



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CARLA REGINE REGES SILVA FRANÇA

**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E LECTINAS DAS FOLHAS DE MANDIOCA
(*MANIHOT ESCULENTA*): ISOLAMENTOS E ATIVIDADES MICROBIANAS**

RECIFE

2017

CARLA REGINE REGES SILVA FRANÇA

**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E LECTINAS DAS FOLHAS DE MANDIOCA
(*MANIHOT ESCULENTA*): ISOLAMENTOS E ATIVIDADES MICROBIANAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

RECIFE

2017

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Elaine Cristina Barroso, CRB4/1728

Carla Regine Reges Silva França

Bactérias endofíticas e lectinas das folhas de mandioca (*Manihot esculenta*):
isolamentos e atividades microbianas / Carla Regine Reges Silva França– 2017.

119 f. : il., fig., tab.

Orientadora: Luana Casandra Breitenbach Barroso Coelho

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Biotecnologia. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife,
2017.

Inclui referências e anexos.

1. Mandioca 2. Lectinas 3. Aglutinação I. Coelho, Luana Cassandra
Breitenbach Barroso (orient). II. Título

583.69

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-175

CARLA REGINE REGES SILVA FRANÇA

**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E LECTINAS DAS FOLHAS DE MANDIOCA
(*MANIHOT ESCULENTA*): ISOLAMENTOS E ATIVIDADES MICROBIANAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas

Aprovada: 27 de junho de 2017.

Banca examinadora:

Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho
Departamento de Bioquímica - UFPE

Profa. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva
Departamento de Bioquímica - UFPE

Profa. Dra. Elba Verônica Matoso Maciel de Carvalho
Departamento de Bioquímica - UFPE

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE

Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia
Departamento de Bioquímica - UFPE

Este trabalho é dedicado com muito amor às pessoas mais brilhantes da minha vida:

Aos meus pais Carlos e Elisabeth por me ensinarem os primeiros passos e me acompanharem em todos os outros. Ao meu irmão Ernâne, minha cunhada Aída e meu sobrinho Pedro pelo amor e companheirismo. Aos meus avós e tios, essência de amor e amizade. Ao meu querido esposo Afonso pelo amor, apoio e paciência. Aos meus amores Arthur e Carlos Vítor, presentes de Deus na minha vida, simplesmente por existirem e deixarem meus dias mais felizes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, por estar comigo em todos os momentos e me dar forças para superar todos os obstáculos.

Aos meus pais Elisabeth e Carlos, pelo apoio, compreensão, por sempre terem me incentivado a lutar pelos meus objetivos com amor, dedicação, perseverança, humildade e fé.

À FACEPE (Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco), pela concessão da bolsa de doutorado.

À minha orientadora Profa. Dra. Luana Cassandra B. B. Coelho por acreditar em mim, pela valiosa orientação científica, amizade, confiança e apoio em todos esses anos.

Aos coorientadores e amigos Dr. Carlos Alberto Tuão Gava e Dr. Wagner Pereira Félix, pela grande contribuição neste trabalho, amizade, estímulo e disponibilidade.

A todos que fazem o Laboratório de Bioquímica, Departamento de Zootecnia de Universidade Federal do Vale do São Francisco-Univasf, como um todo em especial à Deize Raquel, Yasmin Gonçalves, Adijailson Neri, Alexandre Brito e Cárta Rosiane.

Aos integrantes do Laboratório de Controle Biológico, da Embrapa Semiárido, pela amizade, carinho e valorosa contribuição nas análises.

Ao corpo docente do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pelas contribuições repassadas em meio às disciplinas.

Ao meu marido Afonso França pelo amor, apoio de sempre, grande paciência e incentivo.

Ao meu irmão Ernâne Augusto, minha cunhada Aída e ao meu sobrinho Pedro Augusto, pelo apoio e torcida com todo amor.

À minha sogra Dôra pelo apoio.

À Alineaurea Florentino, pela amizade, carinho, apoio, presente de Deus para toda vida.

Aos amigos de turma Cláudia Crastro, Dayana, Araeska, Inácio, Juliana, Monialy, Diego e Priscila, pela torcida e estímulo.

A todos os meus amigos pela amizade e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para esta conquista.

“Tu és o lugar onde me escondo; tu me preservas da angústia; tu me cinges de alegres cantos de livramento.

Instruir-te-ei, e ensinar-te-ei o caminho que deves seguir; guiar-te-ei com os meus olhos”.

(SALMO 32: 7-8).

RESUMO

Os micro-organismos endofíticos, incluem principalmente fungos e bactérias que vivem no interior das plantas, habitando de modo geral suas partes aéreas, como folhas e caules, sem causar aparentemente nenhum dano a seus hospedeiros. As lectinas são proteínas ou glicoproteínas capazes de aglutinar glicoconjugados, encontradas em diferentes tipos de organismos, entre estes as bactérias endofíticas. O objetivo do trabalho foi isolar bactérias endofíticas dos tecidos (folhas, raízes, raízes de absorção, caules, ramos primários e ramos secundários) das plantas de mandioca *Manihot esculenta* Crantz, *Euphorbiaceae*, bem como a lectina presente nas folhas, avaliando suas atividades antimicrobianas e interação lectina/micro-organismos. Para o estudo das bactérias endofíticas foram utilizadas duas cultivares de mandioca, Recife e Engana Ladrão. Fragmentos dos tecidos oriundos de diferentes órgãos das plantas e, também amostras de solo da rizosfera foram inoculados em diferentes meios de cultivo. Não foram observadas diferenças significativas entre os meios de culturas utilizados na quantidade de bactérias isoladas. No entanto, a frequência de bactérias foi maior nas raízes e menor nos ramos secundários das duas cultivares analisadas. A identificação utilizando sequenciamento parcial da região 16s do DNA ribossomal mostrou que a população de bactérias encontradas nas duas cultivares de mandioca apresentou grande diversidade. De maneira geral, as duas cultivares mostraram colonização por bactérias endofíticas dos gêneros *Curtobacterium*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Kosakonia*, *Rhizobium*, *Pantoea*, *Cronobacter*, *Bacillus*, *Microbacterium* e *Stenotrophomonas*. O gênero *Pseudomonas* mostrou-se mais o representativo para as duas cultivares de mandioca. Avaliando-se a atividade antimicrobiana das bactérias testadas das duas cultivares selecionadas contra os fungos patogênicos *L. theobromae*, *N. parvum*, *F. aesculi* e *C. dianesei* foram detectados um grande número de isolados com atividade antifúngica em cultivo pareado, com potencial para aplicação no controle biológico de fungos causadores de podridões em frutos. A partir da maceração de folhas da cultivar Recife, a lectina foi extraída e purificada utilizando o método de extração em tampão fosfato e precipitação em solução saturada de sulfato de amônio. A máxima atividade hemaglutinante da lectina de *M. esculenta* foi detectada contra eritrócitos de coelho e com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* sendo inibida com o carboidrato manose. O pico retido (PII) proveniente da coluna de afinidade agarose-manose mostrou elevada atividade específica da lectina (MesLL) na cultivar testada e, apresentou em SDS-PAGE massa molecular aparente de 64 kDa. Nos testes de atividade antimicrobiana, a fração purificada MesLL não inibiu o desenvolvimento das bactérias patogênicas utilizadas no experimento. Por outro lado, a fração

MesLL promoveu aglutinação visível dos isolados de bactérias endofíticas obtidas neste estudo. Conclui-se que as plantas de mandioca possuem bactérias endofíticas e lectinas com potencial uso no controle microbiano e, tipagem e identificação de células.

Palavras-chave: *Manihot esculenta*; Endofíticos; Lectina; Atividade antimicrobiana; Aglutinação; Manose.

ABSTRACT

Native and cultivated plants may be the source of microorganisms and metabolites of biotechnological interest. Endophytic microorganisms, include fungi and bacteria that live inside plants tissues, generally inhabiting roots, stems and leaves, without apparent damage to their hosts. The lectins are proteins or glycoproteins capable of agglutinating glycoconjugates found in different types of organisms, among these endophytic bacteria. The objective of this work was to isolate endophytic bacteria from cassava (*Manihot esculenta* Crantz, *Euphorbiaceae*) plants, as well to purify and partially characterize lectin present in the leaves, evaluating the antimicrobial metabolites produced by bacterial isolates and lectin/microorganism interaction. Tissues macerates from different plant organs of two cultivars of cassava, Recife and Engana Ladrão, and the suspensions of soil samples from rhizosphere, were inoculated in different growth media. No significant differences were observed between the culture media used in the number of bacteria isolated. There was no difference also among cassava cultivars, but the frequency of bacteria was higher in the roots and smaller in the secondary branches. Bacterial identification, using partial sequencing of the 16s region of the ribosomal DNA, showed large diversity of the bacterial population. In general, the two cultivars showed colonization by endophytic bacteria of the genera *Curtobacterium*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Kosakonia*, *Rhizobium*, *Pantoea*, *Cronobacter*, *Bacillus*, *Microbacterium* and *Stenotrophomonas*. The genus *Pseudomonas* was the more representative to both cassava cultivars. Antimicrobial activity of bacterial isolates was tested against the fungi *Lasiodiplodia theobromae*, *Neofusicoccum parvum*, *Fusicoccum aesculli* and *Colletotrichum dianesei*. Although in varying frequency, it was detected a large number of isolates able to produce inhibition halos in the paired cultivation assay. Lectin of *M. esculenta* leaves was extracted using maceration in phosphate buffer and precipitation in saturated solution of ammonium sulphate, followed by affinity chromatography. Hemagglutinating activity of the lectin was higher against rabbit erythrocytes and it was inhibited with the carbohydrate mannose. The active fraction retained in the agarose-mannose affinity column showed high lectin-specific activity (MesLL), with apparent molecular weight of 64 kDa verified in SDS-PAGE. In the tests of antimicrobial activity, the purified MesLL fraction did not inhibit the development of the pathogenic bacteria used in the experiment. On the other hand, the MesLL fraction promoted visible agglutination of the isolates of endophytic bacteria obtained in this study. It is concluded that the cassava plants have endophytic bacteria and lectins with potential use in microbial control and, typing and identification of cells.

Key words: *Manihot esculenta*; Endophytic; Lectin; Antimicrobial activity; Agglutination; Mannose.

LISTA DE FIGURAS

Artigo I

- Figura 1 - Origem e distribuição das plantas de mandioca..... 25
- Figura 2 - Área de mandioca cultivada com água de poço na comunidade Caiçara, Petrolina-PE.....28
- Figura 3 - Características morfológicas com base nos descritores principais de *Manihot esculenta* Crantz, cultivar Brasília (A), Recife (B) e Engana Ladrão (C) coletadas no Campo Experimental da Embrapa Semiárido, Petrolina-PE. 2017. Detalhe, na coluna da direita, para a cor do córtex do caule (acima) e externa do caule (abaixo).....30
- Figura 4 - Terreiro de secagem de raspas de raízes ou parte aérea de mandioca. Petrolina-PE.....34
- Figura 5 - Presença (A) e sintomas de ácaro (B) e cochonilha (C e D) em folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz).....35

Artigo II

- Figura 1 - Número de bactérias endofíticas isoladas em relação aos meios de cultura utilizados. A- cultivar Recife e B- cultivar Engana Ladrão.....47
- Figura 2 - Dendrograma de similaridade baseados nas características morfológicas e fenotípicas entre as bactérias endofíticas isoladas de plantas de mandioca. A. Cultivar Recife (FR- folha, RR-raiz, CR-caule, RAR-raiz de absorção, RPR-ramos primários, RSR-ramos secundários e RZR-rizosfera) e B. Cultivar Engana Ladrão (FE- folha, RE-raiz, CE-caule, RAE-raiz de absorção, RPE-ramos primários, RSE-ramos secundários e RZE-rizosfera).....48
- Figura 3 - Dendrograma de similaridade de bactérias endofíticas isoladas de diferentes órgãos de plantas de mandioca cv. Recife por meio da técnica de 16S- rDNA. FR- folha, RR-raiz, CR-caule, RAR-raiz de absorção, RPR-ramos primários, RSR-ramos secundários e RZR-rizosfera.....52
- Figura 4 - Dendrograma de similaridade de bactérias endofíticas isoladas de diferentes órgãos de plantas de mandioca cv. Engana Ladrão por meio da técnica de 16S- rDNA. FE-

folha, RE-raiz, CE-caule, RAE-raiz de absorção, RPE-ramos primários, RSE-ramos secundários e RZE-rizosfera.....	54
Figura 5 - Taxa de inibição de fungos patogênicos por bactérias endofíticas isoladas de Mandioca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz). A-vr. Recife em meio de cultura BDA, B-vr. Recife em meio de cultura NA, C-vr. Engana Ladrão em meio de cultura BDA, D-vr. Engana Ladrão em meio de cultura NA.....	55
Figura 6 - Quantidade de bactérias endofíticas isoladas de Mandioca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz) que com atividade produção de metabólitos antifúngicos contra quatro fungos patogênicos testados. A-vr. Recife em meio de cultura BDA, B-vr. Recife em meio de cultura NA, C-vr. Engana Ladrão em meio de cultura BDA, D-vr. Engana Ladrão em meio de cultura NA.....	55

Artigo III

Figura 1 - (A) Efeito do pH e da (B) temperatura da lectina de <i>Manihot esculenta</i> Crantz....	71
Figura 2 - Purificação de lectina de mandioca (<i>M. esculenta</i> Crantz - MesLL) por cromatografia de afinidade (agarose-manose).....	73
Figura 3 - Análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) da lectina purificada de folhas de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) - 64 kDa, retida na coluna agarose-manose. (A) marcador molecular (GE-Amersham ^T e (B) MesLL (25 µg).....	73
Figura 4 - Aglutinação de bactérias endofíticas e lectina purificada de folhas de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) MesLL. A- Suspensão do isolado FR33, controle; B- Suspensão do isolado FR33 com a lectina MesLL; . C- Suspensão do isolado FR88, controle; D- Suspensão do isolado FR88 com a lectina MesLL; . E- Suspensão da levedura <i>S. cerevisiae</i> , controle; F- Suspensão da levedura <i>S. cerevisiae</i> com a lectina MesLL.....	75

LISTA DE TABELAS

Artigo II

Tabela 1- Características fenotípicas e morfológicas de bactérias endofíticas isoladas de plantas de mandioca.....	43
Tabela 2 - Distribuição percentual dos isolados bacterianos de acordo com a caracterização fenotípica e morfológica dos isolados endofíticos de mandioca utilizados no ensaio de atividade antimicrobiana.....	49
Tabela 3- Principais gêneros de bactérias endofíticas encontradas em cultivares de mandioca.....	48

Artigo III

Tabela 1. Purificação da lectina de <i>Manihot esculenta</i> Crantz.....	70
Tabela 2. Atividade Biológica entre a lectina (MesLL) e a levedura <i>S. cerevisiae</i>	71

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
RESUMO	7
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	18
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVOS	16
1.1.1 Objetivo Geral.....	17
1.1.2 Objetivos Específicos	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 MANDIOCA	18
2.2 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS	18
2.3 LECTINAS	21
3 RESULTADOS	23
3.1 <i>MANIHOT ESCULENTA</i> : ASPECTOS BIOLÓGICOS, CULTIVO E APLICAÇÕES.....	23
3.2 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE <i>MANIHOT ESCULENTA</i> CRANTZ (MANDIOCA): ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	38
3.3 LECTINA DAS FOLHAS DE MANDIOCA (<i>MANIHOT ESCULENTA</i> CRANTZ): PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO.....	61
CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS	81
ANEXO 1 – NORMAS DO PERIÓDICO ADVANCES IN RESEARCH	90

ANEXO 2 – NORMAS DO PERIÓDICO MICROBIOLOGICAL RESEARCH97

ANEXO 3 – NORMAS DO PERIÓDICO ENVIRONMENTAL TECHNOLOGY ..111

1 INTRODUÇÃO

Os micro-organismos constituem uma das maiores fontes de recursos naturais e valor biotecnológico, principalmente os endófitos que vivem em habitats específicos. Endófitos são micróbios que habitam o interior das plantas, sendo encontrados em órgãos e tecidos vegetais, a comunidade endofítica é constituída principalmente por fungos e bactérias.

A presença de bactérias endofíticas tem sido associada à promoção do crescimento e defesa de várias culturas. O acúmulo de informações sobre essa interação planta-endofítico tem tido uma atenção especial, uma vez que, algumas espécies de micro-organismos endofíticos são produtoras de fármacos, como por exemplo, antitumorais e antibióticos, além do seu importante papel no controle biológico de doenças bacterianas e fúngicas na planta.

A cultura da mandioca tem importância econômica, social e cultural significativa no Brasil. A cultura é a base econômica de milhares de pequenas propriedades e proporciona segurança alimentar de milhões de brasileiros, principalmente na região Norte e Nordeste, visto que o aproveitamento da planta é total.

O uso de variedades de mandioca melhoradas e adaptadas às condições edafoclimáticas locais é um dos meios para se promover melhoria do sistema de produção da cultura, aumentar o rendimento da mandioca e diminuir possíveis intoxicações por cianoglicosídeos.

Outro grupo associado à defesa vegetal são as lectinas, que constituem um grupo heterogêneo de proteínas, de origem não imunológica, com distribuição ubíqua na natureza. Podem conter dois ou mais sítios de ligação reversível e específica a carboidratos, podendo resultar na aglutinação de células animais e/ou vegetais e na precipitação de polissacarídeos, glicoproteínas ou glicolipídeos

As lectinas pelas suas atividades biológicas muito exploradas têm sido isoladas de uma diversidade de microrganismos, animais e plantas.

Esse estudo detectou a produção de substâncias antimicrobianas por bactérias endofíticas e, em conjunto com extração da lectina de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) propiciou o entendimento das interações entre planta e micro-organismos, favorecendo uma melhor compreensão do processo endossimbiótico, como também encontrou correlação entre a lectina e as bactérias endofíticas das folhas de mandioca.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Isolar bactérias endofíticas dos tecidos de duas plantas de mandioca (*M. esculenta* Crantz), bem como a lectina presente nas folhas, avaliando suas atividades antimicrobianas e interação lectina/micro-organismos.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Realizar uma revisão bibliográfica sobre a cultura da mandioca;
- b) Isolar bactérias endofíticas dos tecidos das plantas de mandioca;
- c) Caracterizar morfológicamente e fenotipicamente as bactérias;
- d) Verificar a diversidade de bactérias endofíticas em plantas de mandioca;
- e) Identificar a nível molecular os isolados bacterianos;
- f) Determinar a atividade antimicrobiana dos micro-organismos isolados;
- g) Purificar a lectina presente nas folhas de mandioca;
- h) Determinar a especificidade da lectina frente a diferentes carboidratos;
- i) Caracterizar as propriedades físico-químicas da lectina;
- j) Estimar a massa molecular aparente da lectina por SDS-PAGE;
- k) Verificar a especificidade da lectina com diferentes eritrócitos;
- l) Verificar a especificidade da lectina com diferentes estirpes de leveduras;
- m) Investigar a presença de atividade antimicrobiana da lectina frente a micro-organismos patógenos;
- n) Verificar interação lectina/bactérias endofíticas das folhas de mandioca.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 MANDIOCA

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é cultivada mundialmente nas regiões do trópico e sub-trópico, podendo se adaptar a diversas condições ambientais e tipos de solo. No Brasil, a cultura da mandioca tem importância econômica, social e cultural significativa.

