pelas altas médias na produção de carotenóides. Entretanto, mesmo sem observar tais diferenças, notou-se leve aumento quando os brotos foram submetidos à 100% azul com esta citocinina, a qual se diferenciou do PBZ nesta condição luminosa. Em *Arabdopsis*, a luz azul não induz especificamente à produção de citocininas, entretanto, ambas ativam vias metabólicas que levam ao acúmulo de proteínas HY5, as quais são ligadas a produção de antocianinas e sinalizadores COP1 que levam à proliferação de brotos e decréscimo no alongamento do caule com inibição de auxinas (Vandenbussche et al., 2007).

O uso do PBZ em cultivo de bambus é relatado por Sood et al., (2013), em *Dendrocalamus hamiltonii*, em que se objetivou o retardo no crescimento de embriões somáticos. Entretanto, o tratamento com 8% de sacarose foi superior, inibindo o desenvolvimento dos embriões. Este regulador de crescimento também é relatado como inibidor de giberelinas e etileno, além de facilitador do aumento de produtos fotossintéticos (Wang & Steffens, 1985), o que explica o aumento visual no limbo foliar nos explantes submetidos à PBZ no presente trabalho, e no aumento da produção de carotenoides em comparação com o TDZ. Em estudo em batata (Tekalign & Hammes, 2004) se observou que, além de aumento de concentração de clorofila e carotenoides, o PBZ foi capaz de aumentar a massa fresca de tubérculos e massa seca de plantas; entretanto não aumentou a taxa de multiplicação, similarmente como ocorreu no presente estudo, em que se observou decréscimo na multiplicação de brotos em PBZ.

Quando LED 100% vermelho foi combinado ao uso de TDZ e tampas convencionais, observou-se aumento nos níveis de clorofilas *a* e *b* em comparação com o tratamento com PBZ na mesma condição luminosa, o que infere que citocininas possam suprir a necessidade de luz azul na produção de pigmentos fotossintéticos. Em *Arabdopsis*, citocininas podem induzir a biossíntese de clorofilas em pontos do fotosistema II, sistema este chamado de LHCP-II (*Light-Harvesting* Chl *a/b*) (Buetow et al., 1988). Este sistema é ativado por receptores de membrana para este regulador de crescimento e também modulam a transcrição e o acúmulo de plastídeos (Brenner et al., 2005).

2.5 CONCLUSÕES

Neste trabalho, *B. oldhamii* apresentou resultados superiores em fotomorfogênese nos meses de coleta de junho e julho. O melhor sistema de cultivo para a maioria das variáveis analisadas se constituiu do sistema fotomixotrófico, com mistura de LEDs (30% azuis + 70% vermelhos), somados á tampas TG. O TDZ apresentou os resultados superiores em multiplicação de brotos de *B. oldhamii* em comparação ao PBZ, independente da condição luminosa.

Mais experimentos deverão ser conduzidos em trabalhos futuros para comprovar os dados obtidos, tais como a coleta em vários anos e locais diferentes, a fim de se comprovar a relação genótipo-ambiente.

3. CAPÍTULO 2: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FUNGOS ENDOFÍTICOS MULTIFUNCIONAIS DE *Bambusa oldhamii* Munro, APLICADOS COMO BIOESTIMULANTES AO ARROZ E ANTAGONISTA À *Magnaporthe oryzae*

RESUMO

O uso de microrganismos bioestimulantes, além de melhorarem o desenvolvimento das plantas, muitos podem possuem o potencial de produção de substâncias antimicrobianas que podem iniber alguns patógenos. O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar fungos endofíticos de *Bambusa oldhamii*, e verificar o potenciais bioestimulante na cultura do arroz. Isolado fungicos foram isolados de brotos de *B. oldhamii*, purificados e identificados por análises de sequências nrDNA de *Internal Transcript Spacer* (ITS 1 e 4) e Elongation Factor (EF e EFα-1) por similaridade em sequências depositadas no GenBank, e confirmadas por análise filogenética das sequências ITS 1-2 e morfológica. A caracterização bioquímica foi realizada avaliando a produção Polifenol Oxidases (PPO), pectinases, celulases, ácido cianídrico, e Ácido indolacético (AIA), glucanases, quitinases, e de substâncias solubilizadoras de fosfato. Os isolados foram submetidos a testes de antagonismo *in vitro* direto e indireto à *Magnaporthe oryzae* e conduzidos a testes *in vivo* com microbiolização de sementes de arroz. Foram identificados cinco isolados fúngicos, denominados Isolado 27 (*Arthrinium marii*); Isolado 29 (*Acrocalymma* sp.), Isolado 122 (*Botryobambusa fusicoccum*); Isolado 711 (*Phoma* sp.), e Isolado 712 (*Phoma sp.* (711). Os isolados 27, 29, 711, e 712 produziram Polifenol oxidases. O isolado 29 produziu maior quantidade de AIA e quitinases, com 31,55 mg/mL em 96 h, e 2,59 U/mL em 120 h respectivamente. O isolado 122 produziu maior glucanase, com 2,65 U/mL em 72 h. O isolado 711 apresentou atividade de solubilização de fosfato *in vitro*, assim como proporcionou o maior acréscimo em plantas de arroz comprimento da parte aérea, massa seca (parte aérea e raízes), com aumentos em relação ao controle de 83,58%, 1330%, 1500%, e respectivamente. O isolado 711 foi considerado promissor como bioestimulante, o que servirá como alicerce para futuros estudos com promoção de crescimento em arroz e indução de resistência à *M. oryzae*.

Palavras-chave: Bambu, bioestimulante, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

The use of biostimulant microorganisms, in addition to improving plant development, many may have the potential to produce antimicrobial substances that may iniber some pathogens. The objective of this work was to isolate and characterize endophytic fungi of *Bambusa oldhamii*, and verify the potential biostimulant in rice culture. Isolated fungus were isolated from *B. oldhamii* shoots, purified and identified by nRDNA analysis of Internal Transcript Spacer (ITS 1 and 4) and Elongation Factor (EF and EFα-1) by similarity in sequences deposited in GenBank, and confirmed by phylogenetic analysis of the ITS 1-2 and morphological sequences. The biochemical characterization was performed by evaluating polyphenol oxidases (PPO), pectinases, cellulases, hydrocyanic acid, and indoleacetic acid (AIA), glucanases, chitinases, and phosphate solubilizing substances. The isolates were submitted to direct and indirect in vitro antagonism tests to Magnaporthe oryzae and conducted *in vivo* tests with rice seed microbiolization. Five fungal isolates, known as Isolado 27 (*Arthrinium marii*); Isolated 29 (*Acrocalymma* sp.), Isolated 122 (*Botryobambusa fusicoccum*); Isolate 711 (*Phoma* sp.), And Isolate 712 (*Phoma* sp. (711).) Isolates 27, 29, 711, and 712 produced Polyphenol oxidases, isolate 29 produced higher amounts of AIA and chitinases at 31.55 mg / mL at 96 h, and 2.59 U / mL at 120 h, respectively, and the isolate 122 produced a higher glucanase, with 2.65 U / mL in 72 h. the highest increase in rice plant length, dry mass (shoot and roots), with increases in relation to the control of 83.58%, 1330%, 1500%, and respectively. Isolate 711 was considered promising as a biostimulant , which will serve as a foundation for future studies with growth promotion in rice and induction of resistance to *M. oryzae*.

Key-Words: Bamboo; biostimulant; antimicrobian activity.

3.1 INTRODUÇÃO

Fungos bambusícolas (anteriormente denominados de *Fungorum bambusicolorum*) são estimados em mais de 1.450 espécies existentes em aproximadamente 115 gêneros ao redor do mundo, os quais incluem, principalmente, ascomycetos, basiomycetos, coleomycetos, hyphomycetos e fungos anamórficos (Dai et al., 2017; Shukla et al., 2016). Tais fungos associados ao bambu são importantes pelos compostos que produzem, por exemplo, metabólitos com propriedades antioxidantes, antimicrobianas e antitumorais (Liu et al., 2012; Oyetayo et al., 2009).

É de comum conhecimento que o uso de agrotóxicos se faz necessário para o controle de pragas na agricultura. Entretanto, o uso excessivo destes agentes químicos para o controle de patógenos gera uma série de problemas ambientais, como por exemplo, a contaminação do solo e do lençol freático por metais pesados (Lu et al., 2015). Na cultura do arroz, destaca-se a brusone como principal patógeno, causada pelo fungo *Magnaporthe oryzae* B. C. Couch [anamorfo - *Pyricularia oryzae* Cavavara] o qual, sob condições favoráveis, pode provocar perdas de até 100% nas lavouras (Prabhu et al., 2009). Para o controle da doença é necessário, além do uso de fungicidas, o manejo integrado por meio de práticas culturais.

O termo bioestimulante é definido como qualquer substância ou microrganismo aplicado às plantas com o objetivo de aumentar a eficiência nutricional, a tolerância ao estresse abiótico e/ou características de qualidade da cultura, independentemente de seu conteúdo de nutrientes (Du Jardin, 2015). Com isto, estes microrganismos promovem o acréscimo em biomassa na planta, em especial no número de raízes, assim como em raízes fasciculadas (Rose et al., 2014).

Dentro do conceito de microrganismo bioestimulante, existe a subcategoria de biofertilizantes, os quais são definidos como uma solução contendo organismos vivos, que, quando aplicados em sementes, plantas, ou solo, colonizam a planta e promovem crescimento por meio do aumento da eficiência do uso de nutrientes e abrem novas rotas de aquisição destes nutrientes pelas plantas (Du Jardin, 2015; Vessey, 2003). Estes microrganismos são definidos como fixadores de nitrogênio, decompositores de matéria orgânica (ou celulolítecos), produtores de auxinas, e solubilizadores de potássio e fosfato (Board, 2004; Boraste et al., 2009; Meena et al., 2016; Rai, 2006). Este último grupo tem atraído grande interesse dos agricultores por várias razões, dentre elas cita-se: (1) a natureza finita das jazidas de fosfato (Scholz et al., 2013); (2) o fato de que o fosfato possuir forma aniônica, tornando-

se insolúvel e indisponível para a planta ao entrar em contato com outros minerais no solo (Lopez-Bucio et al., 2003); e, (3) o fato de que a adubação química é altamente dispendiosa para o agricultor (Zaidi et al., 2009)..

Com a eminente crise de decréscimo de jazidas de fosfato e o uso desenfreado de fertilizantes e pesticidas químicos (Adesemoye & Kloepper, 2009), microrganismos bioestimulantes se tornam importantes para a agricultura, pois, além de nutrirem a planta, podem promover o crescimento, assim como produzir e secretar enzimas que conferem antagonismo à patógenos (Naznin et al., 2014; Whitelaw, 1999).

Dentre as espécies cultivadas, *Oryza sativa* - arroz é considerada a espécie com posição filogenética mais próxima à família Bambusoidea (Peng et al., 2010). Esta relação é confirmada em estudo de transferibilidade de marcadores SSR do arroz para o bambu, em que a mais alta transferibilidade se dá em marcadores no cromossomo 7 do arroz, sugerindo-se que esta região seja conservada entre estas espécies (Chen et al., 2010; Scoles et al., 2008). Com isso, dada relação filogenética entre as duas espécies, infere-se que microrganismos endofíticos de bambus possam ser aproveitados em estudos como bioestimulante em arroz. Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar bioquimicamente fungos endofíticos de *Bambusa oldhamii* Munro e avaliar possíveis efeitos de antagonismo à *M. oryzae*, e bioestimulante em em arroz, visando futuros trabalhos com indução de resistência e promoção de crescimento.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Isolamento de fungos endofíticos

Brotos secundários de *B. oldhamii* medindo entre 55 a 60 mm foram coletados no mês de março de 2016 na Coleção de Bambus da Universidade Federal de Goiás (Goiânia – GO). Estes foram seccionados em 50 mm, lavados superficialmente com solução de detergente neutro (50 µL para cada 100 ml de água) e, após tríplice lavagem, foram imersos em solução de hipoclorito de sódio (0,0025% de cloro ativo) e armazenados à 5ºC por 24 h.

Em câmara de fluxo laminar foi realizada a assepsia com solução de Tween 80® (50 µL para cada 100 ml) por 10 min, álcool 70% por 5 minutos e hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) por 15 min., seguido de tríplice lavagem em água deionizada e autoclavada após cada etapa. Após a assepsia, os brotos foram imersos em solução do biocida PPM®

(*Plant Preservative Mixture*) a 5% por 24 h. Em seguida, as amostras foram seccionadas em tamanho de 30 mm e foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com 30% de sacarose, 0,45 µM de Tidiazuron (TDZ) (Lin et al., 2007), 0,2% de *Plant Preservative Mixture* - PPM£ e 103,5 µM de canamicina. Os tubos de ensaio contendo os brotos e meio de cultura permaneceram 15 dias no escuro e 15 dias em sala de crescimento (intensidade luminosa de 30 µM s^{-1}, fotoperíodo de 16 horas de luz).

Após os 30 dias, as colônias fúngicas crescidas foram transferidas para placas de Petri contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) por duas vezes consecutivas para a purificação das colônias, as quais não apresentavam conideogênese neste meio de cultura. Observaram-se características de coloração, textura e forma de crescimento do micélio para a purificação. As placas foram armazenadas em sala de crescimento com temperatura de 28 r 1 ºC e fotoperíodo de 12 horas de luz.

3.2.2 Extração de DNA e identificação dos isolados

Estes tiveram o micélio raspado e o DNA extraído (Dellaporta et al., 1983). A qualidade da extração foi medida em espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 e, após a diluição do DNA para 20 ng/µl, as amostras foram amplificadas e sequenciadas pela BPI Biotecnologies. As amostras de DNA foram amplificadas utilizando primers para as sequências das regiões genômicas Internal Transcribed Spacer (ITS 1 e 4) (Manter & Vivanco, 2007), e Translation Elongation Factor (EF e EF1-α) (Carbone & Kohn, 1999). As amostras amplificadas foram avaliadas em gel de agarose 2%, corados com UniSafe Dye 0,03% (v/v), visualizado sob luz UV e quantificados por fluorometria (Qubit, Thermofisher). Para a reação de Sequenciamento foi utilizado BigDye® Terminator v3.1 e Cycle Sequencing Kit (Apllied) e, para a reação de precipitação foi utilizado Etanol/EDTA/Acetato de Sódio de acordo com protocolo sugerido pelo fabricante. O sequenciamento automático por eletroforese capilar foi realizado no equipamento ABI3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Para identificação molecular dos isolados, as sequências resultantes foram submetidas à busca BLAST com o banco de dados NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) e confirmadas por análise filogenética das regiões ITS1-5.8S-ITS2, juntamente com análise morfológica no caso dos isolados em que se observou conideogênese nos meios de cultura descritos no próximo item, com base em chaves dicotômicas e revisões atualizadas (Barnett

& Hunter, 1998; Dai et al., 2017; Shukla et al., 2016). As sequências ITS 1 e 2 foram alinhadas pelo ClustalW utilizando o software MEGA versão 7 (Kumar et al., 2016). A árvore foi construída usando o método da Máxima Verossimilhança (Nei & Kumar, 2000). A análise de Bootstrap (10000 replicatas) foi utilizada como suporte estatístico (Wu et al., 2009). A(s) árvore(s) inicial (is) foram obtidas aplicando algoritmos de Neighbor-Join e BioNJ (Saitou & Nei, 1987). Foram utilizadas apenas sequências publicadas em periódicos, e as sequências resultantes deste trabalho foram depositadas no GenBank

3.2.3 Caracterização morfológica das colônias

Um disco de micélio de cada colônia fúngica purificada medindo 5 mm foi transferido para placas de Petri (90 x 90 mm) contendo 30 ml de diferentes meios de cultura, para induzir diferentes morfologias e taxa de crescimento radial, assim como conideogênese. Os meios utilizados foram: BDA [batata (200 g); dextrose (20 g); ágar (20 g)], FMA [flocos de milho (30 g); dextrose (10 g); ágar (20 g)], AA [aveia (40 g); dextrose (20 g); ágar (20 g)]; TSA [tomate (30 g); sacarose (20 g); ágar (20 g)] e BH – Bushnell Haas [sulfato de magnésio (0,20 g); cloreto de cálcio (0,02 g); fosfato de potássio monobásico (1,00 g); fosfato de potássio bibásico (1,00 g); nitrato de amônio (1,00 g); cloreto de ferro (0,05 g) e dextrose (10,00 g)] (Conceição et al., 2005). As placas contendo os meios de cultura e segmentos das colônias fúngicas foram lacradas com filme plástico PVC e incubadas em sala de crescimento com temperatura de 28 r 1 ºC e fotoperíodo de 12 horas de luz.

A avaliação foi realizada a cada 2 dias, observando-se o crescimento radial; aspecto de coloração; a presença ou ausência de conidiogênese, assim como a observação ao microscópio óptico para caracterização de hifas e conídios. A taxa de crescimento dos isolados foi calculada pela média dos valores obtidos pela equação: CRP – CRA / CRA. Em que, CRP refere-se ao crescimento radial da avaliação anterior e CRA o crescimento radial atual. Os dados quantitativos foram submetidos à análise de variância e as médias avaliadas pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%.

Para a observação microscópica dos isolados montou-se lâminas com parte do micélio fúngico, 10 µL de água destilada e deionizada e, em alguns casos, 1 µL de azul de metileno na concentração de 0,1% para corar hifas hialinas. A observação foi realizada em microscópio óptico com câmera fotográfica digital acoplada.

3.2.4 Caracterização bioquímica qualitativa

3.2.4.1 Produção de pectinases

Um disco de micélio de cada isolado medindo 5 mm foi transferido para placas de Petri contendo meio M9 (2,0 g de sacarose; 6,0 g de Na_2HPO_4; 3,0 g de KH_2PO_4; 0,5 g de NaCl; 1,0 g de NH_4Cl e 15,0 g de ágar) suplementado com 1,2 g de extrato de levedura e 4,0 g de pectina por litro. Após autoclavagem do meio de cultura, adicionou-se 10 mL de $CaCl_2$ 0,01 M e 1 mL da solução de $MgSO_4,7H_2O$ 1 M, ambas autoclavadas separadamente. O experimento foi realizado em triplicatas, e, as placas foram incubadas a 28-30ºC, em fotoperíodo de 12 horas de luz. Após 3 dias retirou-se o micélio com o auxílio de um bastão de vidro e lâmina de bisturi, e adicionou-se HCL 2N até cobrir o meio de cultura. As colônias que formaram halo claro foram consideradas produtoras de pectinase (Cattelan, 1999).

3.2.4.2 Produção de celulases

Um disco de micélio de cada isolado medindo 5 mm foi transferido para placas de Petri contendo meio Tripticaseína de Soja Ágar (TSA) suplementado com 10 g L^{-1} de celulose cristalina em pó. O experimento foi realizado em triplicatas, e, as placas foram incubadas a 28-30ºC por 5 dias. Em seguida, verteu-se sobre elas solução de corante Vermelho Congo 0,03%. Após 30 minutos, retirou-se o excesso de corante e adicionou-se solução de NaCl 1 M durante 15 minutos. A produção de celulases foi verificada pela presença ou ausência da formação de uma zona clara em volta da colônia no meio de cultura (Cattelan, 1999).

3.2.4.3 Solubilização de fosfato

Um disco de micélio de cada isolado medindo 5 mm foi colocado em placas de Petri contendo 30 ml de meio Tripticaseína de soja ágar (TSA 1/10 – p/v) acrescido de $CaHPO_4$ com pH ajustado à 7,0. O experimento foi realizado em triplicatas, e, as placas foram incubadas a 28-30ºC até o crescimento do controle (placas com cada isolado sem a adição da fonte de fósforo). O potencial de solubilização foi constatado pela formação de um halo claro em torno da colônia no meio de cultura (Cattelan, 1999).

3.2.4.4 Produção de ácido cianídrico

Um disco de micélio de cada isolado medindo 50 mm foi transferido para placas de Petri contendo 30 ml de meio TSA (1/10 – p/v) enriquecido com 4,4 g de glicina/L e 0,3 mM de $FeCl_3.6H_2O$. Papel filtro embebido com solução de ácido pícrico (4,58 M de ácido píprico e 5,29 M de carbonato de sódio) foi colocado na parte superior da placa e, após estas serem lacradas com filme PVC, foram incubadas a 26ºC na presença de luz constante por três dias. O experimento foi realizado em triplicatas, e, a presença de coloração do papel de marrom para amarelo-alaranjado indicou a produção de ácido cianídrico (Cattelan, 1999).

3.2.4.5 Produção de polifenol oxidases

A comprovação de produção qualitativa de polifenol oxidase foi realizada segundo a Reação de Bavendamm (Conceição et al., 2005). Um disco de micélio de cada isolado medindo 50 mm foi colocado em placas de Petri contendo 30 mL de meio de cultura AAEL [ágar (20 g); ácido tânico (5 g); extrato de levedura (15 g); sacarose (5 g)]. As placas foram incubadas em sala de crescimento com temperatura de 28-29ºC e fotoperíodo de 12 horas de luz por cinco dias. O experimento foi realizado em triplicata. A formação de halo de coloração âmbar no meio de cultura em torno da colônia indicou a produção qualitativa de polifenol oxidase.

3.2.5 Produção quantitativa de Ácido indol-acético (AIA)

Cinco discos de micélio de cada isolado fúngico foram colocados em frascos contendo 50 mL de meio BD [Batata (200 g L^{-1}) e dextrose (20 g L^{-1})], na ausência (controle) e presença de L-triptofano na concentração de 100 mg L^{-1}. O experimento foi realizado em triplicatas. A cada 2, 4, 6 e 8 dias de crescimento sob agitador rotativo a 150 rpm e 26 ± 2 ºC, foi retirada a alíquota de 1 mL do meio de cultura contendo os isolados fúngicos. O micélio foi separado por centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos. Para a análise colorimétrica de AIA foram utilizados 100 µL do reagente de Salkowski [$FeCl_3$ 0,5 mol/L + $HClO_4$ (35%)] e 150 µL do sobrenadante. Após a comprovação qualitativa da presença de AIA (coloração rosa após 25 min. de reação à temperatura de 28ºC no escuro), o hormônio foi quantificado em espectrofotômetro em 540 nm. As concentrações em µg/mL foram calculadas a partir de uma

curva padrão com concentrações conhecidas da forma sintética do hormônio (0 a 100 µg/mL) cujas leituras foram a base para calcular a concentração de AIA nas amostras (Oliveira et al., 2012).

3.2.6 Antagonismo entre isolados endofíticos e *M. oryzae*

Discos de micélio de 7 mm de diâmetro dos isolados fúngicos de bambu foram colocados em placas contendo 30 ml meio de cultura BDA segundo o método do círculo (Da Luz, 1990), no qual um discos dos dois isolados devem ser posicionados equidistantes. As placas contendo somente discos de micélio de *M. oryzae* localizadas no centro foram utilizadas como controle. As placas foram incubadas em sala de crescimento (28r 1ºC e fotoperíodo de 12 horas de luz) até o crescimento completo do controle, o que aconteceu em 10 dias. Em seguida, procedeu-se a leitura radial do crescimento micélio de *M. oryzae* em todas as placas (Cattelan, 1999).

Discos de micélio medindo 5 mm de diâmetro de cada isolado endofítico foram colocados no centro de placas de Petri (90 x 90 mm) contendo 30 ml de meio de cultura BDA. Discos de micélio de *M. oryzae* crescidos em meio de cultura BDA também foram colocados da mesma forma, em outra placa de Petri. A tampa de todas as placas de Petri foi removida, e as bases de cada placa contendo isolado endofítico (antagonista) e o patógeno (*M. oryzae*), foram unidas, formando uma unidade experimental. Placas contendo somente discos de micélio de *M. oryzae* foram utilizadas como controle. As placas foram incubadas em sala de crescimento (28 r 1ºC e fotoperíodo de 12 horas de luz) até o crescimento completo do controle. Em seguida, procedeu-se a leitura radial do micélio de *M. oryzae* em todas as placas (Cattelan, 1999; Dennis & Webster, 1971).

Tanto no antagonismo direto quanto no indireto, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 7 tratamentos, compostos por 7 isolados fúngicos e 4 repetições. Os dados foram submetidos à transformação Box-Cox para que atendessem às pressuposições da análise de variância – ANOVA, e as médias foram analisadas pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%. O software utilizado para análise dos dados foi o R (Versão 3.4.3) (R Core Team, 2017).

A porcentagem de inibição de crescimento (PIC) no antagonismo direto e indireto foi realizada segundo a equação (CN – DP)/CN x 100 (Shen et al., 2012), em que CN refere-se ao diâmetro do controle negativo, ou seja, o isolado de *M. oryzae* crescido sem a

interferência de nenhum antagonista; e DP refere-se ao diâmetro de *M. oryzae* quando submetido ao antagonismo de um dos isolados endofíticos de *B. oldhamii*.

3.2.7 Quantificação de quitinases e glucanases

Os quatro melhores isolados identificados nos ensaios anteriores foram utilizados neste experimento. Cinco discos de micélio de 5 mm de cada isolado fúngico foram cultivados em 100 mL de meio mínimo modificado ($NaNO_3$ 0,6 %; KCl 0,05%; KH_2PO_4 0,15%; $FeSO_4$ 0,001%; extrato de levedura 0,25%; $(NH_4)_2SO_4$ 0,25%; $ZnSO_4$ 0,001%) (Pontecorvo et al., 1953), suplementado com duas diferentes fontes de carbono: 0,5% de quitina coloidal e 2% de glicose (p/v). As culturas foram mantidas em erlenmeyers a 120 rpm, a 28°C durante 144 horas. A cada 24 horas foram retiradas amostras de 1 mL de cada erlenmeyer, estas foram transferidas para microtubos, centrifugadas a 5.000 rpm por 15 min. e usadas como fonte de enzimas (Almeida et al., 2007; Noronha & Ulhoa, 2000).

A atividade de quitinase – CHI foi determinada utilizando-se uma alíquota de 50 µL dos extratos de cada amostra, em triplicata, acrescentando 300 µL de quitina 1% em tampão acetato de sódio a 1,0 M e pH 5,0. Após incubação a 37°C durante 120 min., foi quantificado o produto da reação por meio do método colorimétrico de DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico) 1% (Miller, 1959), acrescentado em cada amostra na quantidade de 1 mL, em seguida a reação foi incubada a 100°C, durante 5 minutos. A quantidade de açúcares redutores foi determinada em espectrofotômetro a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de açúcar redutor por minuto.

A atividade de β-1,3-glucanases - GLU foi determinada utilizando 50 µL dos extratos de cada amostra, em triplicata, acrescentando 300 µL de laminarina a 0,75% em tampão acetato de sódio a 1,0 M e pH 5,0. Após incubação a 37°C durante 30 min., a quantificação do produto da reação seguiu o mesmo método colorimétrico empregado para atividade de quitinase.

3.2.8 Microbiolização de sementes de arroz

Em condições assépticas, 120 sementes de arroz (cultivar BRS Primavera) foram imersas em solução de detergente neutro (10 gotas para cada 100 mL de água) por 10

minutos, solução de álcool 70%, e hipoclorito de sódio 0,025%, com tríplice lavagem após cada etapa. As sementes foram separadas em 6 grupos contendo 20 sementes e cada grupo de sementes foi submetido aos tratamentos de microbiolização, compostos por cinco isolados fúngicos selecionados a partir dos dados enzimáticos e de antagonismo. Os tratamentos constituíram de 5 gramas de micélio raspado crescido em meio BDA dos isolados 27, 29, 122, 711, e 712, em 100 mL de água destilada e autoclavada. O tratamento controle se constituiu de sementes imersas em água destilada e autoclavada. As sementes foram mantidas em Erlenmeyers contendo a referida suspensão por 48 h. Findado o tempo, as sementes foram retiradas e secas em temperatura ambiente (25ºC) por 2 horas.

As sementes foram plantadas em vasos contendo solo autoclavado e adubado com NPK (5 g de 5-30-15 + Zn e 3 g de sulfato de amônio). Após 35 dias de semeadura, as plantas foram retiradas dos vasos e suas raízes cuidadosamente lavadas. Mediu-se o comprimento total da parte aérea; comprimento de raízes; massa fresca e seca de raízes; e massa fresca e seca da parte aérea. A massa seca foi determinada pela introdução das plantas (raízes separadas da parte aérea) em estufa à 65ºC por 7 dias ou até atingirem peso constante por 3 dias. O conteúdo de água presente nos tecidos foi mensurado diminuindo-se os valores da massa fresca pela massa seca.

O delineamento foi inteiramente casualizado, composto por seis tratamentos e vinte repetições. Os dados foram submetidos à Análise de Variância, e as médias analisadas pelo teste de Tukey. Quando não atendidas as pressuposições de normalidade, os dados foram submetidos à transformação Box-Cox. O Software utilizado foi o R (R Core Team, 2017).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Identificação molecular

Após purificação do micélio, foram obtidos cinco isolados, os quais foram denominados isolados 27, 29, 122, 711 e 712. A amplificação da região ITS1-5.8S-ITS2 com os primers ITS1 e ITS4 produziu fragmentos de aproximadamente 580 pb para os isolados 27 e 122; 510 para o isolado 29; 500 para o isolado 711; e 550 para o isolado 712. A amplificação da região EF produziu 295 pb para o isolado 29, 211 pb para o isolado 122, 300 pb para o isolado 711, e 289 pb para o isolado 712. A amplificação da região EF-α produziu fragmentos de aproximadamente 306 pb para o isolado 29, 205 pb para o isolado 122, 310 pb

para o isolado 711, e 307 pb para o isolado 712. Não foi possível obter a sequência EF e EF-α para o isolado 27 pelo fato de que o protocolo sugerido por Carbone & Kohn (1999) para amplificação destes primers não foi eficiente para obter-se qualidade satisfatória na amplificação.

As sequências ITS e EF obtidas dos isolados foram analisadas no NCBI BlastN do GenBank, em que se observou-se similaridade de 100% do isolado 27 com *Arthrinium marii* (acessos CBS 200.57, CPC: 18902 e CPC:464.83). O isolado 29 apresentou 93% de similaridade tanto com *Acrocalymma vagum* (acesso 167), quanto com *A. medicaginis* (acesso CPC 24340). O isolado 122 apresentou 99% de similaridade com *Botryobambusa fusicoccum* (acesso MFLUCC 11 C0657). O isolados 711 e 712 apresentaram respectivamente 100% e 99% de similaridade com *Phoma* sp., com acessos EA-122 e CB-R-4, respectivamente.

A análise das sequências homólogas ITS1-5.8S-ITS2 de cada isolado endofítico foi elaborada, resultando em uma árvore filogenética com 04 famílias, e a porcentagem bootstrap dos taxa é mostrada próximo aos ramos (Figura 3.3). Observou-se ramo separado do isolado 29 (*Acrocalymma* sp.), dentro de seu respectivo taxon, evidenciando uma espécie de *Acrocalymma* não identificada (Figura 3.3).

3.3.2 Caracterização morfológica

A análise morfológica das colônias em diferentes meios de cultura apontou um morfotipo do isolado 27 (*Arthrinium marii*), um do isolado 29 (*Acrocalymma* sp.); Quatro do isolado 122 (*B. fusicoccum*); três morfotipos do isolados 711 (*Phoma* sp.) e três do isolado 712 (*Phoma* sp.) (Tabela 3.1).

O isolado 27 apresentou conideogênese e clamidósporos em meio FMA. A análise morfológica do isolado 27 apontou células conideogênicas castanhas, agregadas ou não, em formato globoso ou subgloboso lenticular, medindo 6,83-10,5µm x 2,33-6,83 µm (Largura x comprimento). As hifas foram observadas com coloração hialina, medindo 1,62-0,69µm. Este isolado apresentou clamidósporos oblongos, agrupados, medindo 2,00-6,93µm x 1,33-4,02µm (largura x comprimento). O isolado 29 apresentou conideogênese em meio FMA, apresentando células conideogênicas hialinas, oblongas, individuais ou agrupadas, medindo 1,62-1,78µm x 1,40-1,71µm. As hifas apresentaram-se finas e hialinas, medindo 1,03-1,61µm. O isolado 122 apresentou clamidósporos em meio de cultura AA. Estes apresentaram

células oblongas, negras, multinucleadas, medindo ; As hifas se apresentaram negras, septadas, uni ou multinucleadas, com diâmetro de 3,33-6,16µm (Figura 3.1).

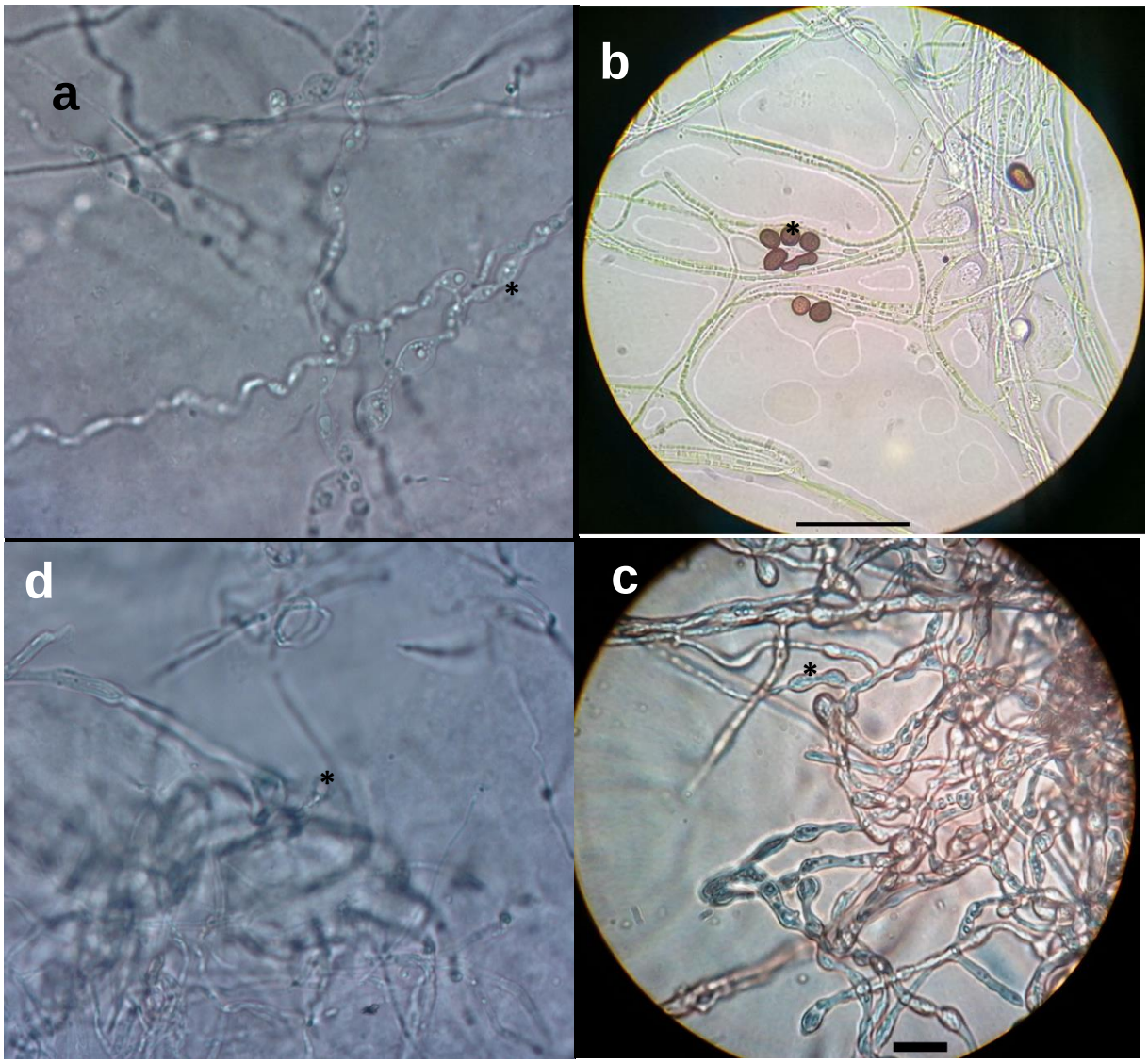

Figura 3.1. a e **b**: Isolado 27 (*Arthrinium marii*), com destaque para os clamidósporos (asterisco) (a), e células conideogênicas (asterisco) (b). c: células conideogênicas (asterisco) e hifas do isolado 29 (*Acrocalymma* sp.). d: Clamidósporos (asterisco) do isolado 122 (*Botryobambusa fusiococcum*).