A cultura é a base econômica de milhares de pequenas propriedades e proporciona segurança alimentar de milhões de brasileiros (SILVA; FERREIRA FILHO, 2007), principalmente na região Norte e Nordeste, visto que o aproveitamento da planta é total. Ao longo dos anos, os trabalhos de melhoramento genético têm sido fomentados com os acessos que compõem os Bancos Ativos de Germoplasma (BAG), permitindo dessa forma atender às demandas de variedades para a agroindústria, a alimentação humana e a nutrição animal na região (VIEIRA *et al.*, 2008).

.O uso de variedades de mandioca melhoradas e adaptadas às condições edafoclimáticas locais é um dos meios para se promover melhoria do sistema de produção da cultura (NASSAR, 2000), aumentar o rendimento da mandioca, diminuir possíveis intoxicações por cianoglicosídeos e resistência da planta contra pragas e doenças.

2.2 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS

Os micro-organismos endofíticos são aqueles que são conhecidos por colonizarem as estruturas internas (tecidos) de plantas sem ocasionarem danos. Ocorrem em todas as partes das plantas como: folhas, flores, frutos, caule e raízes, e estas são uma das principais portas de entrada desses organismos (AZEVEDO, 1998; MOREIRA; SIQUEIRA, 2005; PEIXOTO NETO *et al.*, 2002).

É registrada a ocorrência de bactérias endofíticas em plantas de, algodão (*Gossypium* L.) (MONNERAT *et al.*, 2003), planta medicinal erva-baleeira (*Cordia verbenacea*) (BRAGA e ESPESSOTO, 2008), banana (*Musa ssp.*) (SOUZA *et al.*, 2013), milho (*Zea mays*) (PISARSKA e PIETR, 2015), feijão (*Phaseolus vulgaris*) (COSTA *et al.*, 2012). Com base em estudos com a cultura da mandioca várias bactérias associadas foram isoladas e identificadas (TEIXEIRA *et al.*, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2007). Em plantas de sorgo foram detectadas as bactérias endofíticas dos gêneros *Synechococcus* e *Pantoea* (RAMMOND *et al.*, 2013).

Weyens *et al.* (2013) isolaram uma diversidade de bactérias endófitas de plantas de Salgueiro planta resistente a metais pesados e, observaram que a ocorrência dessas bactérias nos órgãos isolados variavam, os gêneros mais comumente encontrados foram: *Paenibacillus*, *Caulobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantoea* e *Rizobium*.

A diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho foi avaliada por meio da extração do DNA ambiental da comunidade bacteriana, amplificação, clonagem e seqüenciamento do gene *nifH*, os resultados mostram um grande número de gêneros de bactérias, como, *Alcaligenes*, *Azoarcus*, *Azohydromonas*, *Azomonas*, *Azonexus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Dechloromonas*, *Delftia*, *Herbaspirillum*, *Ideonella*, *Klebsiella*, *Methylosinus*, *Pelomonas*, *Pseudomonas*, *Raoultella*, *Rhodobacter*, *Rhodovulum*, *Sinorhizobium* e *Xanthobacter* (ROESCH *et al.*, 2007).

As bactérias endofíticas associadas as plantas desempenham ações benéficas para a manutenção e desenvolvimento do hospedeiro. Os estudos de identificação estão sendo realizados através de ferramentas descritivas (caracterização morfológicas, fenotípicas e culturais) e moleculares que concretizam o registro do endofítico isolado (LACAVA *et al.*, 2006; ROESCH *et al.*, 2007; RAMOND *et al.*, 2013).

A obtenção de substâncias de interesse econômico, como enzimas, antibióticos e outros fármacos, a partir de micro-organismos endofíticos, tem sido frequentemente relatada na literatura científica. Em bactérias os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* são considerados agentes de biocontrole de doenças de plantas, o que demonstra o seu grande potencial para utilização na agricultura (TEIXEIRA *et al.*, 2007).

Pesquisas recentes têm sido conduzidas com linhagens de *Bacillus*, *Methylobacterium*, *Microbacterium* que são capazes de produzir Ácido Indol Acético (AIA) e compostos relacionados (ASSUMPÇÃO *et al.*, 2009), potencializando o crescimento das plantas. Outras bactérias do gênero *Burkholderia*, *Curtobacterium* e *Pantoea* têm sido avaliadas quanto à promoção de crescimento vegetal (SANTOS; VARAVALLO, 2011).

Muitos dos compostos naturais que possuem alto valor agregado e produzidos em pequeníssimas quantidades pelas plantas podem ter seus genes principais da rota metabólica chave estudados nos microrganismos endofíticos produtores do composto. É uma tarefa muito mais fácil tendo em vista a menor complexidade genômica desses organismos, que abre excelentes perspectivas para a utilização da engenharia genética visando promover o aumento da produção desses compostos ou manipulações visando à obtenção de antitumorais mais eficientes e de menor toxicidade (PEIXOTO NETO *et al.*, 2002).

Com o auxílio da engenharia genética, novas formas de controle biológico vêm sendo desenvolvidas a partir de bactérias endofíticas. A introdução de genes exógenos nestas bactérias possibilita a aquisição de novas características utilizadas no controle de doenças e pragas. Antibióticos e outros metabólitos produzidos por endofíticos podem ser usados para controle de doenças de plantas.

O controle de pragas por bactérias endofíticas é uma alternativa que contribui para a diminuição ou total redução de agroquímicos utilizados na agricultura (AZEVEDO *et al.*, 1998).

Braga e Espessoto (2008) testaram o efeito de bactérias endofíticas isoladas da planta medicinal Erva-baleeira na habilidade de inibir o crescimento dos patógenos humanos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* enteropatogênica, *Micrococcus luteus*, *Candida albicans*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis*, *Shigella* e *Salmonella*., e detectaram que 15 das bactérias endofíticas apresentaram atividade antimicrobiana para todos os patógenos testados.

Duas linhagens de bactérias endofíticas isoladas de *Echinodorus scaber* (chapéu de couro), identificadas como *Bacillus sp* e *Bacillus subtilis* inibiram os fungos patogênicos *Colletotrichum lindemuthianum*, *C. gloeosporioides*, *Corynespora cassiicola*, *Fusarium solani*, *Microsporium canis*. As duas linhagens quando inoculadas em grãos de soja, inibiram aproximadamente 100% do desenvolvimento de fungos sobre esses grãos (SOUZA *et al.*, 2015).

Shiomi *et al.*, (2015), testando a eficácia de nove isolados de bactérias endofíticas no biocontrole da mancha foliar de *Exserohilum turcicum*, pela microbiolização das sementes e da parte aérea do milho verificou que *Bacillus subtilis*, *Bacillus lentimorbus*, *Streptomyces sp.* e *Bacillus agaradhaerens* se destacaram dos demais, quando aplicados na parte aérea, em todos os intervalos testados, porém quando as bactérias foram aplicadas nas sementes, *Bacillus lentimorbus*, *Streptomyces sp.*, *Ewingella americana* e *Xanthomonas axonopodis* foram os mais eficientes.

A bactéria endofítica do gênero *Bacillus* oferece novas perspectivas de controle de *Plutella xylostella*. Em testes realizados para caracterização e toxidez dessas bactérias foi possível observar que sete isolados causaram 100% de mortalidade e foram semelhantes à estirpe padrão utilizada, *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (MEDEIROS *et al.*, 2005). Em trabalhos desenvolvidos por Ootani *et al.* (2011) com *Bacillus thuringiensis* isolado do solo, foi verificado toxidez para larvas de *Aedes aegypti* com mortalidade superior a 90% por esta bactéria. Esse resultado é importante, pois mostra potencialidades para produção de bioinseticidas eficiente contra esse inseto.

2.3 LECTINAS

Os primeiros relatos sobre as lectinas datam o ano de 1889 quando Stilmark isolou uma proteína tóxica a partir de *Ricinus communis*, denominada ricina, capaz de aglutinar eritrócitos humanos e de animais (SHARON; LIS, 2004).

As lectinas constituem um grupo heterogêneo de proteínas, de origem não imunológica, com distribuição ubíqua na natureza. Podem conter dois ou mais sítios de ligação reversível e específica a carboidratos, podendo resultar na aglutinação de células animais, microbianas e na precipitação de polissacarídeos, glicoproteínas ou glicolipídeos (CHEVREUIL *et al.*, 2009; DIMITRIJEVIC *et al.*, 2010; PAIVA *et al.*, 2011).

As lectinas pelas suas atividades biológicas muito exploradas têm sido isoladas de uma diversidade de micro-organismos, animais e plantas (COELHO; SILVA, 2000; KILPATRICK, 2002; MELO *et al.*, 2004; SILVA, 2008; LIMA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2012; ZUO *et al.*, 2012). Grande parte das lectinas de vegetais são frequentemente isoladas de sementes, principalmente das leguminosas (FERNANDES *et al.*, 2011), nas sementes encontra-se em maior proporção os nutrientes necessários para o desenvolvimento da nova planta.

Segundo Peumans e Van Damme (1995), a maioria das proteínas que estão envolvidas no mecanismo de defesa das plantas precisam apresentar estabilidade a variações de temperatura e pH, como também resistir a uma grande diversidade de enzimas proteolíticas.

A ampla distribuição reflete uma multiplicidade de funções biológicas, que estão relacionadas à sua habilidade de reconhecer carboidratos e glicoconjugados na superfície celular. O estudo de suas propriedades biológicas tem sugerido importantes aplicações biotecnológicas, dentre estas aplicações, destaca-se a identificação de receptores de membrana e a detecção de estruturas características de neoplasias (LIS; SHARON, 1998).

As lectinas têm sido previamente classificadas tanto no domínio de reconhecimento a carboidratos, como também na base de sua especificidade a grupos sanguíneos e subsequentemente no potencial com o qual um monossacarídeo inibe sua aglutinação e atividade precipitante de glicoconjugados. Devido à especificidade de interação das lectinas a glicoconjugados em solução ou na superfície celular essas moléculas apresentam diversas aplicações biotecnológicas (CORREIA *et al.*, 2008).

De acordo com sua especificidade de ligação a carboidratos as lectinas estão subdivididas em cinco grupos: D-manose/D-glucose, D-galactose/N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, L-fucose, e ácido siálico (GOLDSTEIN; WINTER; PORETZ, 1997). Portanto, dependendo da especificidade, a lectina irá ligar-se seletivamente a um destes

açúcares acima que são componentes típicos de superfícies de células eucarióticas (LIS; SHARON, 1998).

Com base no açúcar específico as lectinas podem ser isoladas em matrizes cromatográficas que purificaram a lectina. A cromatografia de afinidade é um método que depende essencialmente da interação entre a molécula a ser purificada e uma fase sólida que permita a separação de contaminantes (COELHO *et al.*, 2012).

A aplicação de lectinas é ampla, em muitos relatados comprovam o efeito significativo para o desenvolvimento de produtos. A atividade antibacteriana foi constatada por Carvalho *et al.*, (2012), utilizando a lectina extraída do soro do peixe tambaqui *Colossoma macropomum*. Gomes *et al.*, (2012), descreveu o efeito positivo das lectinas de leguminosas (DRL ConBr e DvioL, extraídas respectivamente de *Dioclea violacea*, *D. rostrata* e *Canavalia brasiliensis*) com atividade antifúngica, contra leveduras isoladas da secreção vaginal.

Santos *et al.* (2012) testaram a lectina extraída de sementes de *Moringa oleífera* Lamarck (WSMoL) e verificaram atividade ovicida, tornando a lectina uma forte candidata no controle integrado de *Aedes aegypti*. Ferreira *et al.* (2011) trabalhando com a mesma lectina (WSMoL) observaram que a mesma possui potencial como biocoagulante natural para água turva, reduzindo turbidez, sólidos em suspensão e contaminação bacteriana. Napoleão *et al.* (2011) também encontraram atividade larvicida para a lectina das folhas de *Myracrodruon urundeuva* (MuLL), indicando que a lectina pode se tornar um novo agente larvicida biodegradável para o controle da dengue, a atividade larvicida de MuLL pode estar ligada à sua resistência à proteólise por enzimas digestivas larvais e interferência na atividade catalítica dessas enzimas.

Lectinas de plantas são utilizadas como sondas na histoquímica para caracterizar vários tipos de células em estágios de diferenciação e maturação de câncer. Nunes *et al.* (2012) comprovaram que a lectina isolada do veneno de *Bothrops leucurus* (BIL) exibiu atividade citotóxica contra todas as linhagens de células tumorais testadas via indução da fosfatidilserina, externalização e despolarização mitocondrial, indicando morte celular por apoptose. Em trabalhos com atividades antineoplásicas Zuo *et al.* (2012) constataram que a lectina isolada dos bulbos *Pinellia ternata* apresentou capacidade para inibir neoplasmas.

Pereira *et al.* (2012), utilizando a isolectina (Cramoll 1,4) como componente de hidrogel para tratamento de queimaduras de segundo grau, observaram aceleração na granulação, reepitelização e retração de ferida, demonstrando assim o potencial uso da lectina no tratamento de queimaduras térmicas.

3 RESULTADOS

3.1 *MANIHOT ESCULENTA*: ASPECTOS BIOLÓGICOS, CULTIVO E APLICAÇÕES

ARTIGO DE REVISÃO A SER ENVIADO E TRADUZIDO PARA O PERIÓDICO:
ADVANCES IN RESEARCH.



***Manihot esculenta*: aspectos biológicos, cultivo e aplicações**

Carla R. R. S. França¹, Alineaurea F. Silva², Carlos A. T. Gava², Wagner P. Félix³ & Luana C. B. B. Coelho¹

1 Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, UFPE-Universidade Federal de Pernambuco, Recife-Pe, Brasil.

2 Embrapa Semiárido, Petrolina-Pe, Brasil.

3 Departamento de Zootecnia, Laboratório de Bioquímica, Univasf-Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina-Pe, Brasil.

Resumo

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta heliófila, perene, arbustiva, pertencente à família das Euforbiáceas, com origem de domesticação na América do Sul. A parte mais importante da planta são as raízes tuberosas, ricas em amido, que são utilizadas na alimentação humana e animal ou como matéria-prima para diversas indústrias. A parte aérea também é utilizada na alimentação animal e humana pelo seu conteúdo em proteínas, carboidratos, minerais e vitaminas. A mandioca, além da grande inserção na região semiárida nordestina é uma planta que se dispõe a diversas formas de processamento, favorecendo a segurança alimentar das famílias e do rebanho, até com elevação do nível econômico de algumas unidades de processamento. É uma planta cianogênica, isto é, contém compostos cianídricos, comumente chamados de cianoglicosídeos, e também enzimas capazes de degradar esses compostos e liberar ácido cianídrico (HCN). O uso das variedades de mandioca é conhecido em todas as regiões do Brasil, tanto para a indústria (extração de fécula, polvilho, etc.), quanto para mesa (cozida ou no preparo das mais variadas receitas doces e salgadas). A mandioca, que se caracteriza pela rusticidade, elevada capacidade de se adaptar a longos períodos de estiagem, diversidade genética, resistência a doenças e tolerância a pragas, apresenta boas possibilidades de cultivo consorciado com inúmeras outras plantas.

Palavras-chave: mandioca, *Manihot esculenta*, ácido cianídrico.

1. Origem e distribuição

A mandioca, *Manihot esculenta* Crantz, *Euphorbiaceae*, conhecida como mandioca, macaxeira ou aipim, é uma das principais plantas alimentícias e forrageiras do mundo. Ela ocupa a quarta posição entre as culturas básicas com uma produção mundial de cerca de 160 milhões de toneladas. A maioria delas vem de três regiões, África Ocidental e da bacia adjacente Congo, América do Sul tropical e sul e sudeste da Ásia (Figura 1). É resistente à seca e cresce bem em solos pobres em nutrientes. Ele é um dos produtos mais ricos em carboidratos e energia entre todas as culturas alimentares [1].

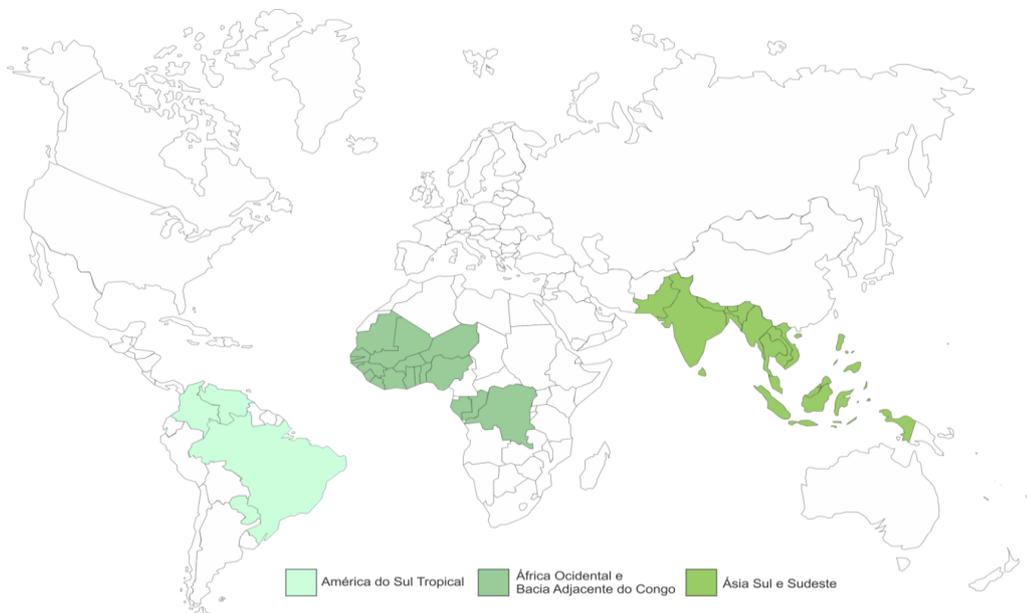


Figura 1. Origem e distribuição das plantas de mandioca (NASSAR et al., 2008).

Existem vários artigos que discutem a origem do cultivo da mandioca e grande parte dos autores apontam que a cultura tem origem sulamericana [2, 3, 4].

Todas as espécies de *Manihot* são nativas de regiões tropicais do Novo Mundo, particularmente no Brasil e no México. As únicas espécies encontradas em outras regiões tropicais do mundo são aquelas que foram introduzidas após viagens de Colombo para o continente americano. As espécies de *Manihot* são esporádicas na sua distribuição e raramente tornam-se dominante sobre a vegetação local. A maioria destas espécies está em regiões relativamente secas, e só algumas são encontrados na floresta tropical [5].

No Brasil ela é cultivada em todas as regiões, com uma consequente diversidade de variedades adaptadas para cada um dos diferentes biomas, conferindo a espécie uma grande diversidade genética. Essa grande variabilidade genética reflete em inúmeros aspectos da

planta, como o próprio conteúdo de carboidrato das raízes [6] que é uma das características mais analisada, apesar de influenciada por um lado por diversos fatores, como clima, tipo de solo, tratamentos culturais e disponibilidade hídrica e por outro influencia o rendimento e a qualidade dos diferentes produtos, como farinha, fécula e raspa.

2. Produção

A produção nacional de mandioca em 2016 foi de 24.056 milhões de toneladas, apresentando crescimento da ordem de 3,9% em relação a 2015. Esse aumento de produção refere-se principalmente às regiões Norte, Sudeste e Centro Oeste, restando para o Nordeste uma resposta negativa de crescimento, resultado dos últimos anos de seca que atingiram fortemente a região.

Apesar do decréscimo da produção na região Nordeste, a mandioca é cultivada em todos os estados do Nordeste, tendo papel destacado na alimentação humana e animal e também como matéria-prima em inúmeros produtos industriais. Essa atividade também se constitui em uma importante fonte de geração de emprego e renda na região. Dentre os principais estados produtores no Nordeste destacam-se: Bahia, Maranhão, Ceará, Sergipe e Pernambuco.

As regiões Norte e Nordeste destacam-se como principais consumidoras de mandioca, principalmente sob a forma de farinha, apesar de diversos outros produtos preparados com as raízes apresentarem atualmente forte inserção na cultura alimentar local [7].

A mandioca é uma espécie com grande capacidade para esgotar o solo onde desenvolve-se. Para evitar esse problema, é importante efetuar medidas que amenizem a situação. O uso de resíduos orgânicos [8] e o cultivo de outras espécies de forma simultânea, como, por exemplo, com o feijão (*Phaseolus vulgaris*), sorgo (*Sorghum bicolor*), caupi (*Vigna unguiculata*), algodão (*Gossypium hirsutum* L.) e girassol (*Helianthus annuus*), em sistema agroecológico de produção, além de melhor aproveitar o solo nos três primeiros meses da cultura, favorece muito a retenção de umidade no solo, além de proporcionar redução dos efeitos erosivos [9, 10].

3. Melhoramento da planta e Biologia molecular

Os programas de melhoramento são importantes, pois conseguem assegurar espécies de plantas resistentes a pragas, doenças e tolerância à seca [11], biofortificadas [12] e com elevado conteúdo de beta-caroteno [13].

Por reunirem constituições genéticas de diferentes origens e de diferentes níveis de melhoramento, os bancos de germoplasma podem constituir-se em ótimas fontes de genes para

programas de melhoramento. Para tanto, é fundamental que o melhorista conheça o germoplasma disponível em relação à variabilidade e ao desempenho agrônomo [14].

A diversidade genética da mandioca existente no Brasil representa uma ampla base genética para programas de melhoramento genético com a cultura em todo o mundo tropical, por concentrar genes que lhes conferem resistência as principais pragas e doenças que afetam o cultivo, além de adaptação a diferentes condições edafo-climáticas [15]. Dentro da espécie *Manihot esculenta* já foi identificada diversidade genética para quase todos os caracteres estudados, incluindo aqueles de natureza morfológica, agrônoma, de resistência às principais pragas e doenças e de qualidade [16].

No semiárido Nordeste a diversidade genética da mandioca, assim como de outras espécies, surpreende e é alvo de investimentos em programas de conservação e melhoramento das plantas que duram muitos anos [17, 10], permitindo a escolha de materiais mais adaptados para os diversos fins.

Trabalhos de pesquisa e revisões [18], onde os autores conseguiram identificar ESTs (sequência genética expressa) de mandioca é um recurso valioso para o estudo da diversidade genética, resistência ao estresse, crescimento e desenvolvimento, não só na mandioca, mas também outros membros da família Euphorbiaceae. Enquanto estes trabalhos não chegam a resultados mais conclusivos pode-se alertar para manejo mais adequados, principalmente em áreas como no semiárido onde até mesmo a água de poços, por exemplo, surge como um material relevante no sistema de produção e precisa ser utilizada com bastante atenção. Em algumas situações mesmo tendo acesso apenas a água com níveis razoáveis de sais, é possível proceder o manejo da cultura da mandioca de forma satisfatória (Figura 2), bastando observar as doses de água e o solo e a drenagem da área.



Figura 2. Área de mandioca cultivada com água de poço na comunidade Caiçara, Petrolina-PE.

4. As variedades e os descritores morfológicos

A produtividade e a qualidade dos derivados de mandioca são dependentes da capacidade produtiva e das características do material genético utilizado. Todavia, o sucesso da atividade depende do manejo correto da cultura, utilizando práticas e insumos que permitam que a variedade expresse todo potencial produtivo [19]. Alguns de seus genótipos se adaptam melhor que outros para produção de raízes e parte aérea, mesmo em regiões semiáridas [9], porém as condições edafoclimáticas dessas regiões muitas vezes restringem o crescimento e produção.

O uso das raízes das diversas variedades de mandioca é conhecido em todas as regiões do Brasil, tanto para a indústria, transformada em fécula, povilho, farinha, etc., quanto para mesa, utilizada na forma cozida ou no preparo das mais variadas receitas doces e salgadas [20].

Existem variedades de mandiocas adaptadas a cada região brasileira, seu cultivo vai depender principalmente de fatores como clima e solo. A espécie é cultivada de Norte a Sul do Brasil, revelando grande plasticidade genética, capacidade de adaptação a diferentes condições climáticas e rusticidade [21].

As variedades mais plantadas de mandioca na região do Vale do São Francisco são as Recife (TSA 138) e Brasília (TSA128) tidas como cultígenos, isto é, são conhecidas sempre em seu estado de cultivo [22] e, a Engana Ladrão (BGM 1269) que possui esse nome por ser fenotípicamente parecida com as variedades de mesa. Apresenta produtividade de raízes e parte aérea superior a outras variedades [9] e alto teor de HCN em todas as partes da planta.

As variedades Recife e Brasília tem suas raízes destinadas principalmente ao consumo humano, são identificadas como mandiocas de mesa, suas ramas são aproveitadas para a alimentação animal, visto que o teor de HCN presentes tanto nas folhas quanto nas raízes está abaixo de 50 mg/kg. Já a variedade Engana Ladrão é utilizada principalmente para produção de farinha, consumo animal após secagem das partes da planta, pois apresenta níveis altos de HCN acima de 100 mg/kg de polpa fresca.

Para caracterizar essas variedades existe a necessidade de buscar ferramentas que as diferencie tanto geneticamente quanto fenotipicamente. Na Figura 3 tem-se exemplo da diversidade que existe entre as variedades de mandioca, principalmente utilizadas na região semiárida, reforçando mais ainda a variedade de características que podem estar associadas as diferentes variedades.

Os descritores morfológicos são utilizados para caracterizar e identificar as plantas presentes nos bancos de germosplasmas distribuídos em todo país. Os principais descritores

utilizados na caracterização de plantas de mandiocas são, cor da folha apical, forma do lóbulo central, cor do pecíolo, cor do córtex do caule, cor externa do caule, cor externa da raiz, cor do córtex da raiz, cor da polpa da raiz, cor da folha desenvolvida, número de lóbulos, cor da epiderme do caule, hábito de crescimento do caule, cor dos ramos terminais nas plantas e hábito de ramificação [23].

Estes descritores podem não ter necessariamente aplicação direta no melhoramento genético, porém permitem identificar e diferenciar os acessos no campo [23] e são importantes na descrição e interpretação fenotípica dos acessos duplicados na coleção, e os caracteres agrônômicos para a seleção de variedades com potencial de uso a curto prazo pelos agricultores ou para uso como parentais em trabalhos de cruzamentos [24, 15].

A caracterização e avaliação através de características qualitativas e quantitativas, associado ao uso conjunto dos métodos de agrupamento, servem de suporte para trabalhos de melhoramento mais eficientes [25].

De acordo com [26] os acessos de mandioca do Brasil estão distribuídos em sete bancos ativos de germoplasma regionais, localizados na Amazônia (Oriental e Ocidental), Tabuleiros Costeiros, Semiárido, Cerrados, Subtrópico e em Campinas-SP. Apesar da reconhecida variabilidade genética existente nesses bancos, o germoplasma de mandioca tem sido pouco estudado, sob o ponto de vista genético.

Os caracteres morfológicos não são eficientes na diferenciação entre mandiocas mansas e bravas [14]. As mandiocas consideradas bravas são aquelas que apresentam nas raízes acima de 100mg/kg de ácido cianídrico, enquanto as mansas são as que possuem abaixo desse conteúdo. Essa análise só pode ser feita em laboratório, e é muito útil para diferenciar os tipos de raízes, mantendo maior segurança na escolha de variedades aptas ao consumo humano.

Apesar da escolha da variedade depender muito das condições edafoclimáticas locais e da preferência dos consumidores, atualmente algumas características destacam-se em diversas variedades e valorizam mais amplamente seu uso como, por exemplo, a quantidade de amido. Essa característica, que não se relaciona com os descritores principais da planta, pode ser verificada por métodos simples e favorecem a escolha de materiais que tenham maior rendimento nas fecularias e moinhos, por exemplo.

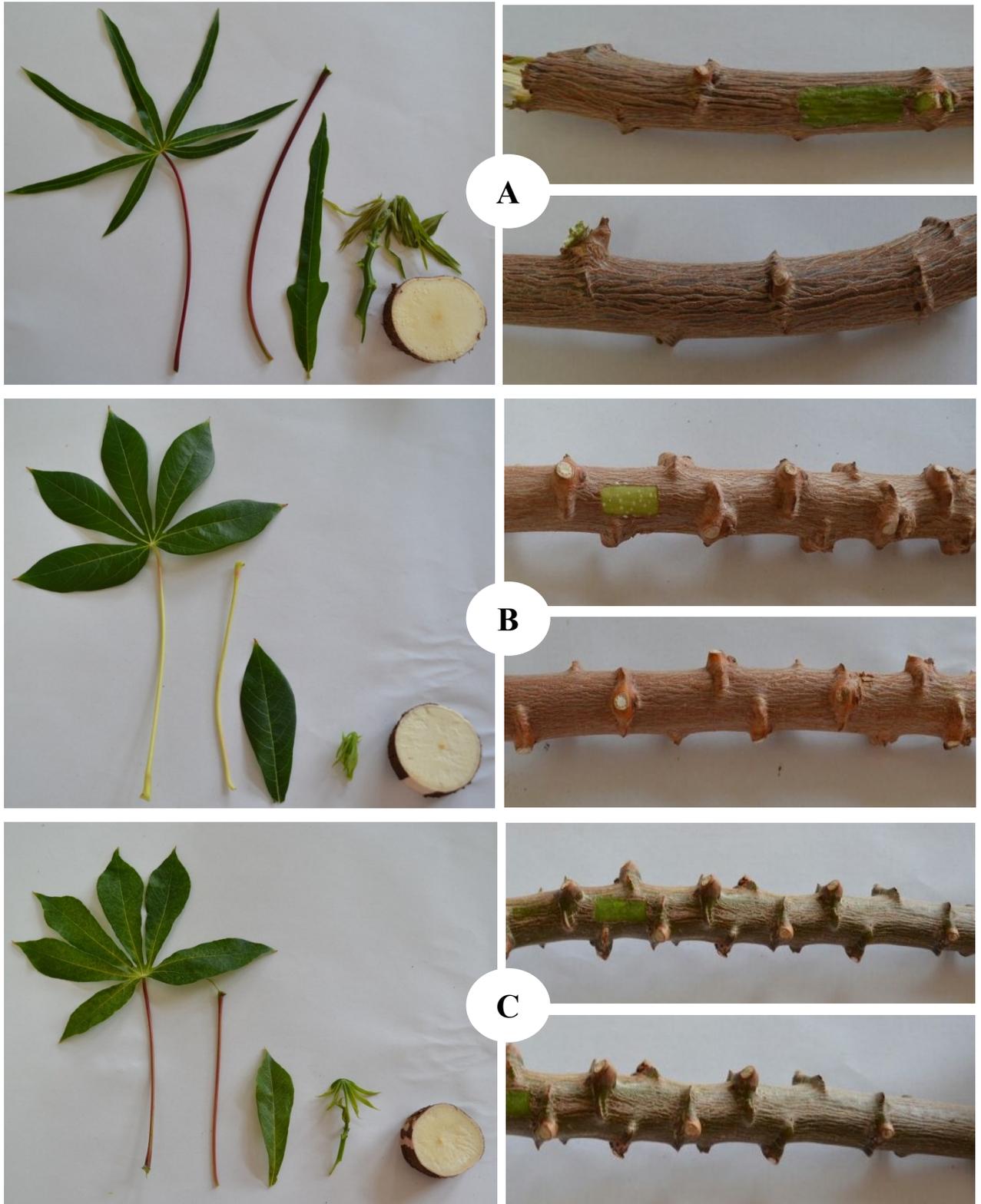


Figura 3. Características morfológicas com base nos descritores principais de *Manihot esculenta* Crantz, cultivar Brasília (A), Recife (B) e Engana Ladrão (C) coletadas no Campo Experimental da Embrapa Semiárido, Petrolina-PE. 2017. Detalhe, na coluna da direita, para a cor do córtex do caule (acima) e externa do caule (abaixo).

5. Teor de Ácido Cianídrico

A mandioca é uma planta cianogênica, isto é, contém compostos cianídricos, comumente chamados de cianoglicosídeos, e enzimas capazes de degradar esses compostos e liberar ácido cianídrico (HCN), que é o princípio tóxico dessa planta [19].

Quanto ao seu potencial tóxico, as mandiocas podem ser classificadas em: inofensivas ou mansas (menos do que 50 mg HCN/Kg raízes frescas), moderadamente venenosas (entre 50-100 mg HCN/Kg de polpa fresca), e perigosamente venenosa, popularmente conhecida como mandioca brava (acima de 100 mg HCN/Kg) [27, 28].

Entre os glicosídeos cianogênicos presentes, o mais abundante é a linamarina (85%), produzida nas folhas e transportada até as raízes e que, em contato com a enzima linamarase, libera (HCN) [29]. Isto proporciona um sistema de dois componentes que é ativado por rompimento celular (por exemplo, durante processamento de alimentos ou pela mastigação de insetos). A cianidrina formada pela ação da β -glucosidase subsequentemente dissocia-se em uma cetona e HCN tóxico [30, 31].

A concentração dos glicosídeos cianogênicos é variável nas diferentes espécies de plantas, e numa mesma espécie varia dependendo do clima e outras condições que influenciam o crescimento da planta como adubação nitrogenada, deficiência de água e idade da planta, pois quanto mais nova e de crescimento rápido, maior será o seu teor em glicosídeos cianogênicos [32]. Autores [33], trabalhando com a cultivar Aciolina, identificaram que o aumento de doses de nitrogênio proporciona aumento de forma quadrática dos teores de HCN nos tecidos da planta de mandioca. Esses mesmos autores encontraram ainda que os teores de nitrogênio reduzem com a idade da planta e variam nas diversas partes desse vegetal, sendo que é no córtex da raiz onde são encontradas as maiores concentrações de HCN.

Os compostos cianogênicos estão relacionados com a defesa da planta contra o ataque de insetos herbívoros [34]. Algumas variedades possuem menores concentrações de compostos cianogênicos e por isso são utilizadas em inúmeras formas de aproveitamento [24] sem a preocupação com esse composto que pode ser tóxico para os animais e ao próprio homem.

As raízes de mandioca possuem composição química variada, conforme as diversas variedades, destacando-se a presença de potássio, cálcio, magnésio e os altos conteúdos de amido que conferem a essa espécie a condição de produto amiláceo na alimentação humana e fonte de carboidrato (energético) se usada na composição de ração para os animais.

6. Aproveitamento: Alimentação humana e animal

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) pode ser destinada ao consumo humano e animal (ruminantes e herbívoros não ruminantes), podendo-se aproveitar as raízes, excelente fonte de energia, as ramas (parte aérea), ricas em proteína, e os subprodutos da industrialização [36].

Uma das formas mais comuns de aproveitamento das raízes de mandioca é na fabricação de farinha seca torrada. No Brasil existem as mais diversas formas de industrialização das raízes, das maiores, com capacidade de processamento de milhares de toneladas/dia, até as artesanais que funcionam sazonalmente em períodos de safras com mão de obra familiar. Esses ambientes são conhecidos como casas de farinha, muito comuns no interior do Nordeste e além do processamento das raízes para o preparo da farinha torrada, abrigam diversos costumes e tradições desse.

Atualmente com o grande apelo midiático e médico mundial por uma alimentação mais saudável baseada em alimentos funcionais, a mandioca tem ocupado um espaço considerável na mesa das pessoas bem como nas prateleiras dos supermercados, principalmente por ser um componente que participa de pratos doces, salgados e neutros e atende aos paladares mais exigentes, inclusive das pessoas que tem intolerância ao glúten. Esse aspecto, associado a versatilidade das raízes da mandioca, permite aos celíacos uma gama enorme de opções para suprir suas refeições com pratos saborosos e sem glúten.

A parte aérea das euforbiáceas pode ser uma alternativa para aumentar a viabilidade econômica e a produtividade da pecuária dessa região durante o período crítico, visto que possuem alto valor nutritivo e boa aceitabilidade pelos animais. Devem ser fornecidas na forma de feno ou silagem, para maior período de utilização e para evitar problemas de intoxicação com glicosídeos cianogênicos. Para o preparo de feno ou raspas das raízes as comunidades utilizam terreiros construídos para esta finalidade (Figura 4). Normalmente esses locais são de uso comum, e a associação de moradores ou produtores local trata da administração do uso. Além da secagem de material proveniente do mandiocal esses terreiros de secagem também servem para outras atividades sendo algo muito útil nas comunidades carentes do semiárido.