A conideogênese do isolado 711 foi observada em meio FMA. Os conídios apresentados eram do tipo picnídios, medindo 31,87-100µm x 81,25-100µm (largura x comprimento), glabros, globosos, ostíolos marrom-enegrecidos (dimensões 12,5-87,26µm), e peridium de coloração marrom. Hifas septadas, uni ou multinucleadas, com dimensões de 9,3 µm – 19,7 µm (Figura 3.2). O meio de cultura FMA também foi favorável à formação de clamidósporos no isolado 712 (*Phoma* sp.). Estes se apresentaram medindo entre 28,13µm x 25,73µm, peridium catenulado, vermelho-marrom, glabros, globosos ou subglobosos, e

individuais ou agrupados (Figura 3.2). As hifas apresentaram-se septadas, glabras, uni ou multinucleadas, medindo entre 6,5 µm – 35,5 µm.

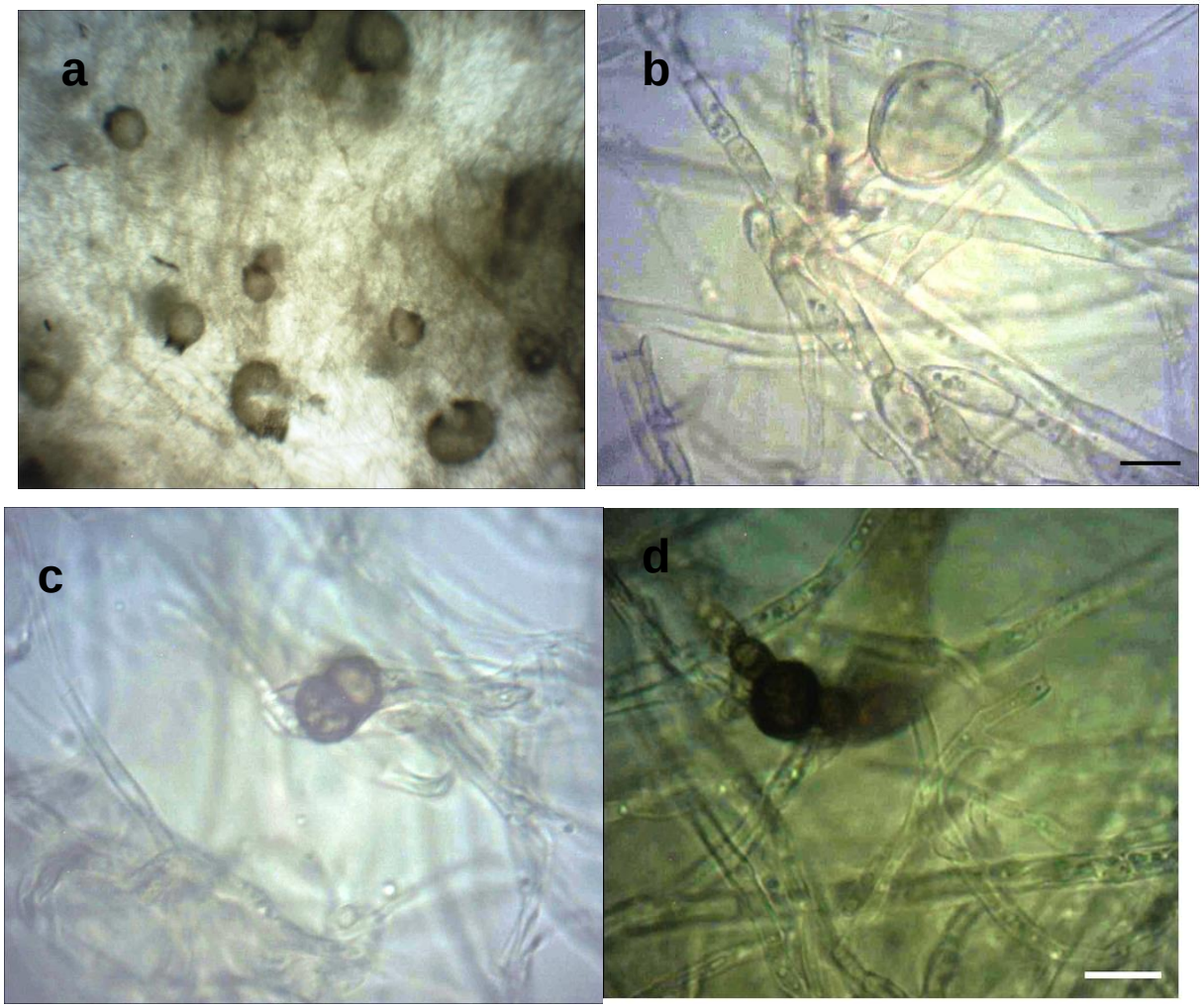

Figura 3.2. a (Picnídeos) e **b** (Clamidósporos) do isolado 711 (*Phoma* sp.). Clamidósporos (**c** e **d**) do isolado 712 (*Phoma* sp.) Aumento de 40x em **a**, e 100x (b, c e d). Barra=100µm em **a** e 10 µm em **b, c** e **d**.

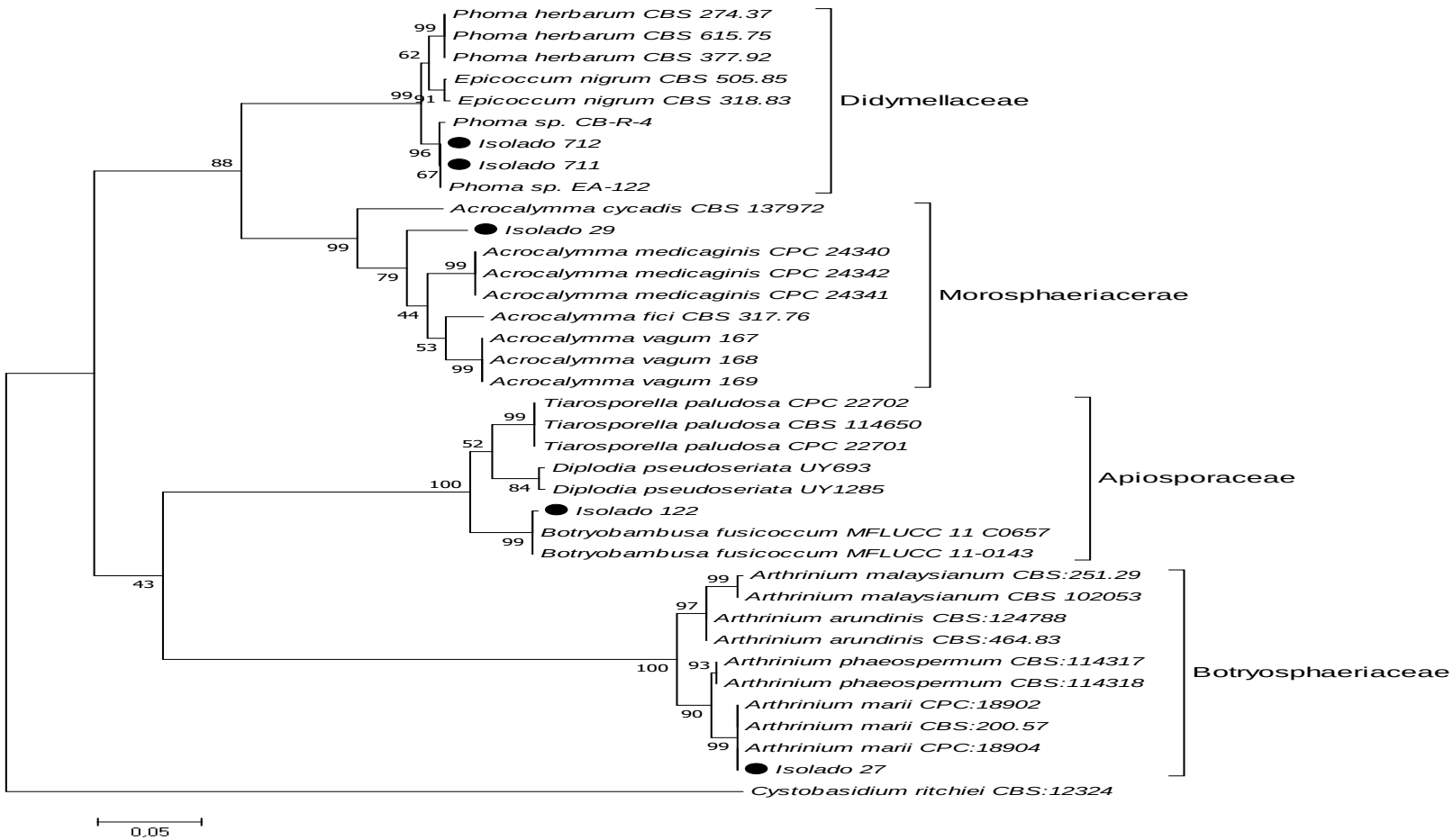

Figura 3.3. Árvore de sequências homologas ITS I-5.8S-ITS2, de cinco isolados endofíticos de *Bambusa oldhamii* (Log= -2413.69): 712: *Epiccocum camelliae*; 711: *Phoma* sp.; 29: *Acrocalymma* sp.; 27: *Arthrinium marii*; e 122: *Bobryobambusa fusicoccum*. *Cystobasidium ritchiei* (CBS:12324) é apresentado como grupo externo Barra = 0.05.

Tabela 3.1. Características morfológicas das colônias dos isolados endofíticos de *Bambusa oldhamii*, avaliadas sob diferentes meios de cultura.

Isolado	Características	BDA	AA	FMA	TSA	BH
	Cor	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco
27	**Aspecto**	Cotonoso	Cotonoso	Grumoso	Grumoso	Grumoso
	Crescimento	Aéreo	Aéreo	Aéreo	Aéreo	Aéreo
	Cor	Branco	Branco	Branco	Branco	Branco
29	**Aspecto da colônia**	Cotonoso	Cotonoso	Cotonoso	Cotonoso	Cotonoso
	Crescimento	Esparsso	Esparsso	Esparsso	Esparsso	Esparsso
	Cor	Preto	Cinza	Branco	Branco	Branco
122	**Aspecto da colônia**	Grumoso	Grumoso	Grumoso	Grumoso	Cotonoso
	Crescimento	Aéreo denso	Aéreo	Esparsso	Esparsso	Aéreo
	Cor	Branco - Palha	Branco	Branco	Branco	Branco
711	**Aspecto da colônia**	Grumoso	Grumoso	Cotonoso	Grumoso	Grumoso
	Crescimento	Micélio aéreo	Micélio aéreo	Esparsso	Micélio aéreo	Micélio aéreo
	Cor	Rosa/vermelho	Rosa/vermelho	Rosa/vermelho	Amarelo-palha	Branco
712	**Aspecto da colônia**	Grumoso	Grumoso	Grumoso	Grumoso	Grumoso
	Crescimento	Aéreo	Aéreo	Aéreo	Aéreo	Aéreo

Dentre os diferentes meios de cultura avaliados, o meio FMA favoreceu significativamente o crescimento dos isolados 711 e 712. Entretanto, não se observou diferença significativa deste meio de cultura em comparação com meios BDA e TSA em colônias do isolado 122. Para os isolados 27 e 29, todos os meios de cultura favoreceram o crescimento das colonias, sem diferença siginificativa entre estes.

Os isolados 29 e 122 apresentaram crescimento mais rápido em relação aos outros fungos (Tabela 3.2), os quais alcançaram crescimento completo na placa de Petri (90x90mm) em aproximadamente 48 h em meio BDA. Por outro lado, o isolado 29 (*Acrocalymma* sp.) apresentou crescimento micelial mais lento em relação aos demais nos meios de cultura avaliados (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Taxa de crescimento (%) ao dia de isolados endofíticos de *Bambusa oldhamii* em diferentes meios de cultura: Batata-Dextrose-Ágar (BDA), Ágar-Aveia (AA), Flocos de milho-Ágar (FMA), Tomate-Sacarose-Ágar (TSA), e Bushnell Hass (BH).

Isolado	Gêneros	BDA	AA	FMA	TSA	BH
27	*Arthrinium marii*	22,43bA	16,68bA	37,77abA	20,31bA	18,09bA
711	*Phoma* sp.	10,91bcD	11,33bCD	38,80abA	29,76bB	18,90bC
712	*Phoma sp.*	12,62bcB	9,58bB	36,57abA	30,41bAB	18,22bAB
122	*Botryobambusa fusicoccum*	49,22aA	40,50aB	50,00aA	50,00aA	30,28aC
29	*Acrocalymma* sp.	9,13cA	10,10bA	12,02cA	11,34cA	11,03bA

*médias que não compartilham uma letra minúscula na vertical para análise de meios de isolados e maiúscula na horizontal para análise de meios de cultura, são significativamente diferentes pelo teste de Tukey a 95% de probabilidade.

3.3.3 Caracterização bioquímica qualitativa

Nenhum dos cinco isolados produziu celulases, pectinases, ou ácido cianídrico *in vitro* (Tabela 3.3). Dentre os isolados avaliados, o isolado 711 (*Phoma* sp.) foi o único isolado que solubilizou fosfato *in vitro*, com a comprovação da formação de halo claro no meio de cultura em torno da colônia (Figura 3.5). Os isolados 27 (*Arthrinium* sp.), 29 (*Acrocalymma* sp.), 711 (*Phoma* sp.), e 712 (*Phoma sp.*) apresentaram halo de coloração âmbar em meio AAEL, indicando a produção de polifenol oxidase – PPO (Figura 3.7).

Tabela 3.3. Produção de enzimas *in vitro* por isolados de *Bambusa oldhamii* avaliados qualitativamente. "+" indica produção positiva, e "-" indica não-produção.

Isolado	Celulases	Pectinases	Ácido cianídrico	Solubilização de fosfato	Polifenol oxidases - PPO
27	-	-	-	-	+
29	-	-	-	-	+
122	-	-	-	-	-
711	-	-	-	+	+
712	-	-	-	-	+

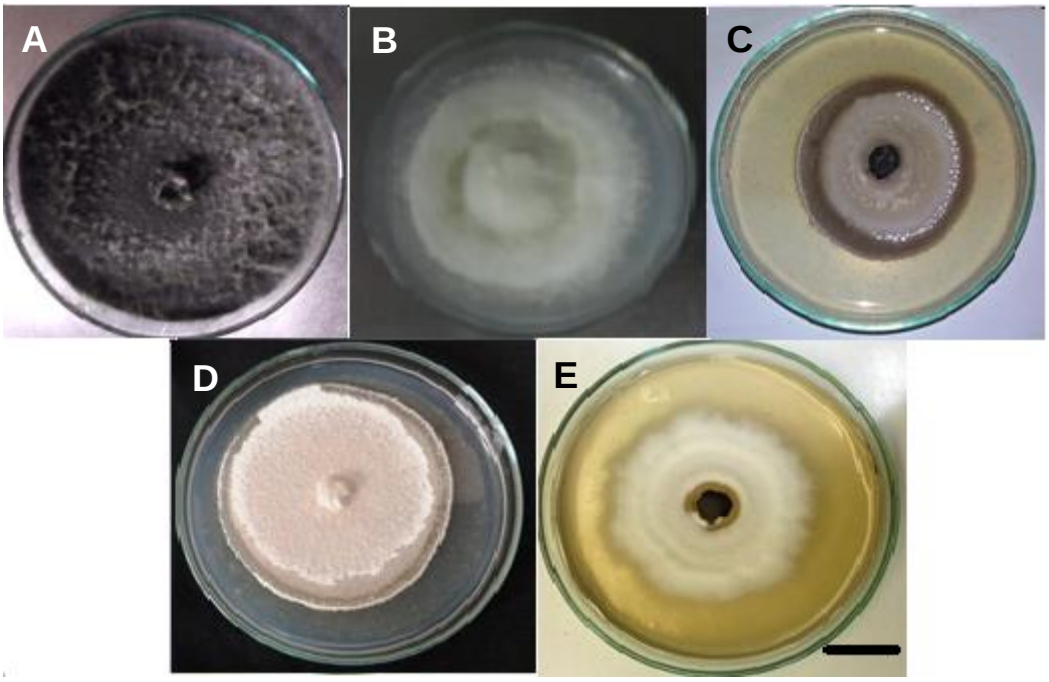

Figura 3.4. Aspecto das colônias de isolados fúngicos de *Bambusa oldhamii* em meio Batata-Dextrose-Ágar (BDA). **A**: 122 (*Botryobambusa fusicoccum*) **B**: 27 (*Arthrinium* sp.); **C**: 711 (*Phoma* sp.), **D**: 712 (*Phoma sp.*), **E**: 29 (*Acrocalymma* sp.). Barra = 20 mm.