Mesmo em ambiente semiárido é possível alcançar produtividade satisfatória de parte aérea e raízes de mandioca se forem tomadas algumas medidas de correção do solo, caso este possua acidez elevada e ou adição de resíduos orgânicos encontrados localmente, favorecendo substancialmente a disponibilidade de nutrientes e conservação do solo [37]. O estudo de [9] conseguiram mostrar produtividades maiores que o dobro da média nordestina na região de Acauã, com práticas simples e variedades mais adaptadas aquela região, o que é uma opção para alimentação dos animais, principalmente com uso da parte aérea.



Figura 4. Terreiro de secagem de raspas de raízes ou parte aérea de mandioca. Petrolina-PE.

Diversas culturas além da mandioca têm sido vistas como alternativas forrageiras para a região semiárida do Nordeste do Brasil, principalmente tendo em vista o crescimento exponencial do rebanho caprinovino nos últimos anos. A facilidade de criação de caprinos e ovinos diante da condição climática que favorece a sanidade animal atrelada aos fatores econômicos como mercado crescente para a carne caprinovina são algumas das razões para o aumento do rebanho nos últimos anos.

A utilização da parte aérea da mandioca na alimentação animal justifica-se ainda pelo elevado teor protéico, boa produção de forragem e necessidade de aproveitar subprodutos agrícolas não utilizados na alimentação humana [6].

7. Pragas e Doenças

Além das formigas e dos cupins, as pragas mais comuns na cultura da mandioca são: mandarovás, ácaros, cochonilhas, percevejos-de-renda, tripes, moscas-brancas, moscas do broto, brocas do caule e escamas [38].

O mandarova é um dos insetos-praga mais importante desta cultura, devido ao sério desfolhamento que pode causar com a consequente diminuição nos rendimentos. Altas populações deste inseto podem desfolhar rapidamente grandes extensões de plantio. Quando o desfolhamento ocorre durante os primeiros meses do cultivo há uma redução nos rendimentos e as plantas jovens podem morrer [39].

O ácaro verde reside e alimenta-se de folhas jovens e hastes verdes das plantas de mandioca (Figura 5 A) e aumenta a sua densidade de população durante os estágios de transição [40] evidenciado por pontuações amareladas nas folhas, o que ocasiona desenvolvimento de ramos deficientes (Figura 5B).

Segundo [41] as cochonilhas são especializadas e sua aparência não lembra um inseto (Figura 5C), tomam um formato de escamas e geralmente se aderem às plantas causando encarquilhamento das folhas (Figura 5D), além de se alimentarem até completar a fase adulta.

Na Ásia uma das maiores preocupações é com a praga causada pelo inseto *Phenacoccus manihoti*, ele provoca graves distorções de brotos terminais, amarelecimento e ondulação de folhas, entrenós reduzidos, baixa estatura, e enfraquecimento das hastes usadas para a propagação da cultura [42].

As principais doenças que ocorrem nas culturas de mandioca no Brasil podem ser causadas por: fungos (antracnose, superalongamento, podridão de raízes, cercosporiose, ferrugem); bactérias (fitoplasma-bacteriose, superbrotamento, podridão de hastes, filodia); vírus (mosaicos) e protozoários (chochamento) [38].

A podridão radicular é uma das doenças de maior importância na cultura da mandioca na região Nordeste do Brasil, e pode ser atribuída a muitos patógenos, incluindo fungos como *Fusarium* sp. A busca de resistência a essa doença é sempre um dos principais objetivos dos programas de melhoramento da mandioca em todo o mundo [43].



Figura 5. Presença (A) e sintomas de ácaro (B) e cochonilha (C e D) em folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz).

Referências

- [1]. Nassar, N.M.A. (2002). Cassava, *Manihot esculenta* Crantz, genetic resources: origin of the crop, its evolution and relationships with wild relatives. *Genet Mol Res.*; 31: 298-305.
- [2]. Crepaldi I.C (1992). Origem, evolução e geografia da mandioca: uma revisão. *Sitientibus*; 10: 89-94.
- [2]. Allem, A.C. (1994). The origin of *Manihot esculenta* Crantz (Euphobiaceae). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1994; 41: 133-150.
- [3]. Brown CH, Clement CR, EPPS P, Luedeling E, Wichmann S (2013). The Paleobiolinguistics of Domesticated Manioc (*Manihot esculenta*). *Ethnobiology Letters*; 4: 61-70.
- [3]. Nassar, N.M.A., Hashimoto, D.Y.C., Fernandes, S.D.C. (2008). Wild *Manihot* species: botanical aspects, geographic distribution and economic value. *Genetics and Molecular Research*; 7: 16-28.
- [4]. Ferreira, A.L., Silva, A.F., Pereira, L.G.R., Braga, L.G.T., Moraes, S.A., Araújo, G. G. L. (2009). Produção e valor nutritivo da parte aérea da mandioca, maniçoba e pornunça. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*; 10: 983-990.
- [5]. Silva, A.F., Oliveira, D.S., Santos, A.P.G., Santana, L.M., Oliveira, A.P.D. (2013). Comportamento de variedades de mandioca submetidas a fertilização em comunidades dependentes de chuva no semiárido brasileiro. *Rev. Bras. de Agroecologia*; 8: 221-235.

- [6]. Silva, A.F., Silva, M (2016). Agricultura no nordeste semiárido e os resíduos orgânicos aproveitáveis. Revista Equador, v. 5, p. 102-119;
- [7]. Silva, A.F., Santos, C.A.F., Araújo, F.P., Lima Neto, F.P., Moreira, J.N., Ferreira, M.A.J.F., Leão, P.C.S., Dias, R.C.S., Albuquerque, S.G. (2010). Recursos genéticos vegetais conservados na Embrapa Semiárido. In: SA, I. B.; SILVA, P. C. G. da. (Ed.). Semiárido brasileiro: pesquisa, desenvolvimento e inovação. Petrolina: Embrapa Semiárido. cap. 8, p. 274-315.
- [8]. Nassar, N.M.A. (2000). Wild cassava, *Manihot* spp.: Biology and potentialities for genetic improvement. Genetics and Molecular Biology; 23: 201-212. In: Abhary M, Siritunga D, Stevens G, Taylor NJ, Fauquet CM (2011). Transgenic Biofortification of the Starchy Staple Cassava (*Manihot esculenta*) Generates a Novel Sink for Protein. PLoS ONE; 6 : 1-9.
- [9]. Ferreira, F.C., Alves, E., Pestana, K.N., Junghans, D.T., Kobayashi, A.K., Santos, V.J., Silva, R.P., Silva, P.H., Soares, E., Fukuda, W. (2008). Molecular characterization of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) with yellow-orange roots for beta-carotene improvement. Crop Breeding and Applied Biotechnology; 8: 23-29.
- [10]. Vieira, E.A., Fialho, J.F., Silva, M.S., Fukuda, W.M.G., Faleiro, F.G. (2008). Variabilidade genética do banco de germoplasma de mandioca da Embrapa cerrados acessada por meio de descritores morfológicos. Científica; 36: 56-67.
- [11]. Fukuda, W.M.G., Costa IRS, Silva SO (2005). Manejo e Conservação de Recursos Genéticos de Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. EMBRAPA-CNPMPF; 4p. Circular Técnica, 74. (a)
- [12]. Fukuda, W.M.G. (1996). Banco de germoplasma de mandioca: manejo, conservação e caracterização. Embrapa-CNPMPF; 103 p. Documentos, 68.
- [13]. Antonio, R.P., Silva, A.F., Lira, I.C.S.A., Santos, J.D.S., Silva Neto, J.L., Santos, T.H.N. (2015). Banco Regional de Germoplasma de Mandioca do Semiárido do Nordeste do Brasil. In: II Simpósio da Rede de Recursos Genéticos Vegetais do Nordeste.
- [14]. Anderson, J.V, Delseny, M., Fregene, M.A., Jorge, V., MBA, C., Lopez, C., Restrepo, S., Soto, M., Piegu, B., Verdier, V., Cooke., R, Tohme, J., Horvath, D.P. (2004). An EST resource for cassava and other species of Euphorbiaceae. Plant Molecular Biology; 56: 527–539.
- [15]. Lorenzi, J.O. (2012). Mandioca. 2ª ed. Campinas, CATI; 129p. ilustr. 23 cm (Boletim Técnico, 245).
- [16]. Borges, M.F., Fukuda, W.M.G., Rossetti, A.G. (2002). Avaliação de variedades de mandioca para consumo humano. Pesq. agropec. bras.; 37 (11): 1559-1565.
- [17]. Vieira, E.A., Fialho, J.F., Faleiro, F.G., Bellon, G., Fonseca, K.G., Silva, M.S., Paula-Moraes, S.V., Carvalho, L. (2013). Caracterização fenotípica e molecular de acessos de mandioca de indústria com potencial de adaptação às condições do Cerrado do Brasil Central. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 34, n. 2, p. 567-582, mar./abr.
- [18]. Fukuda, W.M.G., Guevara, C.L. (1998). Descritores morfológicos e agronômicos para a caracterização de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). EMBRAPA-CNPMPF; 38 p. Documentos, 78.
- [19]. Santos, A.P.G., Silva, A.F., França, C., Oliveira, D.S., Santos, F. C.; Oliveira, A. (2010). Teor de ácido cianídrico em variedades de mandioca cultivadas. In: I Congresso brasileiro de recursos genéticos, 2010, Salvador. Bancos de germoplasma: Descobrir riqueza, garantir o futuro.
- [20]. Campos, A.L, Zacarias, A.J., Costa, D.L., Neves, L.G., Barelli, M.A.A., Sobrinho, S.P., Luz, P.B. (2010). Avaliação de acessos de mandioca do banco de germoplasma da UNEMAT Cáceres – Mato Grosso. Revista Tropica; 4: 44-54.
- [21]. Costa, M.R., Cardoso, E.R., Ohaze, M.M.M. (2003). Similaridade genética de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta*) por meio de marcadores RAPD. Ciênc. agrotec; 27: 158-164.

- [22]. Jansz, E.R., Uluwadugê, D.I. (1997). Biochemical aspects of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) with special emphasis on cyanogenic glucosides-A review. *J. Natn. Sci. Coun*; 25: 1-24.
- [23]. Cohen, K.O., Oliveira, S.S., Chisté, R.C. (2007). Quantificação de teores de compostos cianogênicos totais em produtos elaborados com raízes de mandioca. *Embrapa- Amazônia Oriental*, 23p. Documentos, 290.
- [24]. EMBRAPA (2011). Mandioca no Cerrado: orientações técnicas / editores técnicos, Josefino de Freitas Fialho, Eduardo Alano Vieira. – Planaltina, DF : Embrapa Cerrados, 208 p.
- [25]. Jørgensen, K., Morant, A.V., Morant, M., Jensen, N.B., Olsen, C.E., Kannangara, R., Motawia, M.S., Møller, B.L., Bak, S. (2011). Biosynthesis of the Cyanogenic Glucosides Linamarin and Lotaustralin in Cassava: Isolation, Biochemical Characterization, and Expression Pattern of CYP71E7, the Oxime-Metabolizing Cytochrome P450 Enzyme. *Plant Physiology*; 155: 282–292.
- [26]. Lima Júnior, D.M., Monteiro, P.B.S., Rangel, A.H.N., Maciel, M.V., Oliveira, S.E.O., Freire, D.A. (2010). Fatores anti-nutricionais para ruminantes. *Acta Veterinaria Brasilica*; 3: 132-143.
- [27]. Oliveira, N.T., Uchôa, S.C.P., Alves, J.M.A., Sedyama, T., Albuquerque, J.A.A., Souza, E.D., Melville, C.C. (2012). Ácido cianídrico em tecidos de mandioca em função da idade da planta e adubação nitrogenada. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*; 47 (10): 1436-1442.
- [28]. Fürstenberg-Hägg, J., Zagrobelny, M., Bak, S. (2013). Plant Defense against Insect Herbivores. *Int. J. Mol. Sci*; 14: 10242-10297.
- [29]. Silva, J., Ferreira Filho, J.R. (2007). Produção de biomassa de mandioca. *EMBRAPA-CNPMF*; 2 p. Documentos, 34.
- [30]. Silva, J., Ferreira Filho, J.R. (2007). Produção de biomassa de mandioca. *EMBRAPA-CNPMF*; 2 p. Documentos, 34.
- [31]. EMBRAPA (2005). Mandioca: o pão do Brasil. Brasília (DF): Embrapa; 284p.
- [32]. Farias, A.R.N., Ezeta, F.N., Dantas, J.L.L. (1980). O mandarová da mandioca. *Embrapa-CNPMF*. 12p. Circular técnica, 5.
- [33]. Onzo, A., Hanna, R., Sabelis, M.W. (2005). Biological control of cassava green mites in Africa: impact of the predatory mite *Typhlodromalus aripo*. *Entomologische Berichten*; 65: 2-7.
- [34]. Oliveira, C.M., Fialho, J.F., Fontes, J.R.A. (2005). Bioecologia: disseminação e danos da cochonilha-das-raízes da mandioca *Protortonia navesi* Fonseca (Hemiptera: Margarodidae). 29 p. Documentos 142.
- [35]. Parsa, S., Kondo, T., Winotai, A. (2012). The Cassava Mealybug (*Phenacoccus manihoti*) in Asia: First Records, Potential Distribution, and an Identification Key. *PLoS ONE*; 10: 1-11.
- [36]. Silva, H., Oliveira, S., Haddad, F. (2011). Uso de imagens digitalizadas em metodologias de seleção para resistência à podridão radicular de mandioca - Dados eletrônicos. *Embrapa-CNPMF. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, 54.

3.2 BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE *MANIHOT ESCULENTA* CRANTZ (MANDIOCA): ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

ARTIGO A SER ENVIADO E TRADUZIDO PARA O PERIÓDICO: **MICROBIOLOGICAL RESEARCH.**



Bactérias endofíticas de *Manihot esculenta* Crantz (Mandioca): isolamento, caracterização e atividade antimicrobiana

Carla Regine Reges Silva França¹, Wagner Pereira Félix², Paulo Ivan Fernandes Júnior³, Carlos Alberto Tuão Gava³ e Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho¹

1 Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, UFPE-Universidade Federal de Pernambuco, Recife-Pe, Brasil.

2 Departamento de Zootecnia, Laboratório de Bioquímica, Univasf-Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina-Pe, Brasil.

3 Embrapa Semiárido, Petrolina-Pe, Brasil.

Resumo

As bactérias endofíticas são aquelas que são conhecidas por colonizarem as estruturas internas de plantas sem ocasionarem danos. O objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade de bactérias endofíticas isoladas nos tecidos de plantas de mandioca (*M. esculenta*), bem como testar suas atividades antimicrobianas. Para o estudo das bactérias endofíticas foram utilizadas duas cultivares de mandiocas, Recife e Engana Ladrão. Os isolados oriundos das partes das plantas (folha, caule, ramos primários, ramos secundários, raiz, raiz de absorção) e, também amostras da rizosfera das plantas foram inoculados em meios específicos (NA-azida, NA, ACA e NYSM, os três últimos suplementados com nistatina) à temperatura de 28°C. Nos resultados não foram observadas diferenças significativas entre os meios de culturas utilizados na quantidade de bactérias isoladas. Sobretudo, a frequência de bactérias foi maiores nas raízes e menores nos ramos secundários, nas duas cultivares analisadas. As colônias isoladas foram caracterizadas fenotipicamente. A população de bactérias encontradas nas duas cultivares de mandioca apresentou variação. De maneira geral, as duas cultivares mostraram colonização por bactérias endofíticas dos gêneros: *Curtobacterium*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Kosakonia*, *Rhizobium*, *Pantoea*, *Cronobacter*, *Bacillus*, *Microbacterium* e *Stenotrophomonas*. Os gêneros *Pantoea*, *Cronobacter* foram encontrados somente na cv. Recife e os *Microbacterium* e *Stenotrophomonas* na cv. Engana Ladrão. O gênero *Pseudomonas* mostrou-se o mais representativo para as duas cultivares de mandioca. No ensaio de atividade antimicrobiana foi detectada atividade inibitória entre as bactérias testadas das duas cultivares selecionadas e fungos patogênicos (*Lasiodiplodia theobromae*, *Neofusicoccum parvum*, *Botryosphaeria*

dothidia e *Colletotrichum dianesii*) variando a frequência de inibição, isso possibilita indicar estas bactérias como um excelente potencial de uso para o controle biológico.

Palavras- chave: endofíticos, bactérias, diversidade e antibiose.

Introdução

As interações plantas/micro-organismos têm recebido maior atenção nos últimos anos. Além das interações patogênicas, que podem causar prejuízos ao desenvolvimento, outras formas de interação podem ser neutras ou até mesmo benéficas. Uma grande diversidade de microrganismos tem sido identificada colonizando intimamente os mais diferentes órgãos e tecidos vegetais. Sua origem ainda resta a ser esclarecida, podendo ser oriunda do solo, água ou atmosfera, mas também podem levadas de uma geração a outra pelos órgãos propagativos. Esses micro-organismos são considerados endofíticos, geralmente fungos e bactérias que habitam o interior da planta sem causar danos aparentes ao hospedeiro (PEIXOTO NETO *et al.* 2002; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). São distintos dos epifíticos, que vivem na superfície dos órgãos e tecidos vegetais.

Embora tenham sido descritos a partir do século XIX, os micro-organismos endofíticos só receberam atenção há pouco mais de 20 anos, quando se verificou que eles possuem capacidade de proteger seus hospedeiros contra pragas e até herbívoros domésticos, como, por exemplo, ovinos e bovinos (AZEVEDO *et al.* 2000). Segundo SOUZA *et al.* (2004), os endófitos encontrados nos vegetais têm despertado o interesse da comunidade científica, especialmente por seus potenciais na produção de metabólitos de interesse econômico, incluindo os relacionados às plantas hospedeiras. Os gêneros de bactérias endofíticas habitualmente mais isolados incluem *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*, que tem sido obtidos uma diversidade de plantas cultivadas como mandioca (TEIXEIRA *et al.* 2007), banana (SOUZA *et al.* 2013), milho (PISARSKA e IETR, 2015), feijão (COSTA *et al.* 2012).

Seja pela incorporação de nutrientes, como o nitrogênio, ou pela produção de metabólitos antibióticos ou similares a hormônios vegetais, os micro-organismos endofíticos afetam o desenvolvimento vegetal e sua interação com o meio ambiente. Algumas destas características começaram a ser exploradas na produção agrícola, como a promoção de crescimento (BARRETTI *et al.* 2009; SILVA *et al.* 2009), solubilizam fosfatos (ASSUMPCÃO *et al.* 2009), fixação de nitrogênio (MOREIRA *et al.* 2010) e controle biológico (CHAURASIA

et al. 2005). A inibição de processos patogênicos pode ser feita por diferentes mecanismos de ação, tais como, síntese de substâncias antimicrobianas, competição por espaço e nutriente, secreção de enzimas líticas, alteração de pH e/ou síntese de compostos voláteis (GARCIA et al. 2013).

A promoção do crescimento das plantas por bactérias endofíticas pode ser resultante de ações indiretas, como por exemplo, a supressão de doenças, ou de ações diretas, como a produção de fitohormônios, fixação do N₂ atmosférico, solubilização de fosfatos minerais ou outros nutrientes do solo, oxidação do enxofre, aumento da permeabilidade das raízes e produção de sideróforos (TAN e ZOU, 2001). O mecanismo de promoção do crescimento vegetal por endófitos é, portanto, um processo complexo, que pode ser influenciado por diversos fatores bióticos e abióticos (BLOEMBERG e LUGTENBERG, 2001).

A mandioca (*M. esculenta*) é uma planta heliófita pertencente a família Euphorbiaceae, fonte de nutrientes e calorias para alimentação humana e animal. Todas as espécies de *Manihot* são nativas de regiões tropicais do Novo Mundo, particularmente no Brasil e no México (NASSAR et al. 2008; FERREIRA et al. 2009). Embora se conheça em profundidade a associação da mandioca com fungos micorrízicos, poucos estudos promoveram o isolamento de bactérias endofíticas, avaliando sua diversidade ou potencial biotecnológico. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar a diversidade de bactérias endofíticas isoladas nos tecidos de plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), bem como testar suas atividades antimicrobianas.

Metodologia

Coleta e armazenamento das plantas

Foram selecionadas duas variedades de mandiocas (*M. esculenta*): cultivar Recife e cultivar Engana Ladrão, coletadas aos 8 meses de desenvolvimento (período em que as plantas são coletadas para comercialização) no Banco de Germoplasma (BAG) da Embrapa Semiárido, Petrolina-Pernambuco (22°25'14"S, 47°15'52"W) mantidas no campo sobre sistema de irrigação. No local da coleta, foram retiradas três plantas em pontos diferentes do plantio.

As plantas foram levadas ao laboratório, lavadas com água corrente e, também com água destilada, fragmentadas em folhas, raízes, raízes de absorção, caule, ramos primários, ramos secundários, e mantidas por 24 horas em refrigerador 5° C para análises posteriores.

Desinfecção e Isolamento das Bactérias endofíticas

Foram utilizados folhas, raízes, raízes de absorção, caules, ramos primários, ramos secundários saudáveis de cada variedade, submetidos ao processo de desinfecção, segundo PEREIRA (1993). Além desses fragmentos uma porção do solo, referente à rizosfera foi coletada a fim de verificar as bactérias presentes nesta interface. Os materiais foram fragmentados (1 a 3cm), desinfestados e colocados sobre diferentes meios de cultura sólidos (ACA-Amido-Caseína-Ágar (KÜSTER e WILLIAMS, 1964); NA-Ágar nutriente- peptona de carne, NaCl, extrato de carne, extrato de levedura; NYSM- caldo nutriente, extrato de levedura, $MnCl_2$, $MgCl_2$, $CaCl_2$ (YOUSTEN, 1984)). Para cada parte das plantas e para cada planta foram feitas 3 repetições dos meios de cultura, com 7 fragmentos do tecido vegetal por placa.

Os meios de cultura ACA, NA e NYSM foram suplementados com 1.000 $\mu L mL^{-1}$ de fungicida nistatina 0,1g/L. No intuito de obter somente bactérias endofíticas gram positivas, foi elaborado um meio de cultura NA suplementado com 1.000 $\mu L mL^{-1}$ de azida 0,1g/L, perfazendo um total de quatro meios utilizados no experimento.

Em relação às amostras coletadas da rizosfera, após peneiramento, o solo foi pesado (1 g) e adicionado em 9 mL de NaCl 0,15 M, realizando sucessivas diluições seriadas até 10^{-7} . O volume utilizado no plaqueamento foi de 100 μL das diluições 10^{-5} e 10^{-7} para o isolamento das bactérias.

Todas as placas foram incubadas em estufas de laboratório à 28° C. Cada colônia isolada foi purificada por esgotamento por estrias, seguido do seu cultivo em tubos contendo o meio de cultura específico. Os isolados foram preservados com glicerol 20% em freezer. A avaliação do crescimento microbiano teve início após 24 horas de incubação e prosseguiu por um período de 15 dias.

Caracterização fenotípica dos isolados

As colônias isoladas foram observadas para as seguintes características: forma, tamanho, elevação, bordas, estrutura, brilho, cor, aspecto, muco, biofilme e pigmento no meio (Tabela 1). Essas características foram convertidas em dados binários empregados em análise de cluster usando o Stat Past como programa padrão.

Tabela 1. Características fenotípicas de bactérias endofíticas isoladas de plantas de mandioca.

Características	
Forma	Circular, irregular, rizóide, filamentosa e puntiforme
Elevação	Côncava, elevada, ondulada, protuberante, achatada e convexa
Bordas	Lisa, laceradas, lobadas, filamentosas e onduladas
Estrutura	Lisa, granulosa, filamentosa e rugosa
Brilho	Transparente, translúcida e opaca
Cor	Incolor e pigmentada
Aspecto	Viscosa, úmida, membranosa, leitosa, aveludada e algodonosa
Biofilme	Sim ou não
Pigmento no meio	Sim ou não

Em um primeiro procedimento as características morfológicas foram analisadas nos isolados para cada órgão estudado, resultando assim em 7 dendrogramas específicos. Após essa análise foram selecionados em torno de 10% dos isolados de cada chave nos órgãos, em um total de 103 isolados da cultivar Recife e 107 isolados da cultivar Engana Ladrão. Todas as bactérias que apareceram isoladas no dendrograma foram selecionadas. Com esses números de isolados foi feita uma nova seleção de 44 bactérias por cultivar para trabalhar com os testes de atividade antimicrobiana e apresentação das características fenotípicas e morfológicas.

Diversidade das Bactérias Endofíticas Isoladas

Com os dendrogramas finais das duas cultivares selecionadas, observou-se o agrupamento dos isolados em diferentes chaves. Com o intuito de verificar a diversidade das bactérias endofíticas em plantas de mandioca os isolados foram analisados a nível molecular.

Identificação das Bactérias em nível molecular

Extração de DNA

Os isolados foram inoculados em 5 mL de meio ágar nutriente líquido e incubados por 24-48 horas à 28°C. Após esse período, cada cultura bacteriana foi colocada em tubos de 1,5

ml, centrifugada por 3 min a 13000 rpm, e em seguida o sobrenadante foi descartado. O precipitado ressuspendido em 200 µl de solução de lise celular e incubado por 5 minutos a 80° Celsius. Posteriormente, adicionado 1 µl da solução de RNase, levados ao banho-maria por 20 minutos a 37° C e, após essa fase adicionou-se 67 µl da solução de precipitação de proteínas e com leve agitação em vórtex. As amostras foram incubadas por 5 minutos no gelo e centrifugadas por 3 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi transferido para tubo novo contendo 200 µl de álcool isopropílico, centrifugado por 3 min a 13000 rpm e descartando o sobrenadante. Em seguida, adicionou-se álcool 70% e centrifugou-se as amostras por 3 min, aspirar o álcool, deixar secar por 15 minutos e ressuspender com 50 µl da solução de reidratação do DNA, incubar por 60 minutos a 65° C e estocar as amostras a -20° Celsius.

PCR - 16S

O DNA extraído também foi submetido à reação de amplificação da região conservada 16S rRNA para estudos de taxonomia e filogenia, utilizando os primers 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') e 1492R (5'GGTTACCTTGTTACGACTT3') (HAYASHI et al. 2005). Após reação o produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,0% a 180 V, por 2 horas, em cuba da BioRad. As amostras foram coradas em solução corante contendo gel red e as bandas observadas em trans-iluminador com iluminação ultravioleta e fotografadas com câmera digital. Foi utilizado o marcador molecular de 1Kb como referência para as amostras.

Purificação das Amostras da PCR

Para a purificação, foi utilizado o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, da Amersham Biosciences – GE Healthcare, para a retirada de contaminantes como ácidos húmicos e restos celulares (proteínas, polissacarídeos e ácidos graxos) que podem prejudicar a amplificação do DNA genômico através de PCR. Após purificação as amostras foram encaminhadas para sequenciamento.

A sequência obtida a partir do sequenciamento do produto de amplificação foi comparada com todas as sequências no Ezbiocloud, banco de dados específico para Bactérias e Archaea, representada por sequências genéticas e genômicas do gene 16S rRNA, a construção das árvores filogenéticas foi realizada pelo software Mega.

Ensaio da atividade antimicrobiana em meio sólido

As 44 bactérias endofíticas isoladas das duas cultivares foram submetidas aos ensaios antimicrobianos em meio sólido, segundo a metodologia descrita por ICHIKAWA et al. (1971). Os meios de cultura utilizados nesse experimento foram ágar nutriente (NA, Difco) e batata-dextrose-ágar (BDA, Himedia), sem suplementação de agentes inibidores.

Os patógenos testados foram os fungos, *Lasiodiplodia theobromae*, agente casual da morte descendente, murcha, podridão basal de frutos, cancro de tronco e de ramos da mangueira (PEREIRA et al. 2006), *Neofusicoccum parvum* responsável pela queima dos botões florais, necroses em flores e frutos (BATISTA et al. 2012); *Botryosphaeria dothieia* promotor da murcha das folhas, seca de ramos e galhos, culminando com a necrose da planta (CHEN, 2011) e *Colletotrichum dianesii* responsável pela antracnose que incide em todos os órgãos das plantas (OJEDA et al. 2012), esses fungos tem como característica comum causar podridão pós-colheita na cultura da manga, que é uma das principais culturas cultivadas na região Vale do São Francisco.

Cada fungo foi cultivado em forma de “tapete” em placas de Petri com meio BDA, de 2 a 7 dias, a 30°C; em seguida, blocos de gelose de 5 mm de diâmetro foram retirados para o ensaio antimicrobiano. As bactérias selecionadas foram cultivadas em placas nos meios de cultura específicos, por 24 horas, a 30° Celsius.

As Bactérias isoladas foram riscados a uma distância de aproximadamente 3 cm do patógeno que foi colocado no centro da placa de Petri contendo meio de cultura específico para cada ensaio (BDA ou NA). Após 24 horas as primeiras leituras dos halos de inibição foram feitas, e essas leituras diárias foram até 15 dias de avaliação. Determinou-se a atividade antagônica pela mensuração da inibição do micélio do fungo patogênico em comparação com o controle que continha apenas o patógeno ao centro da placa.

Todos os testes foram realizados em triplicata e as médias obtidas posteriormente mensuradas. Para avaliar o potencial de inibição das bactérias endofíticas nos fungos patogênicos, calculou-se a porcentagem dos tratamentos pela fórmula: $I\% = [(C_i - T_i)/C_i] \times 100$, na qual C_i representa o crescimento radial do micélio do fungo i ; T_i é o crescimento radial do micélio do fungo i em cultivo pareado. Os dados obtidos foram transformados utilizando a equação $X'_{ij} = \arcseno \sqrt{X_{ij}/100}$, onde X_{ij} são os valores originais e X'_{ij} os valores transformados, e submetidos à análise estatística pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Resultados

Isolamento das Bactérias endofíticas

Um total de 802 bactérias foram isoladas de folhas, raízes, raízes de absorção, caules, ramos primários, ramos secundários e rizosfera das plantas de mandiocas. Destas 446 pertenciam a cv. Recife e 356 a cv. Engana Ladrão. Esses números de isolados foram obtidos a partir da visualização de colônias morfologicamente diferentes em cada fragmento. O número de isolados segundo os meios de cultivos utilizados são mostrados na Figura 1.

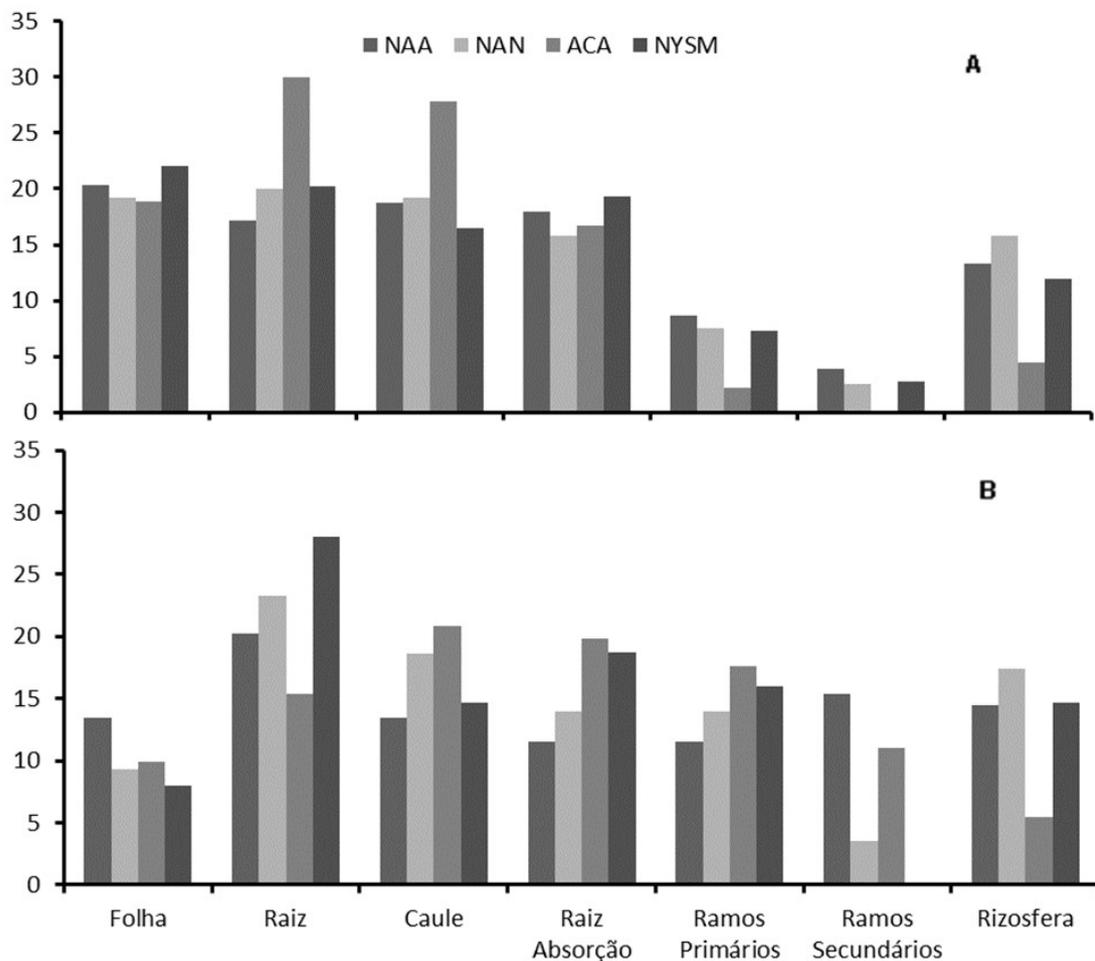


Figura 1. Número de bactérias endofíticas isoladas em relação aos meios de cultura utilizados. A- cultivar Recife e B- cultivar Engana Ladrão.

Não houve diferenças entre os meios de cultura utilizados na quantidade de bactérias isoladas (Figura 1). Já a frequência de bactérias foi maior nas raízes (Recife, 21,7%; Engana Ladrão, 21,5%) e menores nos ramos secundários (Recife, 2,5%; Engana Ladrão, 7,5%), nas duas cultivares analisadas (Figura 1).

Caracterização fenotípica dos isolados

Na caracterização fenotípica dos isolados, observou-se que grande parte das características se repetiam. Dessa forma, houve a necessidade de agrupá-los em um número menor para que as avaliações posteriores fossem realizadas (Figura 2).

Considerando as características fenotípicas (Tabela 2), para a cv. Recife a maioria dos isolados apresentaram forma irregular (52%), com elevação convexa (39%), bordas (41%) e estrutura lisas (52%), sendo translúcidas (61%), mas em alguns casos apresentaram coloração amarela, a maioria com aspecto viscoso (55%) e produção de biofilme (52%) e sem pigmentação no meio de cultura.

Da mesma forma comportou-se a cv. Engana Ladrão, forma-convexa (65%), com bordas (70%) e estrutura lisas (79%), translúcidas (61%), e em alguns casos tinham coloração amarela, a maioria com aspecto viscoso (55%) e produção de biofilme (52%), sem pigmentação no meio de cultura, modificando somente a forma de crescimento, puntiforme (49%).