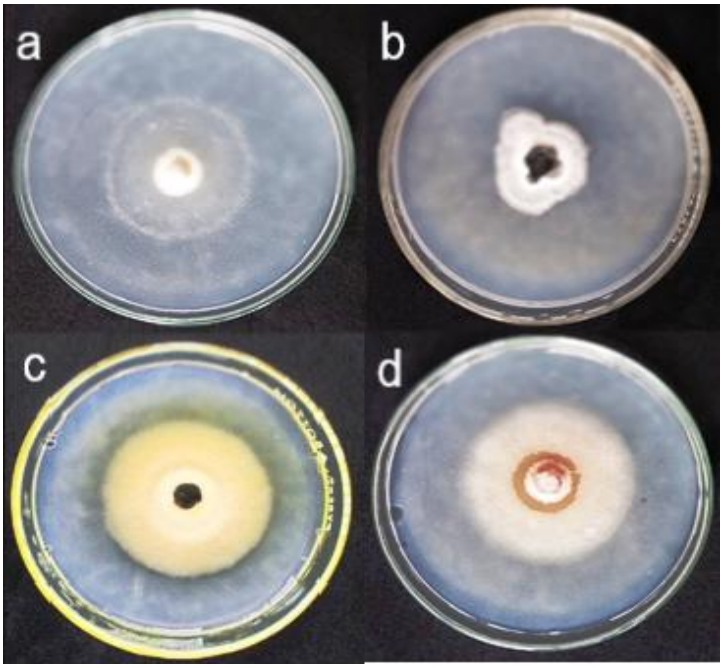

Figura 3.5. Ensaio qualitativo para produção de enzimas de solubilização de fosfato em isolados endofíticos de *Bambusa oldhamii*. Isolados que apresentam halo claro ao redor da colônia no meio de cultura são produtores de enzimas solubilizadoras de fosfato. Colônias com três dias de crescimento. **A**: 13, **B**: 27 (*Arthrinium* sp.), **C**: 29 (*Acrocalymma* sp.), **D**: 122 (*Botryobambusa fusicoccum*), **E**: 711 (*Phoma* sp.) e **F**: 712 (*Phoma sp.*).

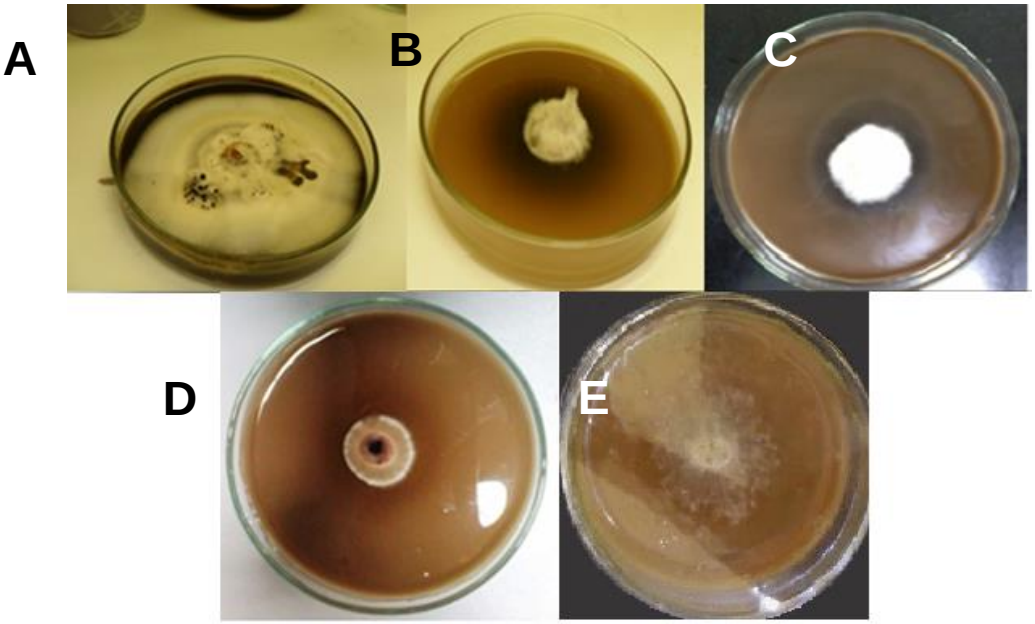

Figura 3.7. Reação de Bomvendam para avaliação qualitativa da produção de polifenol oxidases pela presença de halo âmbar ao redor da colônia no meio de cultura. **A**: 711 (*Phoma* sp.), **B**: 27 (*Arthrinium* sp.); **C**: 29 (*Acrocalymma* sp.), **D**: 712 (*Phoma sp.*), e **E**: 122 (*Botryobambusa fusicoccum*).

3.3.4 Quantificação de AIA

Todos os isolados produziram Ácido indol-acético – AIA, com médias acima de 5,94 mg/mL, observado no primeiro período de incubação avaliado – 48 h. O isolado com maior produção de AIA foi o 29 (*Acrocalymma* sp.), o qual iniciou a produção deste hormônio após 48 h com média de 5,16 mg/mL neste período, com maior produção em 96 h, com médias de 31,55 mg/mL (Figura 3.7).

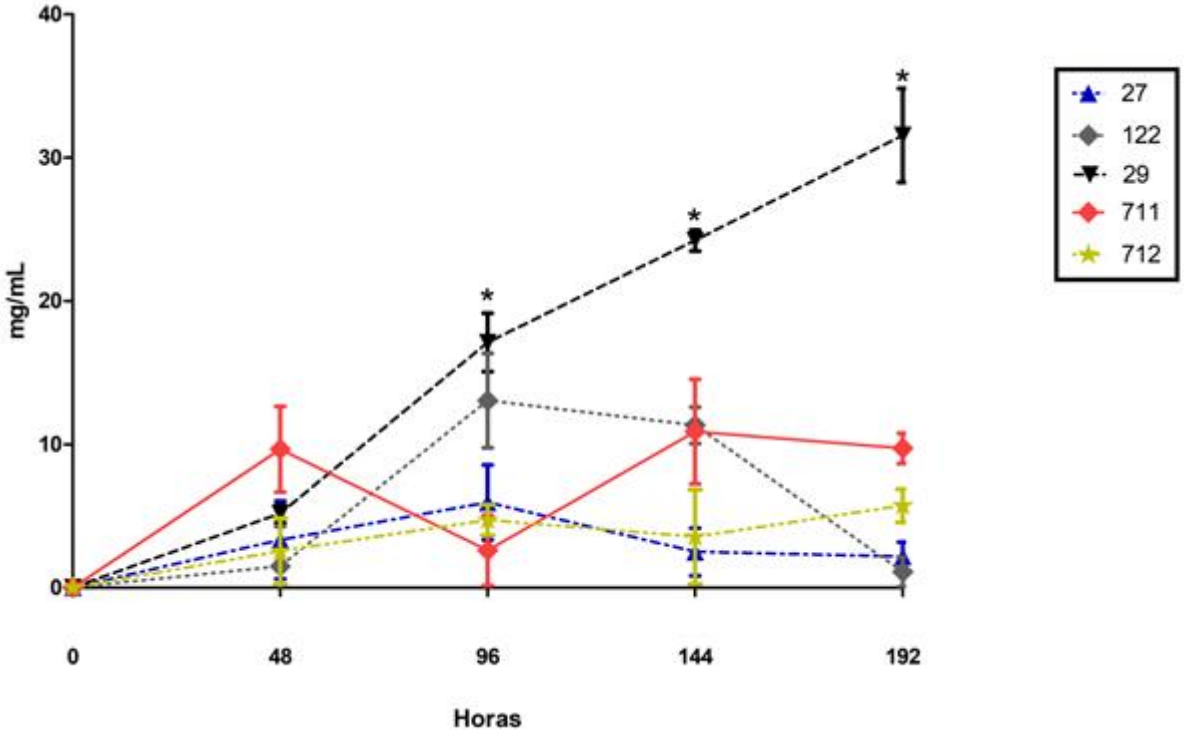

Figura 3.7. Produção de Ácido Indol-acético em sete isolados de *Bambusa oldhamii*. 27 (*Arthrinium* sp.), 29 (*Acrocalymma* sp.), 122 (*Botryobambusa fusicoccum*), 711 (*Phoma* sp.) e 712 (*Phoma sp.*.). Cada ponto foi obtido da média de 3 observações.

3.3.5 Antagonismo entre fungos endofíticos e *M. oryzae*

O crescimento micelial de *M. oryzae* foi reduzido por todos os isolados no antagonismo direto, com destaque para o isolado 122 (*B. fusicoccum*) (Tabela 3.4 e Figura 3.8 e 3.9). Semelhantemente ao antagonismo direto, os componentes voláteis produzidos pelos isolados em estudo reduziram a área da colônia de *M. oryzae* (Figura 3.10), com reduções acima de 80%.

Tabela 3.4. Médias da área da colônia de *Magnaporthe oryzae* resultantes do antagonismo direto e indireto com isolados endofíticos de *Bambusa oldhamii*.

Isolado	Antagonismo direto (cm)	Antagonismo indireto (cm)
122 (*Botryobambusa fusicoccum*)	0,320c	0,513b
711 (*Phoma* sp.)	0,960bc	0,599b
27 (*Arthrinium* sp.)	1,025bc	0,765b
712 (*Phoma sp.*)	1,319bc	1,401b
29 (*Acrocalymma* sp.)	1,542b	1,082b
Controle	8,100a	8,100a

*médias que não compartilham uma letra são significativamente diferentes pelo teste de Tukey com nível de significância de 0,05.

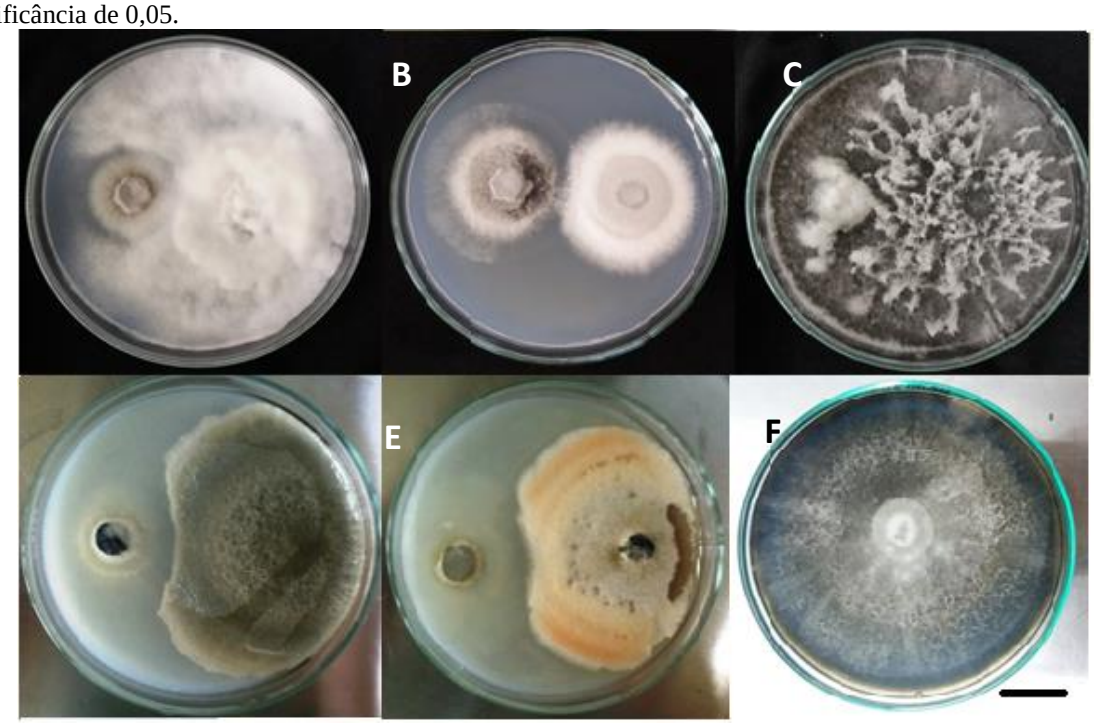

Figura 3.8. Antagonismo direto entre fungos endofíticos de *Bambusa oldhamii* (colônias à direita da placa) e *Magnaporthe oryzae* (colônias à esquerda da placa), com dez dias de crescimento. **A**: 27 (*Arthrinium* sp.); **B**: 29 (*Acrocalymma* sp.); **C**: 122 (*Botryobambusa fusicoccum*),: **D**: 711 (*Phoma* sp.); **E**: 712 (*Phoma* sp.), **F**: Controle sem o antagonista. Barra = 20 mm.

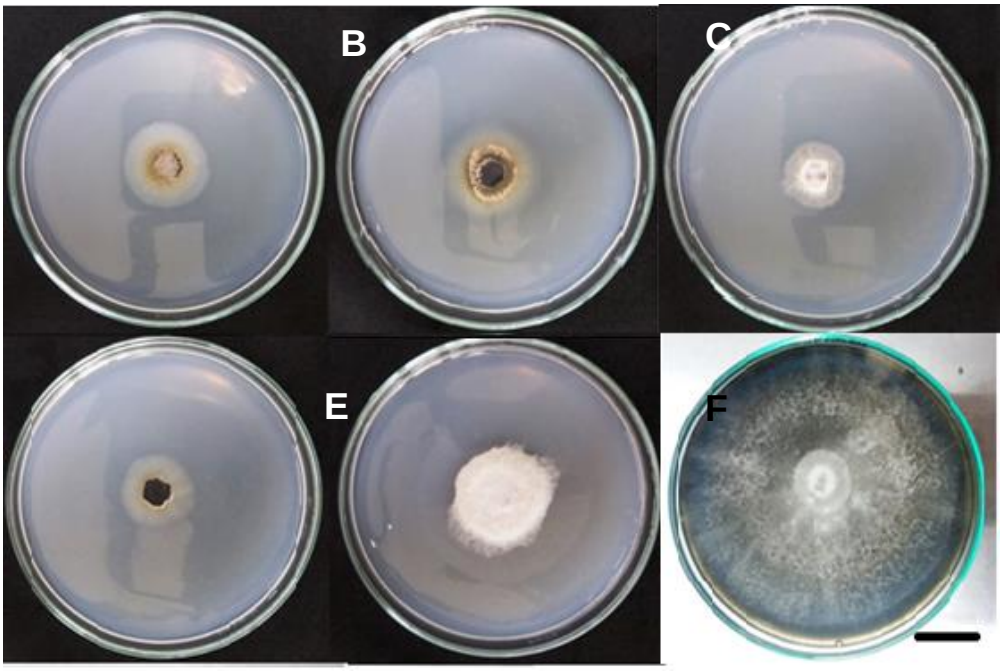

Figura 3.9. Antagonismo indireto entre fungos endofíticos de *Bambusa oldhamii* contra *Magnaporthe oryzae* por meio de produção de compostos voláteis. Placas de *M. oryzae* com crescimento reduzido por: **A**: 27 (*Arthrinium* sp.), **B**: 29 (*Acrocalymma* sp.), **C**: 122 (*Botryobambusa fusicoccum*), **D**: 711 (*Phoma* sp.), **E**: 712 (*Phoma sp.*) **F**: controle com ausência de antagonista. Barra = 20 mm.

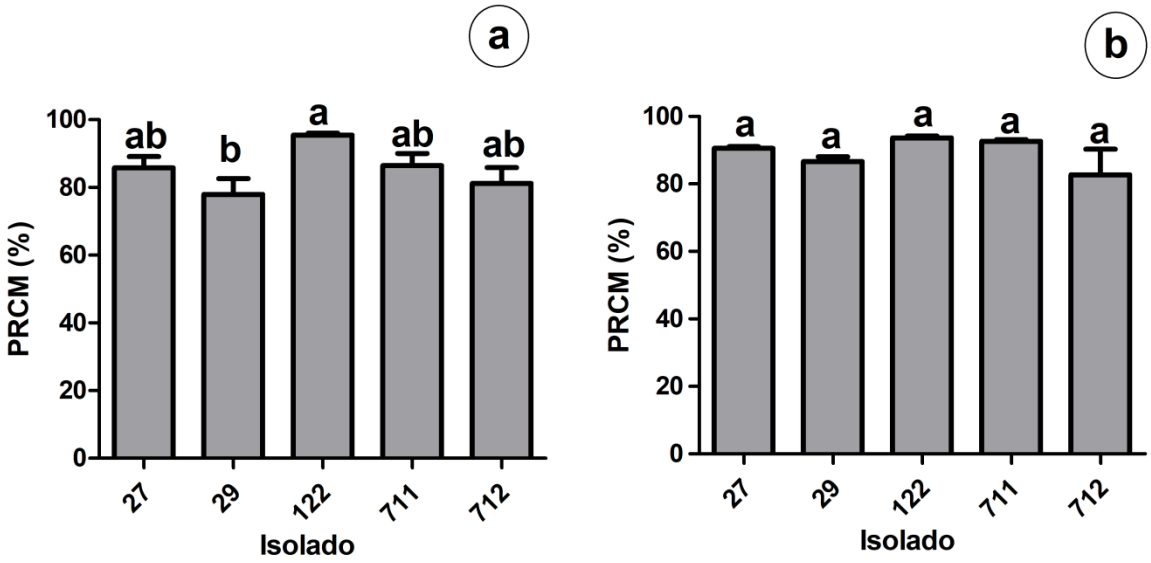

Figura 3.10. Porcentagem de redução do crescimento micelial (PRCM) de colonias *Magnaporthe oryzae* por antagonismo direto (a) e indireto (b) a isolados endofíticos de *Bambusa oldhamii*. 27 (*Arthrinium marii*), 29 (*Acrocalymma* sp.), 122 (*Botryobambusa fusicoccum*), 711 (*Phoma* sp.), e 712 (*Phoma sp.*).