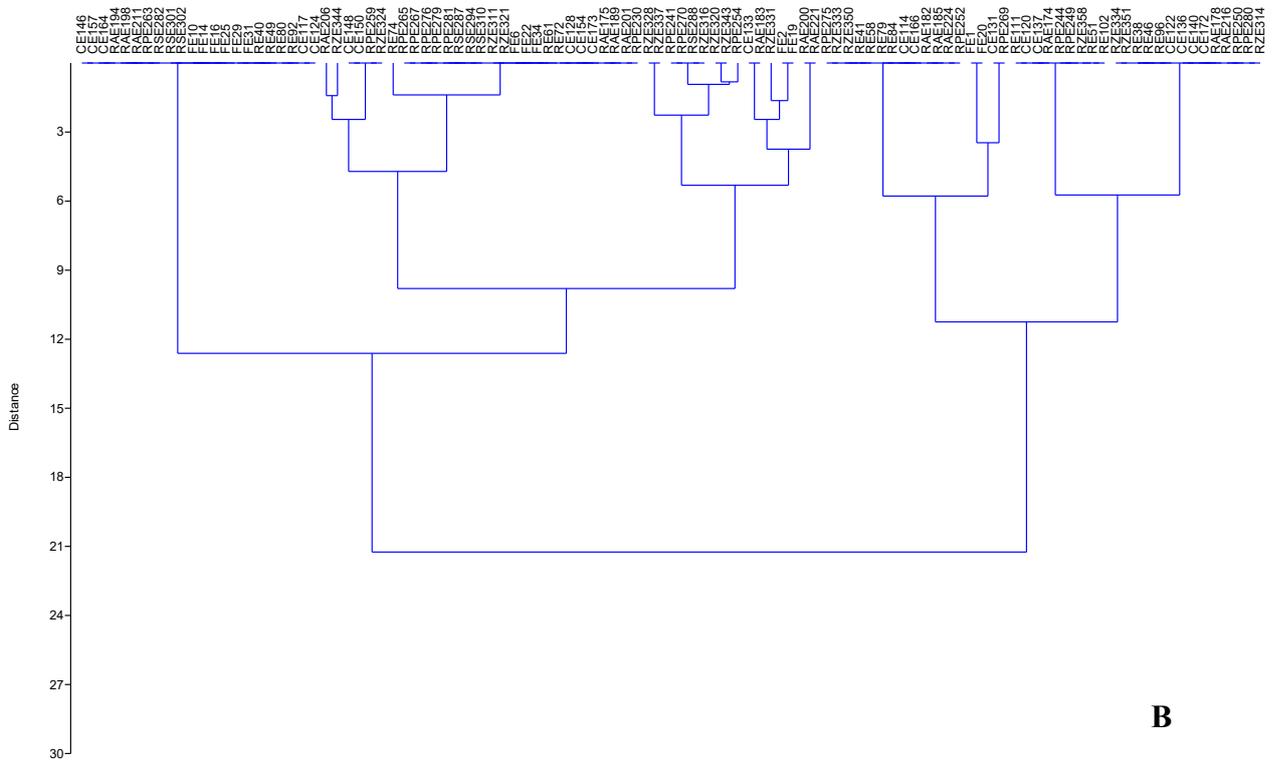
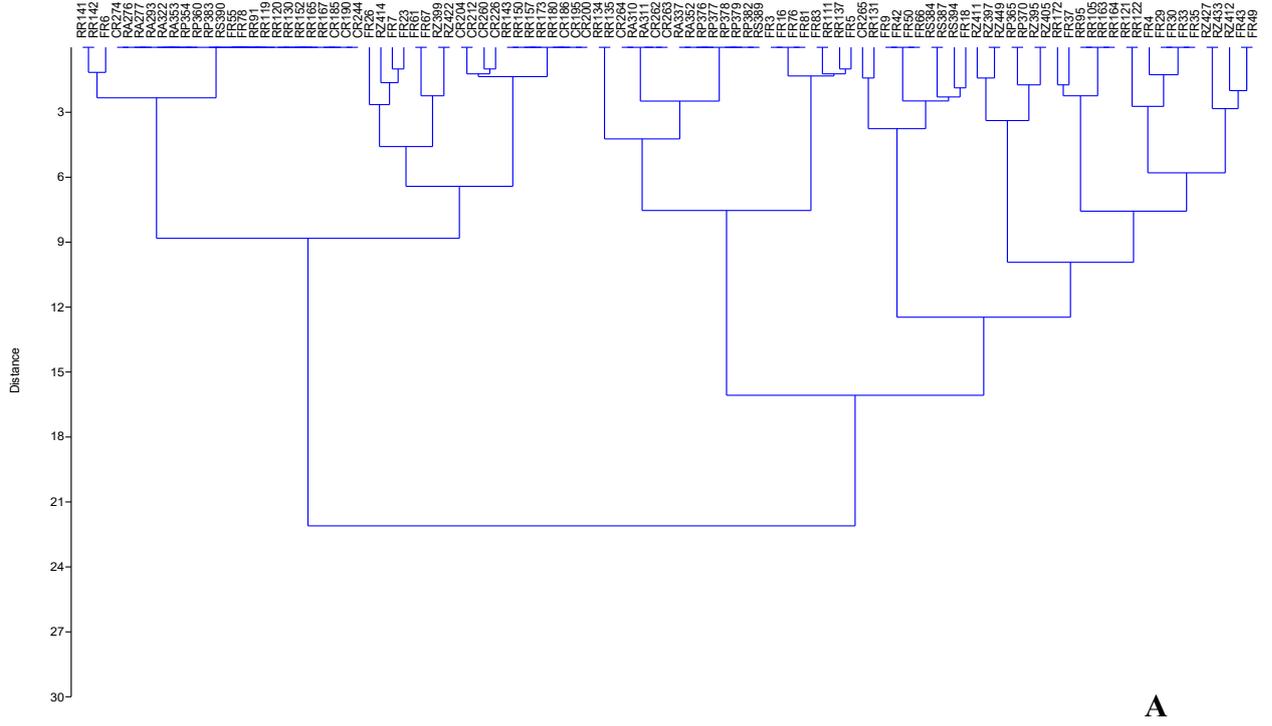


Figura 2. Dendrograma de similaridade baseados nas características fenotípicas entre as bactérias endofíticas isoladas de plantas de mandioca. A. Cultivar Recife (FR- folha, RR-raiz, CR-caule, RAR-raiz de absorção, RPR-ramos primários, RSR-ramos secundários e RZR-rizosfera) e B. Cultivar Engana Ladrão (FE- folha, RE-raiz, CE-caule, RAE-raiz de absorção, RPE-ramos primários, RSE-ramos secundários e RZE-rizosfera).

Tabela 2. Distribuição percentual dos isolados bacterianos de acordo com a caracterização fenotípica dos isolados endofíticos de mandioca utilizados no ensaio de atividade antimicrobiana

	Características (%)	
	Recife	Engana Ladrão
Forma	Circular (27), irregular (52), rizóide (2), filamentosa (2) e puntiforme (16)	Circular (21), irregular (21), rizóide (2), filamentosa (7) e puntiforme (49)
Elevação	Elevada (14), ondulada (18), protuberante (25), achatada (5) e convexa (39)	Côncava (2), elevada (16), ondulada (2), protuberante (7), achatada (9) e convexa (65)
Bordas	Lisa (41), laceradas (13), lobadas (7), filamentosas (2) e onduladas (36)	Lisa (70), laceradas (2), lobadas (7) e onduladas (21)
Estrutura	Lisa (52), granulosa (11), filamentosa (5) e rugosa (32)	Lisa (79), granulosa (2), filamentosa (2) e rugosa (16)
Brilho	Translúcida (61) e opaca (39)	Transparente (4), translúcida (63) e opaca (33)
Cor	Incolor (59) e pigmentada (41)	Incolor (40) e pigmentada (60)
Aspecto	Viscosa (55), úmida (25), membranosa (16) e leitosa (4)	Viscosa (53), úmida (40), membranosa (2) e leitosa (5)
Biofilme	Sim (52) e não (48)	Sim (14) e não (86)
Pigmento no meio	Sim (2) e não (98)	Sim (7) e não (93)

Diversidade das Bactérias Endofíticas em diferentes órgãos de mandioca

De acordo com os resultados obtidos do dendrograma com as características fenotípicas dos isolados, foram selecionados 22 isolados representantes dos agrupamentos morfológicos da cv. Recife e 44 representantes da cv. Engana Ladrão. As bactérias endofíticas foram sequenciadas na região 16S, sendo realizada busca por máxima identidade no programa EzBioCloud. A maioria das sequências geradas mostrou similaridade igual ou superior a 99% com sequências presentes no banco de dados.

Tabela 3. Principais gêneros de bactérias endofíticas encontradas em cultivares de mandioca.

Órgãos	Recife	Engana Ladrão
Folhas	<i>Curtobacterium</i>	<i>Bacillus</i> <i>Microbacterium</i>
Ramos Secundários	<i>Pseudomonas</i>	<i>Curtobacterium</i> <i>Pseudomonas</i>
Ramos Primários	<i>Curtobacterium</i> <i>Enterobacter</i> <i>Kosakonia</i>	<i>Bacillus</i> <i>Stenotrophomonas</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Microbacterium</i>
Caule	<i>Enterobacter</i>	<i>Rhizobium</i>

	<i>Rhizobium</i>	<i>Curtobacterium</i> <i>Bacillus</i> <i>Kosakonia</i> <i>Enterobacter</i>
Raiz	<i>Enterobacter</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Rhizobium</i> <i>Pantoea</i> <i>Cronobacter</i>	<i>Enterobacter</i> <i>Bacillus</i>
Raiz de Absorção	<i>Pseudomonas</i> <i>Enterobacter</i>	<i>Bacillus</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Stenotrophomonas</i>
Rizosfera		<i>Enterobacter</i> <i>Bacillus</i>

A população de bactérias encontradas nas duas cultivares de mandioca apresentou variação. De maneira geral, as duas cultivares mostraram colonização por bactérias endofíticas dos gêneros: *Curtobacterium*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Kosakonia*, *Rhizobium*, *Pantoea*, *Cronobacter*, *Bacillus*, *Microbacterium* e *Stenotrophomonas* (Tabela 3). Os gêneros *Pantoea*, *Cronobacter* foram encontrados somente na cv. Recife e os *Microbacterium* e *Stenotrophomonas* na cv. Engana Ladrão. O gênero *Pseudomonas* mostrou-se mais o representativo para as duas cultivares de mandioca.

Na construção das árvores filogenéticas com todas as sequências provenientes dos isolados de bactérias endofíticas houve a formação de quatro grupos diferentes para a cv. Recife (Figura 3) e seis grupos cv. Engana Ladrão (Figura 4). Esses dados não correspondem com os resultados dos dendrogramas das características fenotípicas e morfológicas, onde é observado que todas as bactérias endofíticas da cv. Recife se agruparam em uma mesma chave (Figura 2); enquanto as bactérias endofíticas sequenciadas da cv. Engana Ladrão formaram somente duas chaves principais com as características fenotípicas e morfológicas (Figuras 2). Observando as duas árvores filogenéticas, aparece uma inconsistência tanto para a cv. Recife, quanto para cv. Engana Ladrão. Na cv. Recife o grupo formado pelo gênero *Rizobium* (Prototeobactéria), se associa ao grupo formado pelo gênero *Curtobacterium* (Actinobactéria). Quando analisamos a cv. Engana Ladrão é notável, pois o grupo formado pelo gênero *Rizobium* (Prototeobactéria), se associa com dois grupos *Curtobacterium* e *Microbacterium* (Actinobactérias) e, *Bacillus* (Firmicutes).

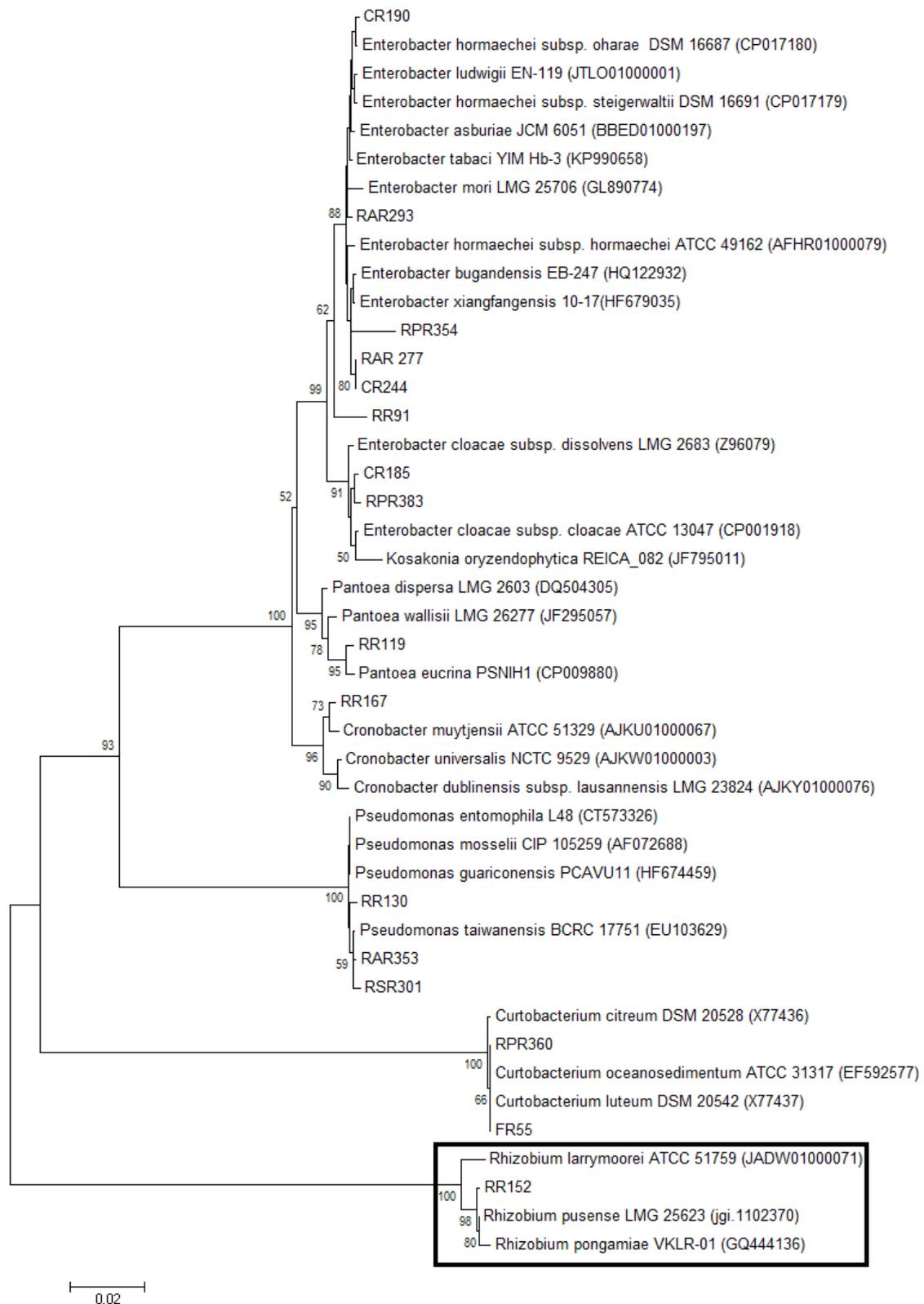
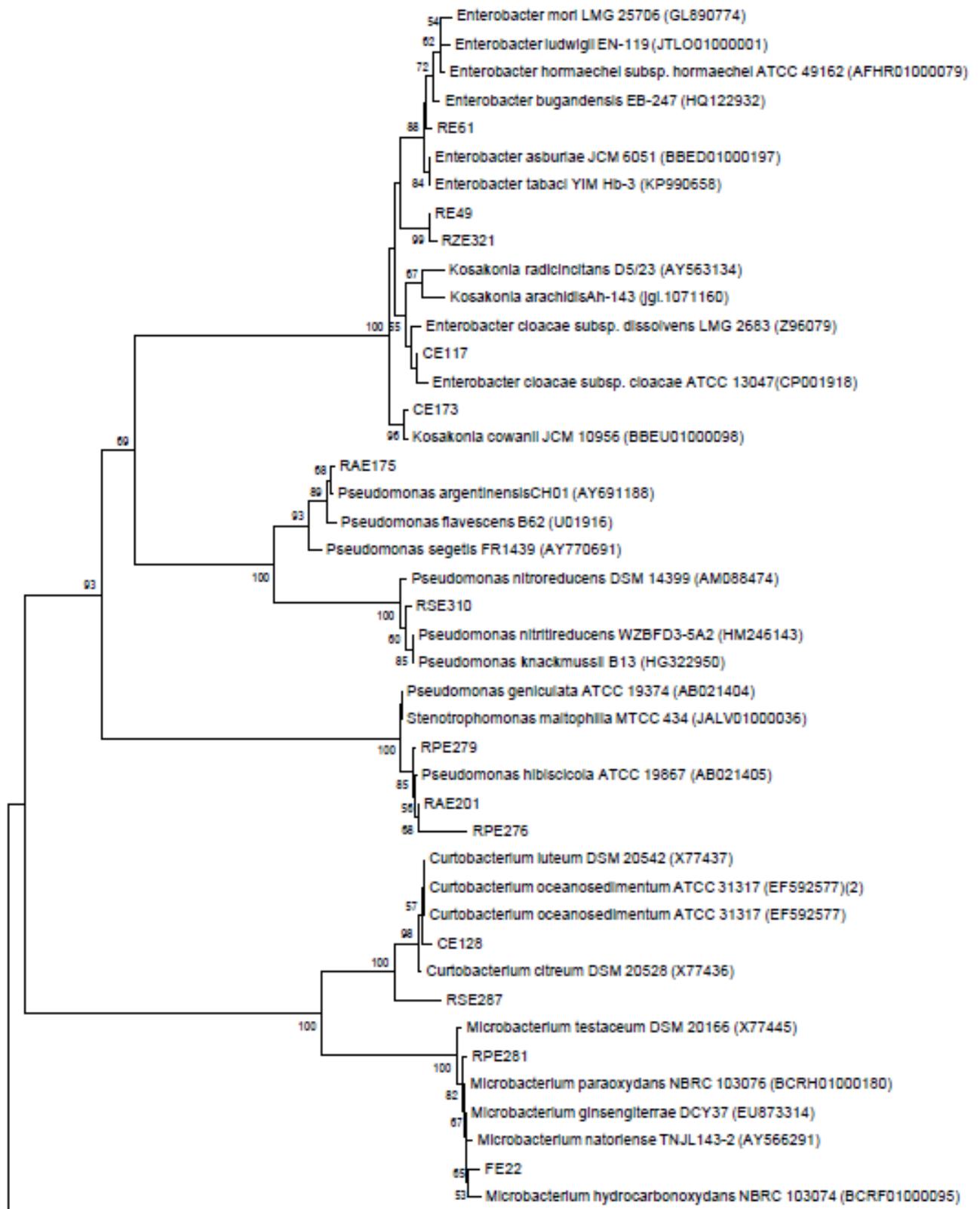


Figura 3. Dendrograma de similaridade de bactérias endofíticas isoladas de diferentes órgãos de plantas de mandioca cv. Recife por meio da técnica de 16S- rDNA. FR- folha, RR-raiz, CR-caule, RAR-raiz de absorção, RPR-ramos primários, RSR-ramos secundários e RZR-rizosfera.