3.3.6 Quantificação enzimática

Todos os isolados produziram quitinases e glucanases. Entretanto, destacaram-se os isolados 29 (*Acrocalymma* sp.) e 122 (*Botryobambusa fusicoccum*). O primeiro com maior produção de quitinases (média 2,59 U/mL) com 120 h de incubação, e o segundo com maior produção de glucanases (média 2,80 U/mL) com 72 h de incubação. O isolado 711 (*Phoma* sp.) produziu quitinases utilizando glicose como substrato, apresentando média de 2,61 U/mL em 48 h, média esta que foi a superior neste tempo entre os isolados. Entretanto, o isolado 711 não diferenciou dos demais quando a quitina estava presente.

O isolado 122 apresentou relevante produção de β-1,3-glucanase quando quitina estava presente, diferenciando-se dos demais com médias de 2,80 U/mL com 72 h de incubação. Por conseguinte, este isolado também produziu esta enzima mesmo na presença de glicose, com médias de 2,86 U/mL com 120 h de incubação (Figuras 3.11 e 3.12).

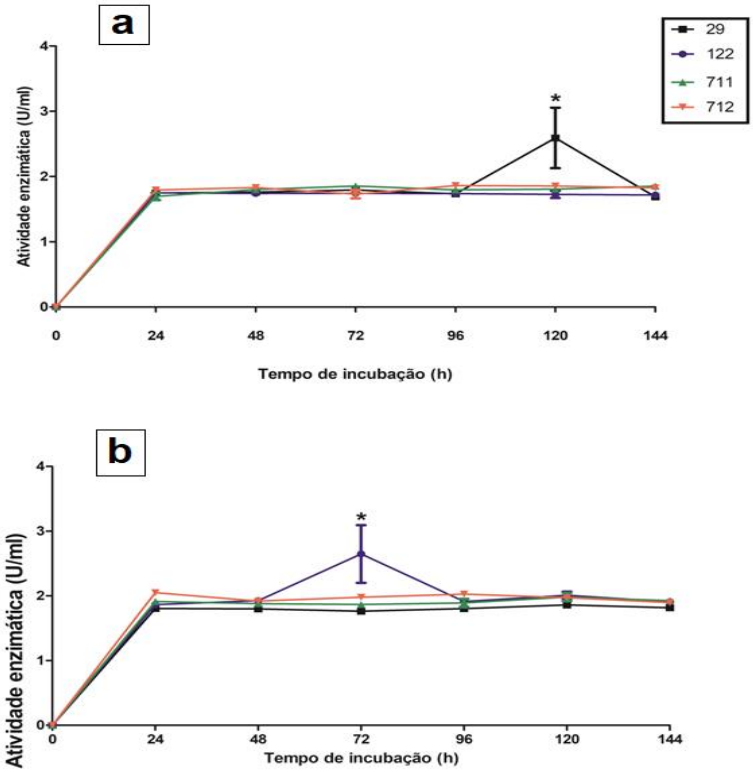

Figura 3.11. Médias e erro padrão da variação no tempo na atividade de quitinases (a) e β-1,3-glucanases (b) de fungos endofíticos de *Bambusa oldhamii* [isolado 29 (*Acrocalymma* sp.), 122 (*Botryobambusa fusicoccum*), 711 (*Phoma* sp.) e 712 (*Phoma sp.*)], utilizando 0,5% de quitina como substrato. Médias com asterisco (*) são significativamente diferentes dentro do período de incubação.

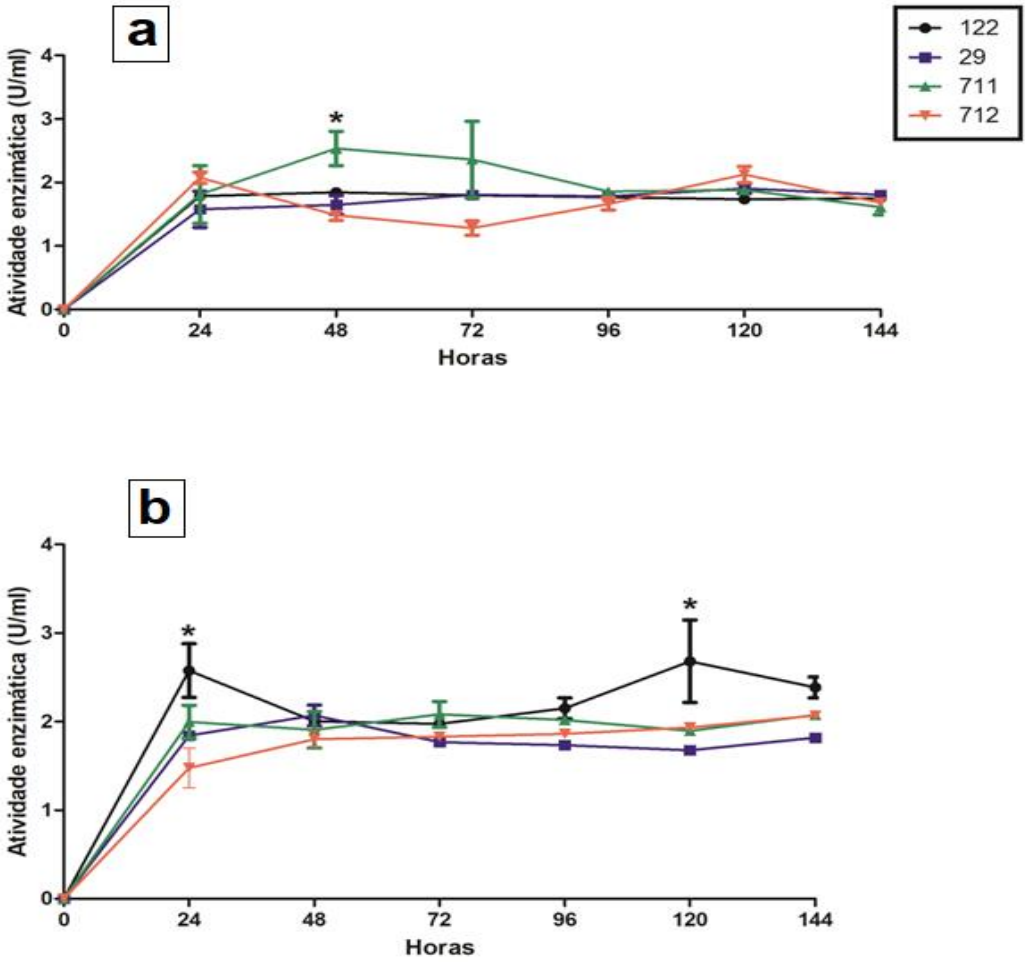

Figura 3.12. Médias e erro padrão da variação no tempo na atividade de quitinases (a) e β-1,3-glucanases (b) de fungos endofíticos de *Bambusa oldhamii* [isolado 29 (*Acrocalymma* sp.), 122 (*Botryobambusa fusicoccum*), 711 (*Phoma* sp.) e 712 (*Phoma sp.*)], utilizando 0,2% de glicose como substrato. Médias com asterisco (*) são significativamente diferentes dentro do período de incubação.

3.3.7 Microbiolização de sementes de arroz

De acordo com o ensaio utilizando métodos de microbiolização, não foram observados sintomas de doença nos tratamentos com ou sem a inoculação dos isolados fúngicos. As plantas de arroz microbiolizadas com o isolado 711 (*Phoma* sp.) apresentaram as maiores médias de comprimento de parte aérea, massa seca da parte aérea, e massa seca de raízes, apresentando aumento de 83,57%, 1500% e 1300% em relação ao controle (Tabela 3.5), resultando em plantas mais vigorosas (Figura 3.13 e 3.14). Este isolado também obteve altas médias de massa fresca (parte aérea e raízes), assim como no conteúdo de água,

entretanto não diferenciou dos isolados 712 e 122. O isolado 29 (*Acrocalymma* sp.), não diferenciou do controle na microbiolização de sementes de arroz em todas as variáveis.

Figura 3.13. Plantas de arroz após 35 dias de semeadura. Esquerda: Controle (sem microbiolização). Direita: Planta oriunda da microbiolização com microbiolização com o isolado 711 (*Phoma* sp.).

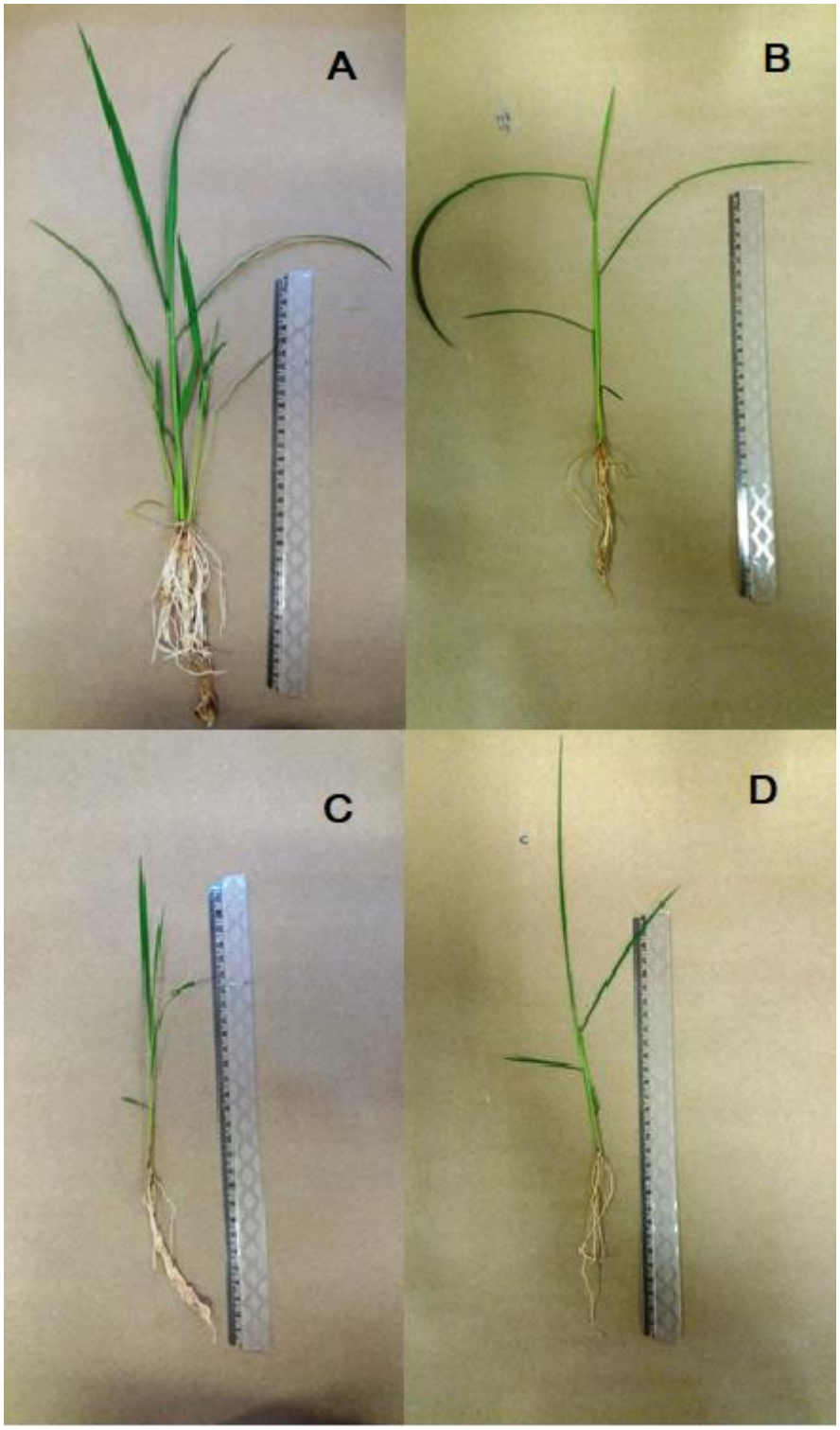

Figura 3.14. Tamanho de plantas de arroz após 35 dias de semeadura, realizada com sementes microbiolizadas com isolados endofíticos de *Bambusa oldhamii*. **A**: 711 (*Phoma* sp.) apresentando maior número de raízes fasciculadas e perfilhos. **B**: 712 (*Epicoccum* sp.). **C**: Isolado 122 (*Botryobambusa fusicoccum*), e **D**: Controle. Régua = 30 cm.

Tabela 3.5. Parâmetros avaliados em plantas de arroz oriundas de sementes microbiolizadas com isolados fúngicos endofíticos 711 (*Phoma* sp.), 712 (*Phoma sp.*), 122 (*Botryobambusa fusicoccum*), 27 (*Arthrinium marii*) e 29 (*Acrocalymma* sp.).

Isolado	**Comprimento da parte aérea (cm)**	**Comprimento de raízes (cm)**	**Massa fresca da parte aérea (g)**	**Massa fresca de raízes (g)**	**Massa seca da parte aérea (g)**	**Massa seca de raízes (g)**	**Conteúdo de água da parte aérea (g)**	**Conteúdo de água de raízes (g)**
711	39,80a	15,77a	1,39a	2,07a	0,32a	0,28a	1,07a	1,78a
712	31,96b	15,19a	0,86a	1,89a	0,21b	0,21b	0,63a	1,70a
122	28,71bc	14,45a	0,56a	1,20b	0,13bc	0,13b	0,42a	1,08a
27	26,35bc	14,41a	0,31b	0,51c	0,07cd	0,05c	0,39b	0,46b
29	23,03c	15,56a	0,23b	0,35c	0,05d	0,04c	0,17b	0,30b
Controle	21,68c	14,56a	0,07b	0,43c	0,02d	0,02c	0,09b	0,37b

*médias que não compartilham uma letra na vertical são significativamente diferentes pelo teste de Tukey com nível de significância de 0,05

3.4 DISCUSSÃO

A identificação dos gêneros dos endófitos de *B. oldhamii* foi bem sucedida. O isolado 27 (*Arthrinium marii*),é pertencente a um gênero que cujas espécies incluem saprófitas, e possui forma sexual denominada Apiospora. É relatado como patógeno em bambus (Martinez-Cano et al., 1992), endófito (Ramos et al., 2010), e líquen (He & Zhang, 2012). O isolado 29 foi alocado como pertencente ao gênero *Acrocalymma*, o qual inclui espécies saprófitas e fitopatogênicas, por exemplo *A. medicaginis* (Alcorn & Irwin, 1987). O isolado 122 foi alocado como pertencente ao gênero *Botryobambusa*, o qual possui única espécie associada, *B. fusiococcum*, o qual é comumente associado à espécies de bambu, principalmente do gênero *Bambusa* (Liu et al., 2012). Os isolados 711 e 712 foram alocados no gênero *Phoma*, gênero diverso, o qual inclui fitopatógenos, saprófitas de solos, meio aquático e aéreo, marinho entomopatogênica e como patógenos humanos oportunistas (Rai et al., 2009).

A taxa de crescimento micelial e conideogênese dos isolados endofíticos foi influenciada pelos diferentes meios de cultura avaliados. A composição de nutrientes de um determinado meio de cultura é um fator importante que influencia nos resultados de taxa de crescimento, pois, um meio nutritivo ótimo deve proporcionar um crescimento bom ou adequado aos microrganismos, sendo um requisito mínimo para permitir que os fungos cresçam sem restrições e expressem fenótipos (Meletiadis et al., 2001). Sharma & Pandey (2010) em estudo utilizando distintos isolados fúngicos em diferentes meios de cultura, afirmaram que o melhor meio de cultura para conideogênse dos gêneros *Chaetomium*, *Fusarium*, e *Penicillium* foi o meio LCA (Glicose 1 g; KH_2PO_4 1 g; $MgSO_4.7H_2O$ 0,2 g; KCl 0,2 g; $NaNO_3$ 2 g ; Extrato de levedura 0,2 g; Agar 13 g; H_2O destilada 1 L) (Miura & Kudo, 1970), o qual é considerado um meio de cultura quantidades de nitrogênio e carboidratos reduzida, o que pode ter provocado conideogênese.

A posição filogenética dos isolados 711 e 712 (*Phoma* sp.) ainda pode ser investigada no futuro. De fato, a circunscrição taxonômica do gênero *Phoma* têm se mostrado complexa (Chen et al., 2015; Valenzuela-Lopez et al., 2018). *Phoma* é definido como um conceito genérico, pois ele é subdividido em nove seções sendo reconhecidas com base em caracteres morfológicos. Destas seções, estas podem ser

alocadas em quatro diferentes famílias, sendo que as cepas geneticamente proximas a *P. herbarum* pertencem à família *Didymellaceae*, a qual inclui o gênero *Epicoccum* (Jayasiri, 2017). Por este motivo, *Phoma* constitui um grupo polifilético (De Gruyter et al., 2009). Apesar do esforço de pesquisadores em caracterizar o grupo (Chen et al., 2015), ainda existem lacunas sobre a sua sistemática, tanto em relação a caracteres morfológicos quanto moleculares, pois muitas espécies ainda permanecem em clados inespecíficos (Aveskamp et al., 2008), o que faz do grupo um enigma. Assim, o sequenciamento de regiões genômicas adicionais, assim como isolados semelhantes ao 711 serão necessários para um estudo futuro sobre suas relações filogenéticas, bem como os limites das espécies.

No ensaio de caracterização bioquímica, não foi observada produção de enzimas pécticas *in vitro* por nenhum dos isolados endofíticos avaliados. De maneira geral, fitopatógenos produtores de pectinases são característicos de causadores de "podridões moles", em que a ação da enzima degrada a sustentação dos componentes celulares (Amorim et al., 2011). Entretanto, a comprovação do envolvimento de produção de pectinases *in vitro* muitas vezes não está ligada à fitopatogenicidade. Exemplo disto é a produção de pectinases por fungos micorrízicos na raiz, o que está ligado ao estabelecimento da relação simbiótica para a nutrição do microrganismo (Garcia Romera et al., 1991). Para preencher os requisitos de patogênese, um isolado deve ser capaz de produzir sintomas de doença visíveis na planta (Herron et al., 2000), o que não ocorreu com as plantas de arroz observadas neste trabalho, as quais não exibiram sintomas visíveis.

Observou-se neste trabalho que o isolado 711 (*Phoma* sp.) foi capaz de solubilizar fosfato *in vitro*. No geral, fungos solubilizadores de fosfato incluem principalmente *Aspergillus*, *Penicillium* (Elias et al., 1999), *Thrichoderma* (Chagas et al., 2015; França et al., 2017) e fungos micorrízicos (Richardson, 2001). Apesar de *Phoma* ser um grupo que inclui espécies fitopatogênicas (Vishniac, 1996), muitas outras são relatadas como promotoras do crescimento em plantas (Chandanie et al., 2005; Naznin et al., 2013), e também como indutoras de resistência (Hossain et al., 2008). *P. herbarum*, apesar de ser relatado como patógeno animal, este é produtor de giberelinas (GA_4 e GA_7), e é capaz de aumentar a biomassa em soja e arroz (Hamayum et al., 2009).

Todos os isolados foram capazes de produzir AIA *in vitro*, com destaque para o isolado 29 (*Acrocalymma* sp.) (Figura 3.8). O diferencial de microrganismos que

possuem a habilidade de sintetizar AIA está relacionado tanto à promoção de crescimento, quanto também em regular os níveis desta auxina no interior do vegetal (Duca et al., 2014). Ashrafuzzaman et al., (2009) ao verificar a produção de AIA e solubilização de fosfato *in vitro* por bactérias, afirmou que o aumento da biomassa do arroz foi devido à inoculação por estas cepas, o que provocou aumento de 30,55% na massa seca das mudas.

Foi observada produção de Polifenol oxidases (PPO) pelos isolados 27 (*Arthrinium marii*), 29 (*Acrocalymma* sp.), 711 (*Phoma* sp.) e 712 (*Phoma sp.*). PPOs são enzimas ligadas à inibição da atividade patogênica, assim como na ativação de mecanismos de resistência da planta (Agrios, 2005). Infere-se que os isolados descritos possuam potencial para tanto, porém, novos ensaios em casa de vegetação serão necessários para a comprovação desta relação.

A área da colônia de *M. oryzae* foi reduzida em mais de 80% por todos os isolados endofíticos em estudo. Microrganismos biofertilizantes também podem possuir características antagônicas contra patógenos (Naznin et al., 2014), o que pode ser promovido pela secreção de substâncias antimicrobianas, como, além das PPOs, quitinases, glucanases, fungicidas, ou ainda antibióticos, (Brzezinska & Jankiewicz, 2012). Outros estudos já relataram a atividade antagônica de microrganismos endofíticos de bambu, como no estudo de antagonismo *in vitro* de *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp., *Penicillium* sp., e *Didymella* sp., os quais foram isolados do gênero *Phyllostachys*, e apresentaram antibiose contra *Pleospora herbarum e Botryotinia fuckeliana*, ambos patógenos de bambu. Além destes, os isolados também apresentaram antibiose contra patógenos de humanos tais como *Candida albicans* e *Staphylococcus aureos* (Shen et al., 2012).

Não foi observado halo de inibição entre o antagonismo direto entre *M. oryzae* e o isolado 27 (*Arthrinium marii*), assim como nos isolados 29 (*Acrocalymma* sp.) e 122 (*B. fusicoccum*) (Figura 3.9). Entretanto, espécies do gênero *Arthrinium* já foram relatadas com atividade antibacteriana (Calvo et al., 1999; Miao et al., 2006), antifúngica (Bloor, 2008; Ramos et al., 2010), e antiviral (Iumura et al., 1993; Oka et al., 1993; Wang et al., 2015). Por este motivo, sugere-se que o isolado 27 caracterizado neste trabalho possa ser objeto de estudo no futuro com outras espécies vegetais, assim como na interação com outros patógenos.

O cultivo do isolado 29 (*Acrocalymma* sp.) em meio suplementado com quitina resultou em produção de quitinases de 44,69% a mais que a média dos demais

isolados em 120 h de incubação. Além disto, este isolado apresentou produção de PPO, o que o torna um bom candidato a futuros estudos com indução de resistência. O isolado 711 (*Phoma* sp.) produziu quitinases mesmo na presença de glicose, com 53,93% a mais que a média dos demais isolados em 48 h. Este isolado produziu 41% menos quitinases quando foi cultivado em meio suplementado com quitina, não se diferenciando dos demais quando cultivado neste substrato.

A escolha da fonte de carbono para a produção de enzimas como a β-1,3-glucanases é importante pelo fato da produção desta enzima ser influenciada pelos componentes do meio de cultivo. No geral, o excesso de glicose ou outra fonte de carbono facilmente acessível pode reprimir a produção de glucanases, como ocorre, por exemplo, em *Penicillium italicum* (Bielecki & Galas, 1991; Santos et al., 1978). Entretanto, o isolado 122 (*Botryobambusa fusicoccum*) foi capaz de secretar β-1,3-glucanase na presença de quitina e glicose, liberando moléculas deste carboidrato em quantidades além das presentes no meio de cultivo. Outros microrganismos já foram relatados como produtores de glucanases na presença de glicose como fonte de carbono no meio de cultura, tais como *Trichoderma viride, Saccharomyces cerevisiae* (Del Rey et al., 1979) e *Candida albicans (Molina et al., 1989)* os quais não sofreram repressão catabólica de β-1,3 e β-1,6-glucanases durante a fase de crescimento. Assim, baseando-se nestes estudos preliminares, sugere-se que o isolado 122 (*B. fusicoccum)* possa ser considerado o melhor isolado na produção de β-1,3-glucanases.

Quitinases e glucanases são enzimas envolvidas no processo de degradação da parede celular de patógenos, o que pode reduzir a severidade de doenças em estudos subsequentes. Assim, novos estudos em casa de vegetação devem ser realizados para a investigação deste potencial.

O isolado que mais contribuiu para o aumento de biomassa em sementes microbiolizadas de arroz foi o 711 (*Phoma* sp.), com maior aumento de biomassa em relação ao controle. Entretanto, não se observou diferença em relação ao comprimento das raízes entre todos os isolados. Isto se deve ao aumento visual de raízes fasciculadas principalmente quando o isolado 711 estava presente, aumento este que correspondeu a 1300% de massa seca de raízes em relação ao controle, o que corrobora o resultado de que este isolado seja o mais promissor para a biofertilização em arroz. Em estudo com *Arabdopsis thaliana,* observou-se que o aumento de raízes fasciculadas é resultado da aplicação de quantidades moderadas de fosfato, quantidades estas que também devem ser balanceadas com auxinas, pois o aumento de fosfato inibe a ação destas últimas

(Lopez-Bucio, 2002; Williamson, 2001). Pelo fato do isolado 711 produzir AIA e solubilizar fosfato de cálcio, provavelmente ocorreu balanceamento destes nutrientes na planta, o que possivelmente explica os resultados positivos.

Não se observou diferença entre os isolados 29 (*Acrocalymma* sp.), 27 (*Arthrinium marii*) e o controle em relação ao comprimento da parte aérea e raízes, massa seca e massa fresca, assim como no conteúdo de água. Em se tratando de interações endófito-hospedeiro, muitas vezes a inoculação não apresenta mudança na taxa de crescimento, acúmulo de biomassa, ou outras características facilmente quantificáveis. Assim, em alguns casos torna-se necessário que a planta seja submetida a fatores estressantes, bióticos ou abióticos, para que se observe a importância dos endófitos no aumento da biomassa ou na produção de enzimas ligadas ao antagonismo contra patógenos (Arnold, 2007). Com isso, sugerem-se novos estudos com outros métodos de inoculação, e outras variedades de arroz, assim como estudos referentes à indução de resistência à *M. oryzae* utilizando estes isolados como indutores.

3.5 CONCLUSÕES

O isolado 711 (*Phoma* sp.), isolado endofítico de *B. oldhamii*, apresentou características básicas como bioestimulante em arroz, o que corrobora para o início de estudo com promoção de crescimento indução de resistência contra *M. oryzae*. Este potencial pôde ser verificado pelos resultados positivos nos ensaios bioquímicos e aumento de biomassa nas plantas oriundas de sementes microbiolizadas com este isolado, além da produção de enzimas hidrolíticas que influenciam o processo de antagonismo.

O isolado 29 (*Acrocalymma* sp.) apresentou maiores produções de AIA, entretanto não se observou diferenças significativas entre este isolado e o controle na produção de biomassa do ensaio de microbiolização *in vitro*, o que requer investigações adicionais em novos ensaios.

Outros isolados também puderam ser apontados como promissores no processo de antagonismo, tais como 122 (*Botryobambusa fusicoccum*) e 712 (*Phoma sp.*). Entretanto, novos estudos *in vivo* serão necessários para a confirmação deste potencial.

4. CONCLUSÕES GERAIS

Foi possível estabelecimento de um protocolo de brotação e multiplicação de brotos de *Bambusa oldhamii* em sistema fotomixotrófico, observando-se a temperatura como a variável ambiental que mais influencia o período de coleta no campo e o processo de fotomorfogênese *in vitro*. Também isolou-se e caracterizou-se isolados endofíticos desta espécie, elegendo um isolado no qual foi possível obter bons resultados para a biofertilização em arroz.

Os resultados referentes à brotação e multiplicação *in vitro* de *B. oldhamii* poderão ser utilizados no futuro para aprimoramento de protocolos relativos ao enraizamento *in vitro* da espécie, e, os resultados relativos ao isolados endofíticos poderão ser utilizados no futuro para novos estudos com promoção de crescimento e indução de resistência em arroz, assim como a aclimatização de demais espécies micropropagadas.

5. REFERÊNCIAS

ABDUL KHALIL, H. P. S. et al. Bamboo fibre reinforced biocomposites: A review. **Materials and Design**, v. 42, p. 353–368, 2012.

ADESEMOYE, A. O.; KLOEPPER, J. W. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 1, p. 1–12, 2009.

AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 5. ed. Burlington: Elsevier, 2005.

ALBANY, N. et al. Use of growth retardants for banana (Musa AAA cv. Grand Naine) shoot multiplication in temporary immersion systems. In: ALBANY, N. et al. (Eds.). . **Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation**. Netherlands: Springer, 2005. p. 213–224.

ALCORN, J. L.; IRWIN, J. A. G. Acrocalymma medicaginis gen. et sp.nov. causing root and crown rot of Medicago sativa in Australia. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 88, n. 2, p. 163–167, 1987.

ALMEIDA, F. B. D. R. et al. Mycoparasitism studies of Trichoderma harzianum strains against Rhizoctonia solani: Evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 8, p. 1189–1193, 2007.

AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; FILHO, A. B. **Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos**. 4. ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011.

ARNOLD, A. E. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. **Fungal Biology Reviews**, v. 21, n. 2–3, p. 51–66, 2007.

ASHRAFUZZAMAN, M. et al. Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. **Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 7, p. 1247–1252, 2009.

AVESKAMP, M. M.; DE GRUYTER, J.; CROUS, P. W. Biology and recent developments in the systematics of Phoma, a complex genus of major quarantine

significance. **Fungal Diversity**, v. 31, n. 1, p. 1–18, 2008.
BAR-YOSEF, O. et al. Were bamboo tools made in prehistoric Southeast Asia? An experimental view from South China. **Quaternary International**, v. 269, p. 9–21, 2012.
BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. **Illustrated Genera of Imperfect Fungi**. 4. ed. St. Paul: APS Press, 1998.
BARRIGOSSI, J. A. F.; LANNA, A. C.; FERREIRA, E. **Agrotóxicos no Cultivo do Arroz no Brasil: análise do consumo e medidas para reduzir o impacto ambiental negativo**. 1. ed. Goiânia: Embrapa Arroz e Feijão, 2004.
BELLO-BELLO, J. J. et al. Effect of LED light quality on in vitro shoot proliferation and growth of vanilla (Vanilla planifolia Andrews). **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 8, p. 272–277, 2016.
BIELECKI, S.; GALAS, E. Microbial beta-glucanases different from cellulases. **Critical reviews in biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 275–304, 1991.
BLOOR, S. Arthrinic acid, a novel antifungal polyhydroxyacid from Arthrinium phaeospermum. **Journal of Antibiotics**, v. 61, n. 8, p. 515–517, 2008.
BOARD, N. **The complete technology book on biofertilizers and organic farming**. 1. ed. Kamla Nagar: National Institute of Industrial Research Press, 2004.
BORASTE, A. et al. Biofertilizers: A novel tool for agriculture. **International Journal of Microbiology Research**, v. 1, n. 2, p. 975–5276, 2009.
BOYER, J. S. Plant Productivity and Environment. **Science**, v. 218, n. 4571, p. 443–448, 1982.
BRASIL. **Dados da Rede do INMET**. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/>. Acesso em: 1 set. 2017.
BRENNER, W. G. et al. Immediate-early and delayed cytokinin response genes of Arabidopsis thaliana identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. **Plant Journal**, v. 44, n. 2, p. 314–333, 2005.
BRZEZINSKA, M. S.; JANKIEWICZ, U. Production of antifungal chitinase by Aspergillus niger LOCK 62 and its potential role in the biological control. **Current Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 666–672, 2012.
BUETOW, D. E. et al. Regulation and expression of the multigene family coding light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins of photosystem II. **Photosynthesis Research**, v. 18, n. 1–2, p. 61–97, 1988.

CALVO, M. A. et al. Effect of ultraviolet light irradiation and nitrosoguanidine on viability of 46 strains of Arthrinium and their antibiotic production. **Microbios**, v. 98, n. 391, 1999.

CARBONE, I.; KOHN, L. M. A Method for Designing Primer Sets for Speciation Studies in Filamentous Ascomycetes. **Mycologia**, v. 91, n. 3, p. 553, 1999.

CATTELAN, A. J. **Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal**. 1. ed. Londrina: Embrapa soja, 1999.

CHAGAS, L. F. B. et al. Evaluation of the phosphate solubilization potential of Trichoderma strains (Trichoplus JCO) and effects on rice biomass. **J. Soil Sci. Plant Nutr.**, v. 15, n. 3, p. 794–804, 2015.

CHANDANIE, W. A.; KUBOTA, M.; HYAKUMACHI, M. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungus Glomus mosseae and plant growth promoting fungus Phoma sp.on their root colonization and growth promotion of cucumber (Cucumis sativus L.). **Mycoscience**, v. 46, n. 3, p. 201–204, 2005.

CHEN, Q. et al. Resolving the Phoma enigma. **Studies in Mycology**, v. 82, p. 137–217, 2015.

CHEN, S. Y. et al. Transferability of rice SSR markers to bamboo. **Euphytica**, v. 175, n. 1, p. 23–33, 2010.

CONCEIÇÃO, D. M. et al. Fungos filamentosos isolados do Rio Atibaia, SP e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. **Arq. Inst. Biol.**, v. 72, p. 99–106, 2005.

COPE, K. R.; SNOWDEN, M. C.; BUGBEE, B. Photobiological interactions of blue light and photosynthetic photon flux: Effects of monochromatic and broad-spectrum light sources. **Photochemistry and Photobiology**, v. 90, n. 3, 2014.

CUNNINGHAM, J. E.; KUIACK, C. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by Penicillium bilaii. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 5, p. 1451–1458, 1992.

DA LUZ, W. C. Microbiological control of bipolaris sorokiniana in vitro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 15, p. 246–247, 1990.

DAI, D. Q. et al. Bambusicolous fungi. **Fungal Diversity**, v. 82, n. 1, 2017.

DARKO, E. et al. Photosynthesis under artificial light: the shift in primary and secondary metabolism. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 369, n. 1640, 2014.

DAS, M.; PAL, A. In vitro regeneration of Bambusa balcooa Roxb.: Factors affecting changes of morphogenetic competence in the axillary buds. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 81, n. 1, p. 109–112, 2005.

DE GRUYTER, J. et al. Molecular phylogeny of Phoma and allied anamorph genera: Towards a reclassification of the Phoma complex. **Mycological Research**, v. 113, n. 4, p. 508–519, 2009.

DEL REY, F.; GARCIA-ACHA, I.; NOMBELA, C. The regulation of β-glucanase synthesis in fungi and yeast. **Microbiology,** v. 110, n. 1, p. 83–89, 1979.

DELLAPORTA, S. L.; WOOD, J.; HICKS, J. B. A plant DNA minipreparation: Version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 1, n. 4, p. 19–21, 1983.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: III. Hyphal interaction. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57, n. 3, p. 363–369, 1971.