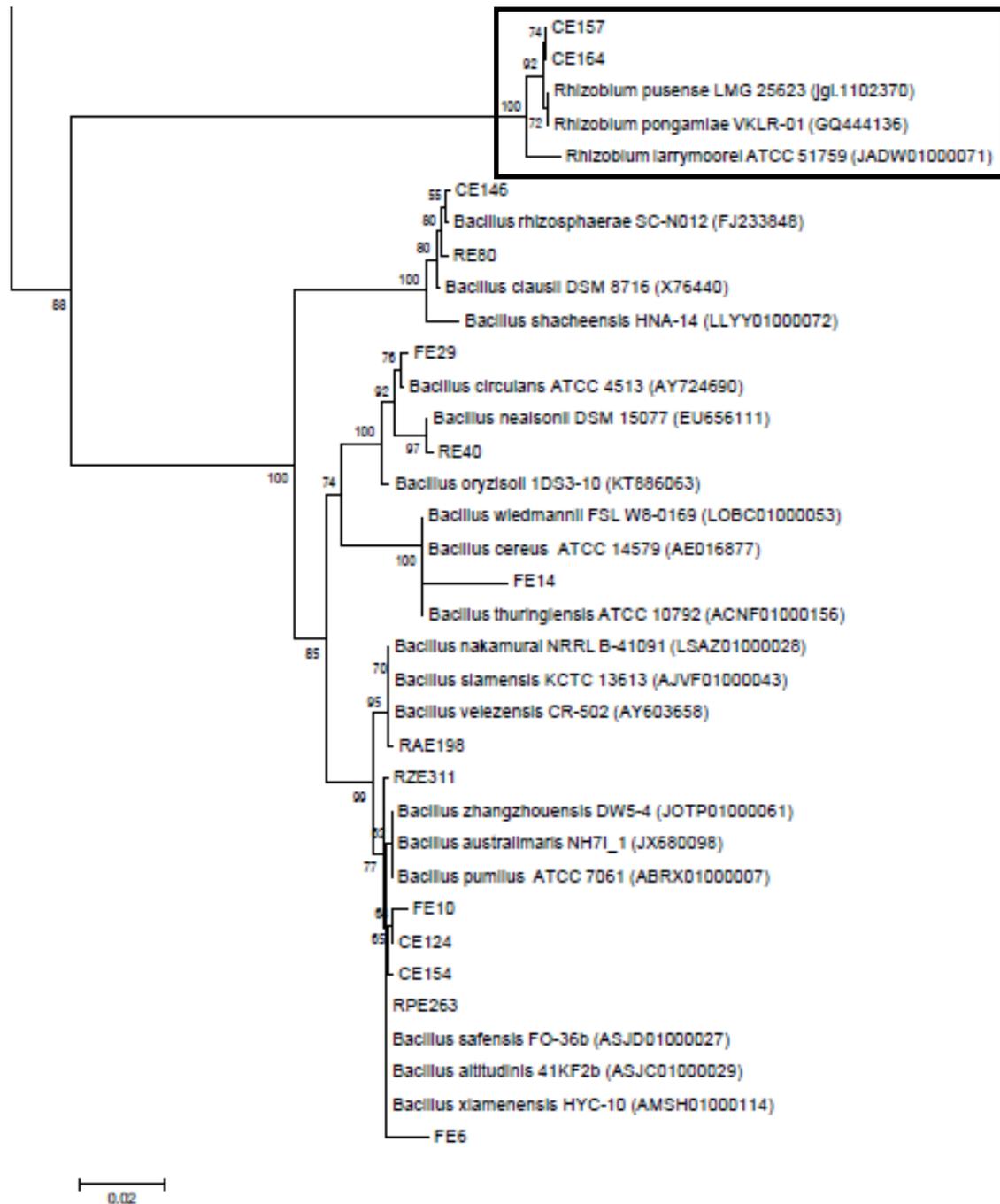


Figura 4. Dendrograma de similaridade de bactérias endofíticas isoladas de diferentes órgãos de plantas de mandioca cv. Engana Ladrão por meio da técnica de 16S- rDNA. FE- folha, RE-raiz, CE-caule, RAE-raiz de absorção, RPE-ramos primários, RSE-ramos secundários e RZE-rizosfera.

Ensaio da atividade antimicrobiana em meio sólido

Ao cultivar as bactérias endofíticas selecionadas em meios de culturas diferentes com cada patógeno testado, verifica-se que houve efeito do tipo de meio de cultura sobre a produção de metabólitos antifúngicos pelos isolados. No meio de cultura BDA a maioria das bactérias isoladas das duas cultivares não produziram metabólitos antibióticos capazes de inibir o desenvolvimento dos fungos (Figura 5). Comparando apenas os resultados obtidos com o

cultivo feito no meio de cultura NA, houve uma maior proporção de isolados da cv. Recife com halos de inibição em que houve redução do tamanho das colônias dos patógenos entre 21 e 40% para todos os patógenos. As bactérias endofíticas isoladas da cv. Engana Ladrão apresentam maior proporção de isolados com inibição na faixa entre 41 a 60%.

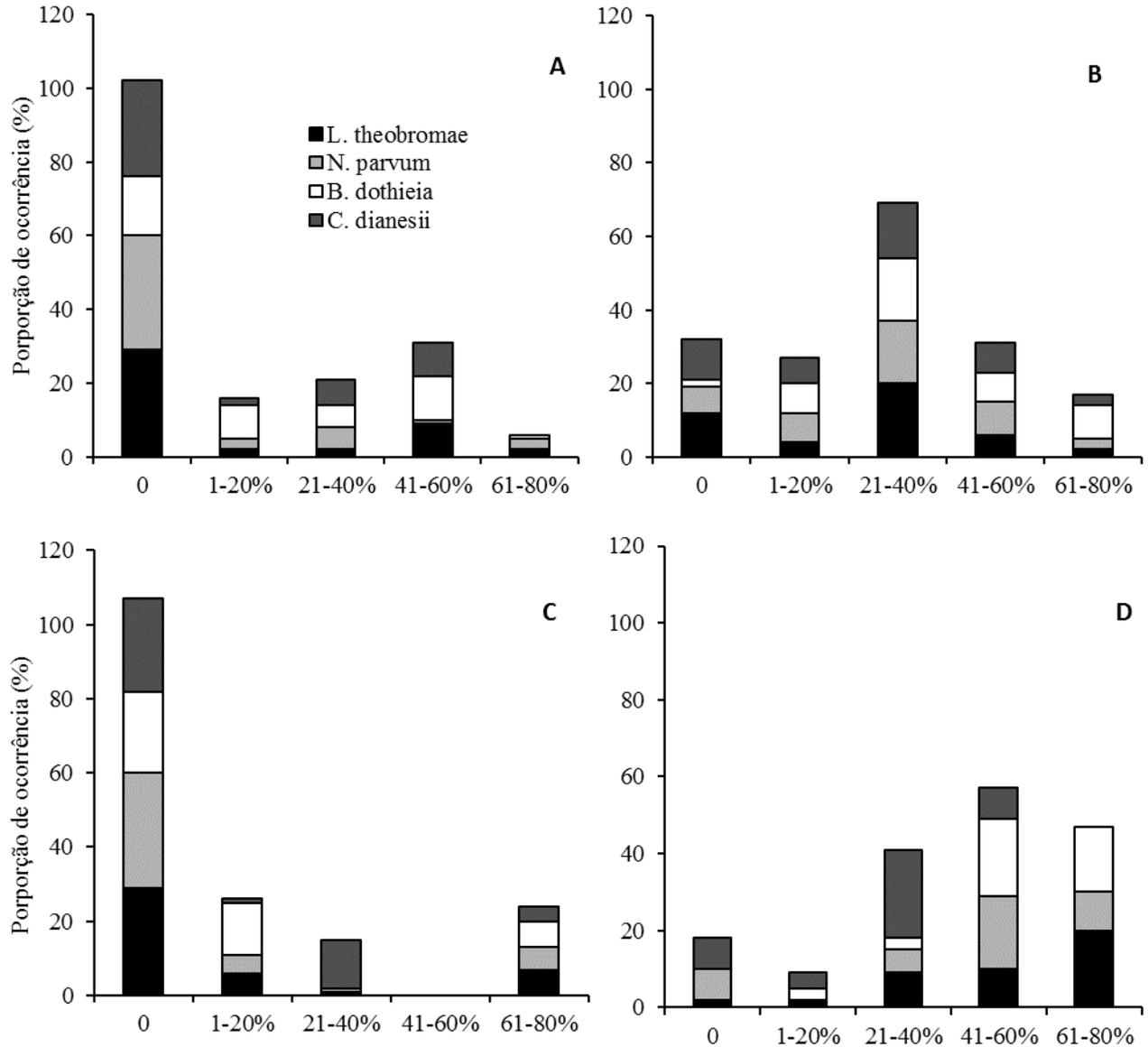


Figura 5. Taxa de inibição de fungos patogênicos por bactérias endofíticas isoladas de Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). A-vr. Recife em meio de cultura BDA, B-vr. Recife em meio de cultura NA, C-vr. Engana Ladrão em meio de cultura BDA, D-vr. Engana Ladrão em meio de cultura NA.

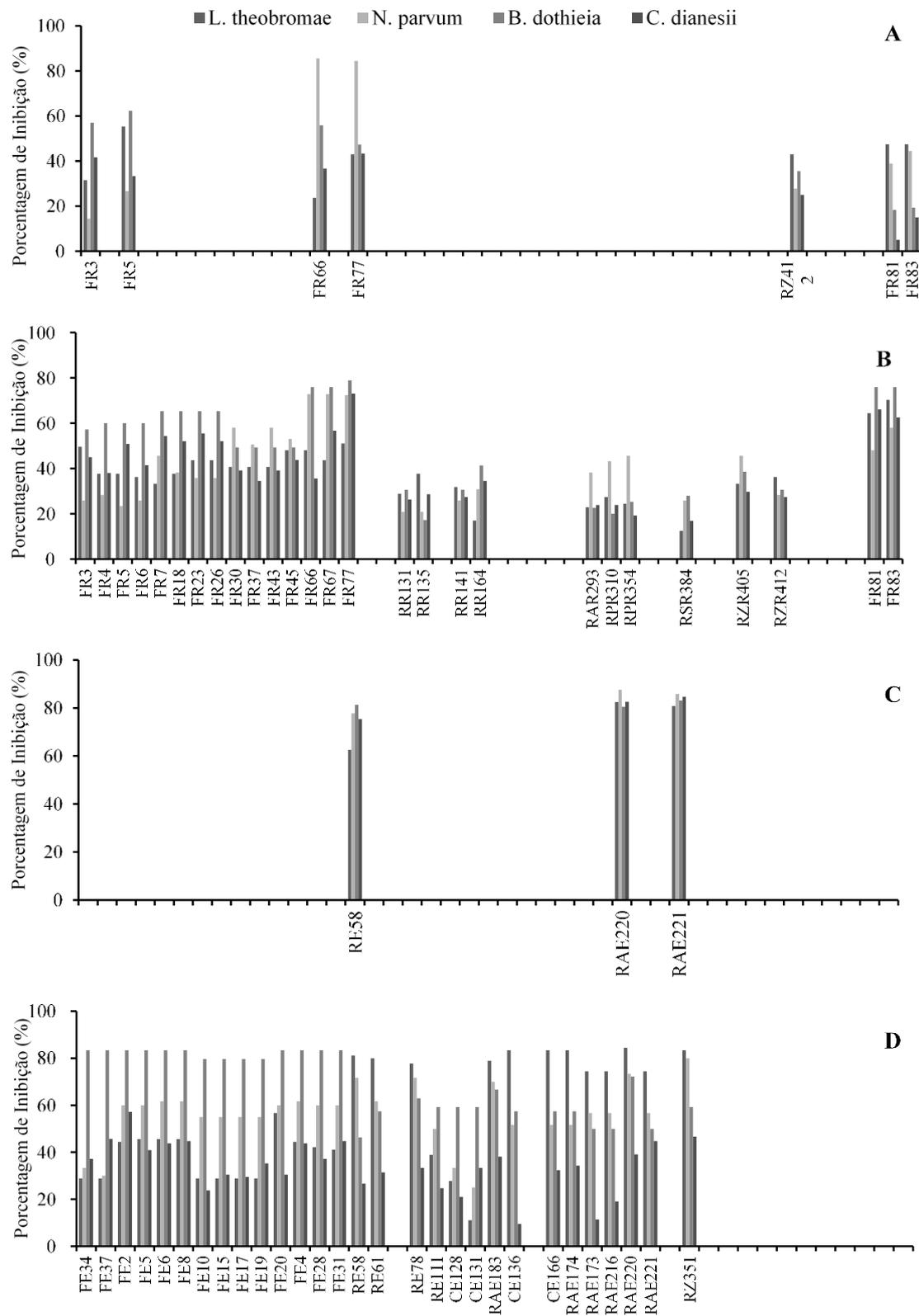


Figura 6. Quantidade de bactérias endofíticas isoladas de Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) que com atividade produção de metabólitos antifúngicos contra quatro fungos patogênicos testados. A-vr. Recife em meio de cultura BDA, B-vr. Recife em meio de cultura NA, C-vr. Engana Ladrão em meio de cultura BDA, D-vr. Engana Ladrão em meio de cultura NA.

Quando observamos quais bactérias endofíticas apresentaram maior antibiose contra os quatro fungos testados, verificamos que no meio BDA poucos isolados promoveram inibição. Ao contrário, no meio NA há um alto índice de bactérias endofíticas promotoras de antibiose e, esse fato se repete com os isolados testados das duas cultivares (Figura 6).

Discussão

Nesse estudo foi obtido um grande número de bactérias endofíticas isoladas nas duas cultivares de mandioca. Observando as cultivares existe uma predominância de bactérias endofíticas nas raízes, o que está de acordo com os relatos de (AZEVEDO, 1998; MOREIRA e SIQUEIRA, 2005; PEIXOTO NETO et al. 2002), que indicam a raiz como sendo a principal porta de entrada para micro-organismos endofíticos na planta. Contudo, ao penetrar nesta, os endofíticos se disseminam para outros tecidos vegetais, e assim, conseguem colonizar regiões distantes como as folhas (AZEVEDO et al. 1998). Nos resultados podemos verificar que na cv. Recife o gênero *Enterobacter*, se distribui entre os órgãos da planta sendo detectado nos ramos primários, caule, raiz e raiz de absorção. No entanto, na cv. Engana Ladrão o gênero mais frequente foi *Bacillus*, que se disseminou desde rizosfera da planta, passando pela raiz, raiz de absorção, caule, ramos primários e folhas.

A caracterização fenotípica em microbiologia é uma das primeiras ferramentas para identificação, mas não é um método conclusivo. É necessário associar a técnicas mais precisas como a análise molecular. Em geral, a caracterização morfológica e fenotípica tem sido usada como parte da caracterização polifásica de bactérias, e dessa forma também foi empregada neste estudo. Em outros estudos, como o de CHAGAS JÚNIOR et al. (2010) o uso da caracterização fenotípica foi uma etapa preliminar também utilizada para avaliar a diversidade de rizóbio isolados de solos da Amazonia e suas eficiências simbióticas quando inoculados em feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.). LIMA et al. (2012) também utilizaram as características fenotípicas/culturais para avaliar a diversidade de rizóbio isolados de Mucuna-Cinza e Mucuna-Anã em meio de cultura YMA e da técnica de análise de restrição do produto de PCR do gene 16S rDNA para identificação dessas bactérias.

Considerando as características avaliadas foi possível agrupar as bactérias com outras morfolologicamente similares e verificar a ocorrência dos isolados em cada órgão das plantas. Como esperado, o agrupamento de bactérias proveniente da caracterização fenotípica, não correspondem ao agrupamento dessas bactérias na análise molecular desta pesquisa. Indicando a necessidade de análises conjuntas para confirmar a identificação após a caracterização dos isolados.

De acordo com AZEVEDO, (1998) provavelmente todas as plantas possuem micro-organismos endofíticos, formando um verdadeiro microbioma. Uma mesma planta pode conter vários deles, incluindo fungos e bactérias. Em geral, existem espécies frequentes em um determinado hospedeiro, ou ao contrário, outras mais raras. Nesse estudo, mesmo tendo origem e manejo similar observou-se que muitos gêneros de bactérias endofíticas foram específicos para determinada cultivar (Tabela 3). Enquanto a cv. Recife apresentou dois gêneros exclusivos (*Pantoea* e *Cronobacter*), a cv. Engana Ladrão também teve dois gêneros exclusivos (*Microbacterium* e *Stenotrophomonas*).

Teixeira et al. (2007) estudando plantas de mandioca coletadas de áreas comerciais, no Estado de São Paulo (IAC 12.829 e IAC 576-70), e de etnovarietades dos estados do Amazonas e Bahia (Bravo, Caixão, Colombo, Cacau, Roxo, Lafaiete, Pretinha, Unha e Branca) identificaram 47 espécies de micro-organismos pertencentes a 27 gêneros, e, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Stenotrophomonas* e *Serratia* foram os mais frequentes. Nesse trabalho os autores citam o isolamento e identificação de *Bacillus thuringiensis* como endófito de plantas de mandioca, este é um dos relatos iniciais na literatura sobre a ocorrência desta espécie bacteriana como micro-organismo endofítico. Em estudo posterior, SUZUKI (2006), também trabalhando com plantas de mandioca cultivadas em São Paulo (IAC 12.829 e IAC 576-70), Bahia (etnovarietades selvagens) e Amazonas (mandioca mansa conhecida popularmente por maca e a variedade de mandioca brava), observou a presença de linhagens endofíticas de *Bacillus thuringiensis*. Todos os isolados obtidos pelos autores produziram quitinase, sugerindo que essas bactérias podem ter ação controladora sobre fungos fitopatogênicos e insetos. Em nossa pesquisa, o isolado de folhas da cv. Engana Ladrão (FE14) foi identificado na análise molecular como *Bacillus thuringiensis* comprovando sua ocorrência em plantas de mandioca.

Grande parte das bactérias endofíticas isoladas nas duas cultivares de mandioca e que foram identificadas, possuem amplo relato de proporcionarem ação inibitória em micro-organismos patogênicos. Em bactérias as cepas dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* foram utilizadas no controle de doenças de plantas, o que demonstra o seu grande potencial para utilização na agricultura (TEIXEIRA et al. 2007).

Em relação a incoerência que aparece nas duas árvores filogenéticas tanto para a cv. Recife, quanto para cv. Engana Ladrão, a associação do gênero *Rizobium* (Proteobactéria), a grupos como, *Curtobacterium* e *Microbacterium* (Actinobactérias) e, *Bacillus* (Firmecutes), provavelmente seja por conta das sequências que aparecem nos isolados e no momento de comparação pode se assemelhar com um pedaço das sequências variáveis em *Rizobium*.

De acordo com os resultados apresentados na figura 6 podemos verificar que os meios de cultura utilizados no ensaio de atividade antimicrobiana influenciaram na produção de metabólitos antibióticos contra os patógenos testados. No meio BDA houve o favorecimento no desenvolvimento dos fungos e aparente inibição na ação antimicrobiana das bactérias. Ao contrário, no meio de cultura NA há um aumento de bactérias que apresentam ação inibitória. Entre os dois meios de cultura utilizados o BDA apresenta menos proteínas e compostos nitrogenados e alto teor de amido, condições favoráveis ao desenvolvimento de fungos, entretanto, o meio NA é um meio mais rico em compostos nitrogenados, contendo extratos de leveduras e carne e, peptonas, componentes necessários para que as bactérias se desenvolvam com maior eficiência (PELCZAR et al. 2005). Os nutrientes nesse meio foram mais eficientes para bactérias endofíticas promovendo aumento do metabolismo secundário com a produção de metabólitos antifúngicos que inibiram o crescimento micelial dos patógenos. A dimensão dos halos de inibição pode indicar tanto a quantidade e a potência, além da produção de compostos antifúngicos, as bactérias podem interferir no crescimento micelial pela competição por espaço e nutriente, secreção de enzimas líticas, alteração de pH e/ou síntese de compostos voláteis, (SOUZA et al. 2015).