DU JARDIN, P. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 3–14, 2015.

DUCA, D. et al. Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 1, p. 85–125, 2014.

ELIAS, F.; WOYESSA, D.; MULETA, D. Phosphate Solubilization Potential of Rhizosphere Fungi Isolated from Plants in Jimma Zone, Southwest Ethiopia. **International Journal of Microbiology**, v. 2016, 2016.

FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Fungos endofíticos : potencial como controladores biológicos e estudos em videiras. **Uningá review**, v. 14, n. 1, p. 13–25, 2013.

FLANDER, K. D.; ROVERS, R. One laminated bamboo-frame house per hectare per year. **Construction and Building Materials**, v. 23, n. 1, p. 210–218, 2009.

FOLTA, K. M.; CHILDERS, K. S. Light as a growth regulator: Controlling plant biology with narrow-bandwidth solid-state lighting systems. **HortScience**, v. 43, n. 7, p. 1957–1964, 2008.

FRANÇA, D. V. C. et al. Trichoderma spp. isolates with potential of phosphate solubilization and growth promotion in cherry tomato. **Pesq. Agropec. Trop**, v. 47, n. 4, p. 360–368, 2017.

GALVÃO, V. C.; FANKHAUSER, C. Sensing the light environment in plants: Photoreceptors and early signaling steps. **Current Opinion in Neurobiology**, 2015.

GARCIA ROMERA, I.; GARCIA GARRIDO, J. M.; OCAMPO, J. A. Pectolytic enzymes in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus Glomus mosseae. **FEMS**

Microbiology Letters, v. 78, n. 2–3, p. 343–346, 1991.
GHASEMZADEH, A. et al. Effect of different light intensities on total phenolics and flavonoids synthesis and anti-oxidant activities in young ginger varieties (Zingiber officinale Roscoe). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 10, p. 3885–3897, 2010.
GIELIS, J. et al. Tissue culture strategies for genetic improvement of bamboo. **Acta Horticulturae**, v. 552, p. 195–203, 2001.
GUI, Y. J. et al. Insights into the bamboo genome: Syntenic relationships to rice and sorghum. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 52, n. 11, p. 1008–1015, 2010.
HAHN, E.; KOZAI, T.; PAEK, K. Blue and red Light-Emitting Diodes with or without sucrose and ventilation affect in vitro growth of Rehmannia glutinosa plantlets. **Journal of Plant Biology**, v. 43, n. 4, p. 247–250, 2000.
HAMAYUN, M. et al. Phoma herbarum as a new gibberellin-producing and plant growth-promoting fungus. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 10, p. 1244–1249, 2009.
HE, Y.; ZHANG, Z. Diversity of organism in the Usnea longissima lichen. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 22, p. 4797–4804, 2012.
HERRON, S. R. et al. Structure and function of pectic enzymes: virulence factors of plant pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 16, p. 8762–8769, 2000.
HOSSAIN, M. M. et al. Systemic resistance to bacterial leaf speck pathogen in Arabidopsis thaliana induced by the culture filtrate of a plant growth-promoting fungus (PGPF) Phoma sp. GS8-1. **Journal of General Plant Pathology**, v. 74, n. 3, p. 213–221, 2008.
IIMURA, S. et al. Terpestacin, a novel syncytium formation inhibitor, isolated from Arthrinium species. **Tetrahedron Letters**, v. 34, n. 3, p. 493–496, 1993.
JAYASIRI, S. Taxonomy and multigene phylogenetic evaluation of novel species in Boeremia and Epicoccum with new records of Ascochyta and Didymella (Didymellaceae). **Mycosphere**, v. 8, n. 8, p. 1080–1101, 2017.
JOHKAN, M. et al. Blue light-emitting diode light irradiation of seedlings improves seedling quality and growth after transplanting in red leaf lettuce. **HortScience**, v. 45, n. 12, p. 1809–1814, 2010.
KHALIL, I. A.; RAHMAN, H. UR. Effect of paclobutrazol on growth, chloroplast pigments and sterol biosynthesis of maize (Zea mays L.). **Plant Science**, v. 105, n. 1, p.

15–21, 1995.
KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A. **Photoautotrophic (Sugar-Free medium) micropropagation an trasplant production system**. 1. ed. Netherlands: Springer, 2005.
KOZAI, T.; KUBOTA, C. Concepts, definitions, ventilation methods, advantages and disavantages. In: KOZAI, T.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S. M. A. (Eds.). . **Photoautotrophic (Sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system**. [s.l.] Springer, 2005. p. 19–23.
KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.
KUTTIRAJA, M. et al. Bioethanol production from bamboo (Dendrocalamus sp.) process waste. **Biomass and Bioenergy**, v. 59, p. 142–150, 2013.
LEE, M. J.; SON, K. H.; OH, M. M. Increase in biomass and bioactive compounds in lettuce under various ratios of red to far-red LED light supplemented with blue LED light. **Horticulture Environment and Biotechnology**, v. 57, n. 2, p. 139–147, 2016.
LIN, C. S. et al. Improving multiple shoot proliferation in bamboo mosaic virus-free Bambusa oldhamii Munro propagation by liquid culture. **HortScience**, v. 42, n. 5, p. 1243–1246, 2007.
LIN, Y. et al. Effects of light quality on growth and development of protocorm-like bodies of Dendrobium officinale in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 105, n. 3, p. 329–335, 2011a.
LIN, Y. et al. Effects of light quality on growth and development of protocorm-like bodies of Dendrobium officinale in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 105, n. 3, p. 329–335, 2011b.
LIU, J. K. et al. Towards a natural classification of Botryosphaeriales. **Fungal Diversity**, v. 57, n. 1, p. 149–210, 2012.
LIU, K. C. et al. Growth and shoot emergence of green bamboo (Bambusa oldhamii Munro) under different temperatures. **Acta Horticulturae**, v. 769, p. 83–90, 2008.
LIU, Y.; LIU, Z.; WONGKAEW, S. Developing characteristics and relationships of Shiraia bambusicola with bamboo. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 34, n. 1, p. 17–22, 2012.
LOPEZ-BUCIO, J. Phosphate Availability Alters Architecture and Causes Changes in Hormone Sensitivity in the Arabidopsis Root System. **Plant Physiology**, v. 129, n. 1, p.

244–256, 2002.
LOPEZ-BUCIO, J.; CRUZ-RAMIREZ, A.; HERRERA-ESTRELLA, L. The role of nutrient availability in regulating root architecture. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 3, p. 280–287, 2003.
LORENZO, J. C. et al. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 54, n. 3, p. 197–200, 1998.
LU, Y. et al. Impacts of soil and water pollution on food safety and health risks in China. **Environment International**, v. 77, p. 5–15, 2015.
MANTER, D. K.; VIVANCO, J. M. Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 71, n. 1, p. 7–14, 2007.
MAOYI, F. et al. **Technical Manual on sympodial bamboos cultivation**. Beijing: China Forestry Publishing House, 2007.
MARTÍNEZ-CANO, C.; GREY, W. . .; SANDS, D. C. First report of Arthrinium arundinis causing kernel blight on barley. **Plant Disease**, v. 76, p. 1077, 1992.
MASSA, G. D. et al. Plant productivity in response to LED lighting. **HortScience**, v. 43, n. 7, p. 1951–1956, 2008.
MEENA, V. S. et al. **Potassium solubilizing microorganisms for sustainable agriculture**. 1. ed. Varanasi: Springer, 2016.
MELETIADIS, J.; MEIS, J. F. G. M.; MOUTON, J. W. Analysis of Growth Characteristics of Filamentous Fungi in Different Nutrient Media. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 478–484, 2001.
MENGXI, L. et al. Effects of different spectral lights on Oncidium PLBs induction, proliferation, and plant regeneration. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 106, n. 1, p. 1–10, 2011.
MIAO, L.; KWONG, T. F. N.; QIAN, P. Y. Effect of culture conditions on mycelial growth, antibacterial activity, and metabolite profiles of the marine-derived fungus Arthrinium c.f. saccharicola. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, n. 5, p. 1063–1073, 2006.
MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.
MINITAB. **MINITAB: Statistical software**State CollegeMinitab Qualit companion, , 2010.

MIURA, K.; KUDO, M. Y. An agar-medium for aquatic hyphomycetes. **Trans. Mycol. Soc. Jpn.**, v. 11, p. 116–118, 1970.

MIYAZAKI, J.; TAN, B. H.; ERRINGTON, S. G. Eradication of endophytic bacteria via treatment for axillary buds of Petunia hybrida using Plant Preservative Mixture (PPMTM). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 102, n. 3, p. 365–372, 2010.

MOHANAN, C. **Diseases of bamboos in Asia: An illustrated manual**. 1. ed. Beijing: INBAR, 1997.

MOLINA, M. et al. Purification and some properties of Candida albicans exo-1,3-beta-glucanase. **Journal of general microbiology**, v. 135, n. Pt 2, p. 309–14, 1989.

MOTT, K. A.; PEAK, D. Alternative perspective on the control of transpiration by radiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 49, p. 19820–19823, 2011.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, p. 473–497, 1962.

NAZNIN, H. et al. Systemic resistance induced by volatile organic compounds emitted by plant growth-promoting fungi in Arabidopsis thaliana. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e86882, 2014.

NAZNIN, H. A. et al. Analysis of Volatile Organic Compounds Emitted by Plant Growth-Promoting Fungus Phoma sp. GS8-3 for Growth Promotion Effects on Tobacco. **Microbes and Environments**, v. 28, n. 1, p. 42–49, 2013.

NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. 1. ed. Oxford: Oxford University Press, 2000.

NHUT, D. T. et al. Responses of strawberry plantlets cultured in vitro under superbright red and blue light-emitting diodes (LEDs). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 73, p. 43–52, 2003.

NORONHA, E. F.; ULHOA, C. J. Characterization of a 29-kDa beta-1,3-glucanase from Trichoderma harzianum. **FEMS microbiology letters**, v. 183, n. 1, p. 119–123, 2000.

OKA, M. et al. Terpestacin, a new syncytium formation inhibitor from Arthrinium sp. **Journal of Antibiotics**, v. 46, n. 3, p. 367–373, 1993.

OLIVEIRA, A. G. DE et al. Potential phosphate solubilization and AIA production of Trichoderma spp. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 07, n. 03, p. 149–155, 2012.

OUYANG, F. et al. Transcriptome Analysis Reveals that Red and Blue Light Regulate

Growth and Phytohormone Metabolism in Norway Spruce [Picea abies (L.) Karst.]. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0127896, 2015.
OYETAYO, V. O.; DONG, C.-H.; YAO, Y.-J. Antioxidant and Antimicrobial Properties of Aqueous Extract from Dictyophora indusiata. **The Open Mycology Journal**, v. 3, p. 20–26, 2009.
PEDMALE, U. V. et al. Cryptochromes Interact Directly with PIFs to Control Plant Growth in Limiting Blue Light. **Cell**, v. 164, n. 1–2, p. 233–245, 2016.
PENG, Z. et al. Genome-wide characterization of the biggest grass, bamboo, based on 10,608 putative full-length cDNA sequences. **BMC Plant Biology**, v. 10, 2010.
PONTECORVO, G. et al. The Genetics of Aspergillus nidulans. **Advances in Genetics**, v. 5, n. C, p. 141–238, 1953.
PRABHU, A. S. et al. An Unprecedented Outbreak of Rice Blast on a Newly Released Cultivar BRS Colosso in Brazil. In: WANG, G.-L.; VALENT, B. (Eds.). . **Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast Disease**. 1. ed. Columbus: Springer, 2009. p. 430.
PRABHU, A. S.; FILIPPI, M. C. Resposta de cultivares de arroz à aplicação de fungicidas em relação ao controle da brusone nas panículas, produtividade e sustentabilidade. **Pesquisa agropecúaria brasileira**, v. 38, n. 1, p. 11–17, 2003.
R CORE TEAM. **RR Core Team**, 2017.
RADUSHEV, D. **GraphPad Prism**San DiegoGraphPad Software, , 2007.
RAI, M. et al. Phoma saccardo: Distribution, secondary metabolite production and biotechnological applications phoma saccardo: Distribution, secondary metabolite production and biotechnological applications. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 182–196, 2009.
RAI, M. K. **Handbook of Microbial Biofertilizers**. 1. ed. New York: Food Products Press, 2006.
RAMOS, H. P. et al. Antimicrobial activity from endophytic fungi Arthrinium state of Apiospora montagnei Sacc. and Papulaspora immersa. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 3, p. 629–632, 2010.
RICHARDSON, A. E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, p. 897–906, 2001.
RIVAS, D. **Bamboo 222 Success secrets - 222 Most Asked Questions On Bamboo - What You Need To Know**. Tokio: Emereo, 2015.

ROSE, M. T. et al. A meta-analysis and review of plant-growth response to humic substances: Practical implications for agriculture. **Advances in Agronomy**, v. 124, p. 37–89, 2014.

ROY, A.; SAHOO, D.; TRIPATHY, B. C. Light-hormone interaction in the red-light-induced suppression of photomorphogenesis in rice seedlings. **Protoplasma**, v. 253, n. 2, p. 393–402, 2016.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406–425, 1987.

SALDANHA, C. W. et al. A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [Pfaffia glomerata (Spreng.) Pedersen]. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 110, n. 3, p. 413–422, 2012.

SANTOS, T. et al. Regulation of the beta-1,3-glucanase system in Penicillium italicum: glucose repression of the various enzymes. **Journal of bacteriology**, v. 133, n. 2, p. 465–71, 1978.

SCHOLZ, R. W. et al. Sustainable use of phosphorus: A finite resource. **Science of the Total Environment**, v. 461–462, p. 799–803, 2013.

SCOLES, G. et al. Evaluation of rice and sugarcane SSR markers for phylogenetic and genetic diversity analyses in bambooIHBT Publication No. 0732. **Genome**, v. 51, n. 2, p. 91–103, 2008.

SHARMA, G.; PANDEY, R. R. Influence of culture media on growth , colony character and sporulation of fungi isolated from decaying vegetable wastes. **Journal of Yeast and Fungal Research**, v. 1, n. October, p. 157–164, 2010.

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.

SHUKLA, A. et al. Bambusicolous Fungi: A Reviewed Documentation. **Int. J. Pure App. Biosci.**, v. 4, n. 2, p. 304–310, 2016.

SINGH, S. R. et al. Limitations, progress and prospects of application of biotechnological tools in improvement of bamboo — a plant with extraordinary qualities. **Physiology and molecular biology of plants**, v. 19, n. 1, p. 21–41, 2013.

SOOD, A. et al. Somatic Embryogenesis and Agrobacterium Mediated Genetic Transformation in Bamboos. In: ASLAM, J.; SRIVASTAVA, P. S.; SHARMA, M. P. (Eds.). . **Somatic Embryogenesis and Genetic Transformation in Plants**. 01. ed. New Delhi: Narosa Publishing House, 2013. p. 166–178.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. v. 2

TEKALIGN, T.; HAMMES, P. S. Response of potato grown under non-inductive condition to paclobutrazol: Shoot growth, chlorophyll content, net photosynthesis, assimilate partitioning, tuber yield, quality, and dormancy. **Plant Growth Regulation**, v. 43, n. 3, p. 227–236, 2004.

TERFA, M. T. et al. A high proportion of blue light increases the photosynthesis capacity and leaf formation rate of Rosa × hybrida but does not affect time to flower opening. **Physiologia Plantarum**, v. 148, n. 1, p. 146–159, 2013.

TROUWBORST, G. et al. Plasticity of photosynthesis after the “red light syndrome” in cucumber. **Environmental and Experimental Botany**, v. 121, p. 75–82, 2016.

TUTIEMPO NETWORK. **Climate New Delhi / Palam**. Disponível em: <https://en.tutiempo.net/climate/2000/ws-421810.html>. Acesso em: 22 out. 2017.

VALENZUELA-LOPEZ, N. et al. Coelomycetous Dothideomycetes with emphasis on the families Cucurbitariaceae and Didymellaceae. **Studies in Mycology**, v. 90, p. 1–69, 2018.

VANDENBUSSCHE, F. et al. HY5 is a point of convergence between cryptochrome and cytokinin signalling pathways in Arabidopsis thaliana. **Plant Journal**, v. 49, n. 3, p. 428–441, 2007.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v. 255, n. 2, p. 571–586, 2003.

VISHNIAC, H. S. Biodiversity of yeasts and filamentous microfungi in terrestrial Antarctic ecosystems. **Biodiversity and Conservation**, v. 5, n. 11, p. 1365–1378, 1996.

VONGVIJITRA, R. Traditional Vegetative Propagation and Tissue Culture of some Thai Bamboos. In: RAO, R.; GNANAHARAN, R.; SATRYS, C. B. (Eds.). . **Bamboos: Current Research: Proceedings of the international bamboo workshop**. 1. ed. Cochin: The Kerala Forest Research Institute, 1988. p. 148–150.

WANG, J. et al. Arthpyrones A-C, pyridone alkaloids from a sponge-derived fungus arthrinium arundinis ZSDS1-F3. **Organic Letters**, v. 17, n. 3, p. 656–659, 2015.

WANG, Y. S.; STEFFENS, L. G. Effect of paclobutrazol on water stress-induced ethylene biosynthesis and polyamine accumulation in apple seedling leaves. **Phytochemistry**, v. 24, n. 10, p. 2185–2190, 1985.

WESTERGAARD, G. C.; SUOMI, S. J. The manufacture and use of bamboo tools by monkeys: Possible implications for the development of material culture among east asian hominids. **Journal of Archaeological Science**, v. 22, n. 5, p. 677–681, 1995.

WHITELAW, M. A. Growth Promotion of Plants Inoculated with Phosphate-Solubilizing Fungi. **Advances in Agronomy**, v. 69, n. C, p. 99–151, 1999.

WILLIAMSON, L. C. Phosphate Availability Regulates Root System Architecture in Arabidopsis. **Plant physiology**, v. 126, n. 2, p. 875–882, 2001.

WIX. **Bambusa oldhamii**. Disponível em: <http://jenniferai.wix.com/bamboo#!vstc0=plant>. Acesso em: 28 set. 2017.

WRIGHT, I. J. et al. Modulation of leaf economic traits and trait relationships by climate. **Global Ecology and Biogeography**, v. 14, n. 5, p. 411–421, 2005.

WU, F. H. et al. Complete nucleotide sequence of Dendrocalamus latiflorus and Bambusa oldhamii chloroplast genomes. **Tree Physiology**, v. 29, n. 6, p. 847–856, 2009.

WU, M.-C. et al. A novel approach of LED light radiation improves the antioxidant activity of pea seedlings. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1753–1758, 2007.

YEH, N.; CHUNG, J. P. High-brightness LEDs-Energy efficient lighting sources and their potential in indoor plant cultivation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 8, p. 2175–2180, 2009.

ZAIDI, A. et al. Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica,** v. 56, n. 3, p. 263–284, 2009.

ZHOU, T.; YU, R. Twentieth-century surface air temperature over China and the globe simulated by coupled climate models. **Journal of Climate**, v. 19, n. 22, p. 5843–5858, 2006.

ZOBAYED, S. M. A. et al. Stomatal characteristics and leaf anatomy of potato plantlets cultured in vitro under photoautotrophic and photomixotrophic conditions. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 35, n. 3, p. 183–188, 1999.

6. ANEXOS

Tabela 6.2. Códigos e acessos existentes no banco de dados do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) de sequências ITS 1 e 2 dos organismos utilizados na análise filogenética referente ao capítulo 2.

Organismo	**Código**	**Acesso**
Acrocalyma fici	CBS 317.76	NR_137953
Acrocalyma vagum	167	KF494165
Acrocalyma vagum	168	KF494166
Acrocalymma cycadis	CBS 137972	NR_137884
Acrocalymma medicaginis	CPC 24340	KP170620
Acrocalymma medicaginis	CPC 24341	KP170621
Arthrinium marii	CPC:18904	KF144902
Arthrinium marii	CPC:18902	KF144901
Arthrinium marii	CBS:200.57	KF144900
Arthrinium arundinis	CBS:464.83	KF144888
Arthrinium arundinis	CBS:124788	KF144885
Arthrinium malaysianum	CBS:251.29	KF144897
Arthrinium malaysianum	NR_120273	CBS 102053
Botryobambusa fusicoccum	MFLUCC 11-0143	NR_111793
Botryobambusa fusicoccum	MFLUCC 11 C0657	JX646793
Diplodia pseudoseriata	UY693	EU080924
Diplodia pseudoseriata	UY788	EU080927
Diplodia pseudoseriata	UY1285	EU860386
Phoma sp.	DI16-280	LT592937
Phoma sp.	DI16-206	LT592906
Epicoccum nigrum	NK267	FR846480
Epicoccum nigrum	G390	KR094459
Neodeightonia phoenicum	CBS 122528	NR_111325
Neodeightonia subglobosa	CBS 448.91	KF766199
Phoma herbarum	CBS 274.37	KT389537
Phoma herbarum	CBS 377.92	KT389536
Phoma herbarum	CBS 615.75	FJ427022
Phoma sp.	CB-R-4	HM486943

Tabela 6.3. Sequências ITS (*Internal Transcript Spacer*) resultantes do sequenciamento dos cinco isolados fúngicos relativos ao capítulo 02.

Código do isolado	Organismo identificado	Sequência ITS 1	Sequência ITS 4
27	*Arthrinium marii*	CACCATTTGTTAACTTACCAGTTATGCCTCGGCGTGAACTGCGTACGGA GGCAGGTCGGGTGTTACCCTGTAGGCTACCCTGTAGCTTACCCTGCACC ACTCCCGCGCAGCCCGCCGGTGGACACTAAACTCTTGTTTTATTGTATC TTCTGAGCGTATTATTTTAATAATTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTT GGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGA ATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCC ATCAGTATTCTGGTGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTTAA GCCTAGCTTAGTGTTGGGAATCTACTGTATTGTAGTTCCTTAAAGACAG TGGCGGAGCGATAGTTGTCCTCTGAGCGTAGTAAATTTATTTCTCGCTT CTGTAAGGCTCTATCTTCTCGCCATAAAACCCCCAATTTTTTAGTGGTT GACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAA GCGGAGGAARG	CTAAAAAATTGGGGGTTTTATGGCGAGAAGATAGAGCCTTACAGAAGCG AGAAATAAATTTACTACGCTCAGAGGACAACTATCGCTCCGCCACTGTC TTTAAGGAACTACAATACAGTAGATTCCCAACACTAAGCTAGGCTTAAG GGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCACCAGAATACTGATGGGCG CAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATT ACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCC GTTGTTGAAAGTTTTAATTATTAAAATAATACGCTCAGAAGATACAATA AAACAAGAGTTTAGTGTCCACCGGCGGGCTGCGCGGGAGTGGTGCAGGG TAAGCTACAGGGTAGCCTACAGGGTAACACCCGACCTGCCTCCGTACGC AGTTCACGCCGAGGCATAACTGGTAAGTTAACAAATGGTGTGGGAGTTG TATAACTCTGTAATGATCCCTCCGCAGGTTCACCTACGGA
29	*Acrocalymma* sp.	TTCTCTACCTTTGTCTATGAGTACCACTTGTTTCCTCGGGGGGGCTTGCT CCCCGCTAKKACTCACATCAACCTTTTGTAATAGCAGTCAGCGTCTGA AAATAAGTTAATTATTAAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCTGGC ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGA ATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATT CCATGGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTGAACCCTCAAGCTCTGCTT GGTGTTGGGTGTTTGTCCTGCCTTTGCGTATGGACTCGCCTTAAAGTCA TTGGCAGCCATGTAATCCG GCTTAAGCGCAGCACATTGCGTTCTTACAGCGGGAGCATCGGCATCCA AAAGCCCTTTTTTTACTCTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTG AACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA	AGAGTAAAAAAAGGGCTTTTGGATGCCGATGCTCCCGCTGTAAGAMCSC AATGTGCTGCGCTTAAGCCGGATTACATGGCTGCCAATGACTTTAAGGC GAGTCCATACGCAAAGGCAGGACAAACACCCAACACCAAGCAGAGCTT GAGGGTTCAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCATGGAATACCAAGGG GCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCAC ACTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGA TCCATTGTTGAAAGTTTTAATAATTAACTTATTTTCAGACGCTGACTGCT ATTACAAAAGGTTGATGTGAGTCCTAGCGGGGAGCAAGCCCCCCGAGGA AACAAGTGGTACTCATAGACAAAGGTAGAGAACGGTATAAACCGAAAT CGTTAATGATCCTTCCGCAGGTTCACCTACGGAAG

Tabela 6.2. continuação

122	*Botryobambusa fusicoccum*	TCTCCCACCCTCTGTTTACCCACCTCTGTTGCTTTGGCGGCGACCCCSCG CTYYAGCGCGCGGGCGCCGCCAGAGGACCACCAAACTCCAGTCAGTG AACGTCGCAGTCTGAGAAACAAGTTTAATAAACTAAAACTTTCAACAA CGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATA AGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCA CATTGCGCCCCTTGGCATTCCGAGGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTA CAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTATTGGGCGCCGTCCGCGCACGCGGAC GCGCCTCGAAGACCTCGGCGGCGGCGTCCAGCCCTCAAGCGTAGTAGA AAACACCTCGCTTTGGAGCGGTTGGCGTCGCCCGCCGGACGAACCTTC TGAACTTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGA ACTTAAGCATATCAATAAACRGGRKCATTACCGAGTTCTCGGGCCTTC GGGCCCGAATCTCCCACCCTCTGTTTACCACCTCTGTTGCTTTGGCGGC GACCC	AAGTTCAGAAGGTTCGTCCGGCGGGCGACGCCAACCGCTCCAAAGCGAG GTGTTTTCTACTACGCTTGAGGGCTGGACGCCGCCGCCGAGGTCTTCGAG GCGCGTCCGCGTGCGCGGACGGCGCCCAATACCAAGCAGAGCTTGAGGG TTGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCTCGGAATGCCAAGGGGCGCA ATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTAC TTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGT TGTTGAAAGTTTTAGTTTATTAAACTTGTTTCTCAGACTGCGACGTTCACT GACTGGAGTTTG GTGGTCCTCTGGCGGCGCCCGCGCGCTGGGCGCGGGGTCGCCRCCAAAG CAACAGAGGTGGGTAAACAGAGGGTGGGAGATTCGGGCCCGAAGGCCC GAGAACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTCACCTRCKGAATACCGAGT TCTCGGGCCTTCGGGCCCGAA
711	*Phoma* sp.	TATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTTACGTTTCCTCGGTGGGTTCG CCCACCGATTGGACAAACTTAAACCCTTTGCAGTTGAAATCAGCGTCT GAAAAAACTTAATAGTTACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTG GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCA GAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTA TTCCATGGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTGTACCTTCAAGCTCTGC TTGGTGTTGGGTGTTTGTCTCCTGTAGACTCGCCTTAAAACAATTGGCA GCCGGCGTATTGATTTCGGA GCGCAGTACATCTCGCGCTTTGCACTCATAACGACGACATCCAAAAGT ACATTTTTACACTCTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACT TAAGCATATCAATAAGCGGAGGAA	GGTMAAGAGTGTAAAAATGTACTTTTGGATGTCGTCGTTATGAGTGCAA AGCGCGAGATGTACTGCGCTCCGAAATCAATACGCCGGCTGCCAATTGT TTTAAGGCGAGTCTACAGGAGACAAACACCCAACACCAAGCAGAGCTTG AAGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCATGGAATACCAAGGG GCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCAC ACTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGA TCCGTTGTTGAAAGTTGTAACTATTAAGTTTTTTCAGACGCTGATTTCAA CTGCAAAGGGTTTAAGTTTGTCCAATCGGTGGGCGAACCCACCGAGGAA ACGTAAGGTACTCAAAAGACATGGGTAAGAGATAGCAGGCAAAGCCTA CAACTCTAGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTCACCTACGGAAG

Tabela 6.2. Continuação

712	*Phoma sp.*	ATCTCTTACCCATGTCTTTTGAGTACCTTACGTTTCCTCGGTGGGTTCSC	AGGTCAGAGTGTAAAAATGTACTTTTGGATGTCGTCGTTATGAGTGCAA
		CCACCRATTGGACAAACTTAAACCCTTTGCAGTTGAAATCAGCGTCTG	AGCGCGAGATGTACTGCGCTCCGAAATCAATACGCCGGCTGCCAATTGT
		AAAAAACTTAATAGTTACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGC	TTTAAGGCGAGTCTACAGGAGACAAACACCCAACACCAAGCAGAGCTTG
		ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGSAGA	AAGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCATGGAATACCAAGGG
		ATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATT	GCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCAC
		CCATGGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTGTACCTTCAAGCTCTGCTT	ACTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGA
		GGTGTTGGGTGTTTGTCTCCTGTARACTCGCCTTAAAACAATTGGCAGC	TCCGTTGTTGAAAGTTGTAACTATTAAGTTTTTTCAGACGCTGATTTCAA
		CGGCGTATTGATTTCGGAGCGCAGTACATCTCGCGCTTTGCACTCATAA	CTGCAAAGGGTTTAAGTTTGTCCAATCGGTGGGCGAACCCACCGAGGAA
		CGACGACATCCAAAAGTACATTTTTACACTCTTGACCTCGGATCAGGT	ACGTAAGGTACTCAAAAGACATGGGTAAGAGATAGCAGGCAAAGCCTA
		AGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAWTAASCGGAGGAAGGATC	CAACTCTAGGTAATGATCCTTCCGCAGGTTCACCTACGGAAGRG
		ATTACCTAGAGTTGTAGGCTTTGCCTGCTATCTCTTACCCATG	

Tabela 6.4. Sequências EF (Elongation Factor) e EF α-1 (Elongation Factor α-1) resultantes do sequenciamento dos cinco isolados fúngicos relativos ao capítulo 02.

Código do isolado	Organismo identificado	Sequência EF	Sequência EF α-1
29	*Acrocalymma* sp.	CTAAAAAAAATCGACGCTCGTTGAGGGGTCAACGGCGCTTCGGCCAGA ATAGGAATCTGTAGATGCGAGACACAATGTGCGTCATAGGTTGCTCCT TGCGACCGTCCACATCGGGACTAGCGCTAGCGCGTAAAAGTTCGCACA ACCCCACCATCCAAATTGCCCCTCAGCGGGATAAGCCAAAATTATGGC TTAGCATGCAAAGGCTGCAACTGGATGCCCGCACCCAAACAGAGTGCA AAAATAACAAAGAAACAAAAAGCTGATTTTGCGTACCTTCTCGAACTT CTCGATA	ATTTTTGCACTCTGTTTGGGTGCGGGCATCCAGTTGCAGCCTTTGCATGC TAAGCCATAATTTTGGCTTATCCCGCTGAGGGGCAATTTGGATGGTGGG GTTGTGCGAACTTTTACGCGCTAGCGCTAGTCCCGATGTGGACGGTCGCA AGGAGCAACCTATGACGCACATTGTGTCTCGCATCTACAGATTCCTATTC TGGCCGAAGCGCCGTTGACCCCTCAACGAGCGTCGATTTTTTTTAGTTCA CGATGCTAACACCCTCCACAGGAAGCCGCCGAACTCGGTAAGGGTTCCT TCAAGTAA
122	*Botryobambusa fusicoccum*	TCAGCGGCTGGTCGCACGGGCGCACATGCAGCGCGCTCGGTCGCAAAA AGCCCAGTGCGGTCTTTTTGCCGAGCGCCAAGCGGGGCTAAGCGCGCG AACCCCACCACCAAATTGCCCCTCACCAGCGGGCGCAGGCGGCACGGC AGCAGGGCCCGCGACGCGAGCGGCAGCGCAGAAAAAAGCGGTTGCTT ACCTTCTCGAACTTCTCGAT	GGGCCCTGCTGCCGTGCCGCCTGCGCCCGCTGGTGAGGGGCAATTTGGT GGTGGGGTTCGCGCGCTTAGCCCCGCTTGGCGCTCGGCAAAAAGACCGC ACTGGGCTTTTTGCGACCGAGCGCGCTGCATGTGCGCCCGTGCGACCAG CCGCTGACGGACGCCCCTACAGGAAGCCGCCGAGCTCGGTAAGGGTTCC TTCAAGTAA
711	*Phoma* sp.	TTCTGGAGGATACAATGAGGAAACAAAGGCGAGGATGGAAGGCATGG AAGTGTTGAGAGCCTCCAGAAGGTATGACCGAAGTCAAGGTTCGCGAT GCAAATTCAATGTGGGGCATGGTGTTGAGGCTGGCGAGCGCCCAGAGC GGACTAGCGCGAATGCGCGAAAAGCTCGCACAACCCCACCAAAAATG CCCCTCAATGAGCGATAAGCCCCAACAAGGACTTTCGCCCACCGACTG CAGATGCATGCGGTGCTGCCATGAAAGAAAAGTGATCCGTACCTTCTC GAACTTCTCGATGA	ACCGCATGCATCTGCAGTCGGTGGGCGAAAGTCCTTGTTGGGGCTTATC GCTCATTGAGGGGCATTTTTGGTGGGGTTGTGCGAGCTTTTCGCGCATTC GCGCTAGTCCGCTCTGGGCGCTCGCCAGCCTCAACACCATGCCCCACATT GAATTTGCATCGCGAACCTTGACTTCGGTCATACCTTCTGGAGGCTCTCA ACACTTCCATGCCTTCCATCCTCGCCTTTGTTTCCTCATTGTATCCTCCAG AATTATTCTAACAACTTTCACAGGAAGCCGCCGAACTCGGTAAGGGTTC CTTCAAGTAAA

Tabela 6.3. Continuação

712	*Phoma sp.*	GATACAATGAGGAAACAAAGGCGAGGATGGAAGGCATGGAAGTGTTG AGAGCCTCCAGAAGGTATGACCGAAGTCAAGGTTCGCGATGCAAATTC AATGTGGGGCATGGTGTTGAGGCTGGCGAGCGCCCAGAGCGGACTAG CGCGAATGCGCGAAAAGCTCGCACAACCCCACCAAAAATGCCCCTCAA TGAGCGAKAAGCCCCAACAAGGACTTTCGCCCACCGACTGCAGATGCA TGCGGTGCTGCCATGAAAGAAAAGTGATCCGTACCTTCTCGAACTTCT CGA	CGCATGCATCTGCAGTCGGTGGGCGAAAGTCCTTGTTGGGGCTTATCGCT CATTGAGGGGCATTTTTGGTGGGGTTGTGCGAGCTTTTCGCGCATTCGCG CTAGTCCGCTCTGGGCGCTCGCCAGCCTCAACACCATGCCCCACATTGAA TTTGCATCGCGAACCTTGACTTCGGTCATACCTTCTGGAGGCTCTCAACA CTTCCATGCCTTCCATCCTCGCCTTTGTTTCCTCATTGTATCCTCCAGAAT TATTCTAACAACTTTCACAGGAAGCCGCCGAACTCGGTAAGGGTTCCTT CAAGTAA