A descoberta do potencial antifúngico de bactérias endofíticas isoladas neste estudo de plantas de mandioca abre um leque de possibilidades de estudos que visam controlar a incidência de patógenos pós-colheita em diversas espécies cultivadas de plantas.

Referências

- Azevedo, J. L. In: Melo, I. S.; Azevedo, J. L., 1998. *Ecologia Microbiana*. Jaguaraúna. Embrapa – CNPMA, 488p.
- Azevedo, J. L. et al. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology*. 3, No.1, ISSN: 0717-3458
- Barraquio, W.L. 1997. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. *Plant and Soil*, v.194, p.15-24.
- Batista et al. 2012. Avaliação da resistência de 47 acessos de mangueira aos fungos *Fusicoccum aesculis* e *Neofusicoccum parvum*. *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal - SP, v. 34, n. 3, p. 823-831, Setembro.
- Chagas Junior, A. F. et al. 2010. Caracterização fenotípica de rizóbio nativos isolados de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi. *Maringá*, v. 32, n. 1, p. 161-169, 2010.
- Chaurasia, B. et al. 2005. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro. *Microbiological Research* 160, 75—81.

- Chen, S. F. et al. 2011. Characterization of Botryosphaeriaceae from plantation-grown *Eucalyptus* species in South China. *Plant Pathology*, 60, 739-751.
- Costa, L. E. O. et al. 2012. Isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from the leaves of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Brazilian Journal of Microbiology*, 1562-1575.
- Ferreira, A. L. et al. 2009. Produção e valor nutritivo da parte aérea da mandioca, maniçoba e pornunça. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 10, p. 983-990.
- Garcia, T. V. et al. 2015. Bactérias endofíticas como agentes de controle biológico na orizicultura. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.82, 1-9.
- Leelasuphakul, W. 2008. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Post-harvest Biology and Technology*, Amsterdam, v.48, n.1, p.113-121.
- Lima, A. A. et al. 2012. Diversidade e Capacidade Simbiótica de Rizóbios Isolados de Nódulos de Mucuna-Cinza e Mucuna-Anã. *R. Bras. Ci. Solo*, 36:337-348.
- Manoel Araújo Teixeira, M. A. et al. 2007. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em três estados brasileiros. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.42, n.1, p.43-49, jan.
- Monteon, O. et al. 2012. Temporal analysis and fungicide management strategies to control mango anthracnose epidemics in Guerrero, Mexico. *Tropical Plant Pathology*, 37(6), 375-385.
- Moreira, F.M.S.; Siqueira, J.O. 2006. *Microbiologia e bioquímica do solo*. Lavras, MG: UFLA. 729p.
- Nassar, N.M.A. et al. 2008. Wild *Manihot* species: botanical aspects, geographic distribution and economic value. *Genetics and Molecular Research*, 7: 16-28, 2008.
- Peixoto Neto, P. A. S. et al. 2002. *Microrganismos Endofíticos*. Biotecnologia, Ciências & Desenvolvimento, ano 05, nº 29, nov-dez.
- Pelczar junior, M. J. et al. (2005). *Microbiologia: conceitos e aplicações*. 2ª ed. v. 1. São Paulo, SP: Pearson Makron Books, 522p.
- Pereira, A. L. et al. 2006. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. *Fitopatol. bras.*, Brasília, v. 31, n. 6, p. 572-578, Dec.
- Pereira, J.O. 1993. Fungos endofíticos dos hospedeiros tropicais *Stylosanthes guianensis* e *Musa cavendish*. 105f. Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", São Paulo.
- Pisarska, K.; Pietr, S. J. 2015. Biodiversity of Dominant Cultivable Endophytic Bacteria Inhabiting Tissues of Six Different Cultivars of Maize (*Zea mays* L. ssp. *mays*) Cropped under Field Conditions. *Polish Journal of Microbiology*, V. 64, 2, 163–170.

Souza, A. Q. L. et al. 2004. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta amazonica*, V. 34 (2), 185 – 195.

Souza, R. D. et al. 2015. Atividade antagônica a microrganismos patogênicos por bactérias endofíticas isoladas de *Echinodorus scaber* Rataj. *Summa Phytopathol.*, Botucatu, v. 41, n. 3, p. 229-232, 2015.

Souza, S. A. et al. 2013. Endophytic bacterial diversity in banana ‘Prata Anã’ (*Musa* spp.) roots. *Genetics and Molecular Biology*, 36, 2, 252-264.

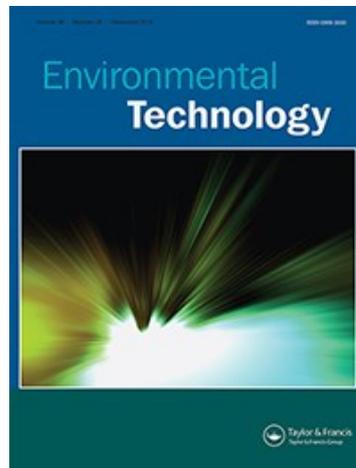
Suzuki, M.T. 2006. Isolamento, identificação e Caracterização de linhagens endofíticas de *Bacillus thuringiensis* mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). 2006. 102f. Dissertação (mestrado em Interunidades em Biotecnologia) - Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Teixeira, M.A. et al. 2005. Diversidade de bactérias endofíticas na cultura da mandioca – Jaguariúna : Embrapa meio Ambiente, (Embrapa Meio Ambiente. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 33), 22 p.

Yousten, A. A. 1984. *Bacillus sphaericus*: microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide. *Advances in Biotechnology Processes*, v.3, p.315-343.

3.3 LECTINA DAS FOLHAS DE MANDIOCA (*MANIHOT ESCULENTA* CRANTZ):
PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

ARTIGO A SER ENVIADO E TRADUZIDO PARA O PERIÓDICO:
ENVIRONMENTAL TECHNOLOGY



Lectina das folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz): purificação e caracterização

*Carla R. R. S. França¹, Deize R. S. Cruz², Wagner P. Félix², Carlos A. T. Gava³
& Luana C. B. B. Coelho¹*

1 Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, UFPE-Universidade Federal de Pernambuco, Recife-Pe, Brasil.

2 Departamento de Zootecnia, Laboratório de Bioquímica, Univasf-Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina-Pe, Brasil.

3 Embrapa Semiárido, Petrolina-Pe, Brasil.

Resumo

Lectina da cultivar de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) Recife foi isolada a partir de suas folhas. A atividade hemaglutinante da lectina foi detectada e teve maior índice em eritrócitos de coelho com teste de inibição ativo para o carboidrato manose. O pico retido (PII) proveniente da coluna de afinidade agarose-manose mostrou alta atividade específica da lectina e, apresentou em SDS-PAGE massa molecular aparente de 64 kDa. Nos testes de atividade antimicrobiana, a lectina não inibiu o desenvolvimento das bactérias patogênicas. Já em relação a interação da lectina com bactérias endofíticas isoladas das folhas da cultivar Recife, observou-se aglutinação visível em alguns isolados.

Palavras-chave: lectina, *Manihot*, aglutinação, eritrócitos.

Introdução

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas capazes de aglutinar glicoconjugados, encontradas em diferentes tipos de organismos. Este grupo de proteínas são capazes de exercer diversas funções como: participação na proteção da planta contra fitopatógenos e/ou insetos (OLIVEIRA *et al.*, 2011; SANTOS, *et al.*, 2012), atividade antimicrobiana (COSTA *et al.* 2010; CARVALHO *et al.*, 2012) e, princípios de interações comuns reconhecendo carboidratos (COELHO; SILVA, 2000; COELHO *et al.*, 2009).

Lectinas de plantas têm sido usadas como ferramentas analíticas ou preparatórias em pesquisas de glicoconjugados, e como proteínas bioativas para a indução de alguns processos moleculares em células ou organismos (PEUMANS;VAN DAMME, 1998).

De acordo com a especificidade as lectinas foram classificadas em cinco grupos, conforme a configuração relativa dos carboidratos 3 e 4 (C3 e C4) do anel piranosídico dos monossacarídeos inibidores. Grupo I: L-fucose; Grupo II: galactose/N-acetil-galactosamina; Grupo III: glicose/manose; Grupo IV: idose, gulose, L-glicose e L-xilose, Grupo V: ácido N-acetilneuramínico (LIS; SHARON, 1998; POVINELI; FINARDI FILHO, 2002).

De acordo com Oda e Minami (1986) muitas lectinas são isoladas a partir de plantas ou animais e utilizadas para investigar as estruturas e funções da superfície celular através de açúcares. A grande parte das lectinas isoladas e estudadas aglutinam hemácias de animais, como, coelho, boi, cavalo, ovelha, galinha e de humano. Nessas pesquisas a especificidade a carboidratos colaboram para a caracterizar glicoproteínas e outras células compostas de açúcares na sua superfície.

A grande diversidade dos estudos de lectinas se refere à extração e purificação em sementes de *Cratylia mollis* - Cramoll - Cramoll-1,4 (PAIVA; COELHO, 1992; CORREIA; COELHO, 1995); folhas de *Bauhinia monandra* - BmoLL (COELHO; SILVA, 2000); sementes de *Moringa oleifera* - WSMoL (COELHO *et al.*, 2009); em folhas de *Phthirusa pyrifolia* – PpyLL (COSTA *et al.*, 2010); e em folhas de *Myracrodruon urundeuva* – MuLL (NAPOLEÃO *et al.*, 2011).

O gênero *Manihot* pertence à família *Euphorbiaceae*, que, composta de árvores, arbustos, lianas e ervas, reúne 313 gêneros e aproximadamente 7 mil e 200 espécies. Com exceção das regiões árticas, as euforbiáceas ocorrem em todo mundo, sendo muitas delas cultivadas como ornamentais, como o bico-de-papagaio; medicinais, como os dois amores, indicada para o tratamento de calos e verrugas; e outras para extração de tinturas, ceras, espécies de látex, como a seringueira, e óleos, como a mamoneira (EMBRAPA, 2005).

As euforbiáceas são plantas com amplo estudo relacionado às lectinas. Podemos verificar pesquisas com extração e purificação em *Ricinus communis* (APPUKUTTAN *et al.*, 1977) e *Synadenium carinatum* (SOUZA *et al.*, 2005), atividade antimicrobiana em *Euphorbia trigona* (DEENEN *et al.*, 2011) e controle de nematóides com atividade ovicida em *Ricinus communis* e *Jatropha curcas* (SALLES *et al.*, 2014).

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) pode ser destinada ao consumo humano e animal (ruminantes e herbívoros não ruminantes), podendo-se aproveitar as raízes, excelente fonte de energia, as ramas (parte aérea), ricas em proteína, e os subprodutos da industrialização

(SILVA; FERREIRA FILHO, 2007). A espécie é a única cultivada dentro do gênero *Manihot* e sua alta heterozigiosidade, favorecida pelos cruzamentos naturais intraespecíficos, resultou em grande número de variedades com diferentes características morfológicas, permitindo sua adaptação às condições mais variadas de clima e solo, bem como resistência ou tolerância a praga e doenças (LORENZI, 2012).

As cultivares de mandioca são classificadas em doces ou de “mesa”, também conhecidas como aipim, macaxeira ou mandioca mansa e normalmente utilizadas para consumo fresco humano ou animal; e amargas ou mandiocas bravas, geralmente usadas nas indústrias de transformação principalmente de farinha e fécula. De maneira bastante subjetiva, as variedades bravas têm sabor amargo e as doces não, são levemente adocicadas. O sabor amargo está associado ao potencial cianogênico, ou seja, à capacidade da liberação de ácido cianídrico (HCN), substância altamente tóxica (VALLE *et al.*, 2004).

Não há um marcador consistente para evidenciar diferenças fenotípicas entre cultivares bravas e mansas, mas sim uma variação muito grande em relação a esse parâmetro. Em campo, porém, os agricultores utilizam a morfologia (fenótipo) para separar as plantas mansas das bravas. Por exemplo: cor da polpa, forma do lóbulo central, cor do córtex da raiz, dentre outras características. Isso varia muito de uma localidade para outra.

Neste artigo, relatamos a purificação e caracterização de uma nova lectina isolada a partir das folhas de mandioca (*M. esculenta* Crantz).

Material e Métodos

Preparo das folhas das mandiocas

As folhas foram colhidas aos 8 meses de idade (período em que os produtores retiram as plantas para comercialização) da cultivar de mandioca Recife (*Manihot esculenta* Crantz), obtidas da Embrapa Semiárido, Petrolina-PE, Brasil. As folhas foram levadas ao laboratório, lavadas, secas e congeladas em freezer.

Extração das proteínas

As proteínas foram extraídas com tampão citrato-fosfato 0,01M, pH 6,5, contendo NaCl 0,15 M na proporção 1:10 (p/v) e PVPP (polivinilpirrolidona) 2%, sob agitação mecânica por três horas em temperatura ambiente. O extrato obtido foi filtrado em algodão e centrifugado a 5000 rpm, por 30 minutos a 7° C. O sobrenadante foi recolhido (extrato bruto) para dosagem protéica e atividade hemaglutinante.

Dosagem de proteínas

A determinação de proteínas foi realizada segundo a metodologia descrita por Lowry *et al.*, (1951), usando albumina sérica bovina como padrão.

Ensaio da atividade hemaglutinante (AH)

A AH foi determinada com eritrócitos de coelho e humano (sistema ABO) tratados com glutaraldeído, utilizando o método relatado por Correia e Coelho (1995). Placas de microtitulação contendo 8 fileiras de 12 poços cada, foram preenchidas com 25 μL NaCl 0,15 M contendo ou não MnCl_2 0,02 M e em seguida acrescidos com igual volume de amostra lectínica no segundo poço da fileira. A amostra foi submetida a uma série de diluições na base 2, com homogeneização e transferência de 25 μL para o poço seguinte até o último poço da fila. Em seguida, a amostra diluída foi incubada com 25 μL de suspensão de 2,5% (v/v) de células vermelhas do sangue de coelho ou sangue humano glutarizadas, e deixadas em repouso em temperatura ambiente. Foram realizadas leituras da hemaglutinação visualmente, após 60 minutos. Os resultados foram expressos em número de unidades hemaglutinantes (UH), que é calculado a partir do inverso do título da maior diluição que ainda apresentou aglutinação visível. Os primeiros poços que continham somente a suspensão de sangue de coelho com NaCl 0,15 M mais MnCl_2 0,02 M serviram como controle negativo. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Cepa 1972) (suspensão 1×10^8 UFC mL^{-1}), também foi submetida ao ensaio de aglutinação com a lectina seguindo o mesmo procedimento.

Ensaio de inibição da atividade aglutinante por açúcares

O ensaio de especificidade de ligação da lectina a carboidratos foi determinado utilizando soluções dos seguintes açúcares: D-galactose, D-lactose, D-manose, D-glucose, D-frutose, D-sacarose, D-arabinose, D-trealose e D-maltose, todos com concentração inicial de 0,5 molar. Inicialmente realizou-se uma diluição da lectina 1:50 (cv. Recife 0,0612 mg.mL^{-1}), logo após, 25 μL da solução do carboidrato foi adicionado em 25 μL da solução diluente de NaCl 0,15 M contendo MnCl_2 0,02 M, realizando diluições seriadas. Em seguida, 25 μL da amostra da lectina purificada foi adicionada a cada poço, incubados durante 30 minutos em temperatura ambiente.

Após pré-incubação 25 μL de eritrócitos de coelho glutarizado 2,5% (v/v) foi adicionado aos poços e aguardou-se 60 minutos para leitura.

Precipitação das proteínas com sulfato de amônio

Ao extrato bruto obtido adicionou-se sulfato de amônio sólido, em pequenas quantidades, sob agitação magnética em temperatura ambiente até atingir o percentual de saturação de 60% para precipitar as proteínas. Logo após, as misturas foram mantidas em repouso a 25° C por 24 horas. As amostras saturadas e centrifugadas a 5000 rpm, por 30 minutos a 7° C, tiveram seus precipitados ressuspensos em 2 mL de tampão citrato-fosfato 0,01M, pH 6,5, contendo NaCl 0,15 M. Em seguida, dialisadas contra água destilada (5 vezes) com intervalo de duas horas para cada diálise. A fração dialisada foi submetida à dosagem de proteínas e ensaio da atividade hemaglutinante.

Purificação parcial das proteínas

As proteínas foram purificadas em coluna de afinidade de agarose-manose (3 mL), utilizando como eluente das proteínas não ligadas à matriz tampão PB (KCl- 0,02 g, Na₂HPO₄- 0,268 g e KH₂PO₄- 0,024g) 0,01M, pH 7,4, e, como eluente das proteínas ligadas, solução tampão glicina-HCl 0,1 M, pH 2,6. A coluna foi previamente equilibrada com tampão PB 0,01M, pH 7,4, em seguida, 3 mL da F/60 (fração) da amostra foi aplicada. Após, aplicados ininterruptamente, tampão PB 0,01M, pH 7,4, para remoção do material não ligado à coluna e, logo em seguida, solução tampão glicina-HCl 0,1 M, pH 2,6. O eluato foi continuamente recolhido (1,5 mL) com o auxílio de um coletor de frações sob fluxo constante de 5 rpm /3,0 min com o auxílio de uma bomba peristáltica e monitorado por espectrofotômetro em 280 nanômetros. A partir das primeiras amostras purificadas a proteína isolada das folhas de mandioca recebeu o nome de MesLL (Lectina das folhas de *Manihot esculenta*).

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A identificação e presença de bandas das proteínas foi confirmada por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE), segundo o método de LAEMMLI (1970).

Para isso, utilizaram-se 25 µg da amostra testada, dissolvidas em 25 µL do tampão de amostras, submetida à fervura 100 °C por 5 min (condições desnaturantes) e em seguida aplicada a um gel com malha 12%, contendo marcador molecular (Bio-Rad).

O coramento do gel foi realizado com solução de azul de Comassie R-250 a 0,2% em ácido acético glacial: metanol: água purificada (9: 22: 69) (BLUM *et al.*, 1987).

Efeito de íons metálicos, do pH e da temperatura

A dependência dos cátions divalentes foi determinada após incubação da lectina por 30 minutos com CaCl_2 , MgCl_2 e MnCl_2 (SOUZA et al., 2011) todos em uma concentração de 0,02 molar. O efeito do pH sobre a AH foi avaliado por incubação de 25 μL da lectina purificada a diferentes valores de pH durante 1 h à temperatura ambiente em 25 μL dos tampões selecionados (0,05 M glicina, pH 2,6, 0,05 M acetato de sódio, pH 5,0, 0,05 M fosfato de sódio, pH 7,0, 0,05 M Tris-HCl, pH 8,5 e 0,05 M borato de sódio, pH 10,0) na presença de NaCl 0,15 M, contendo MnCl_2 0,02 M. A estabilidade da lectina frente ao calor foi avaliada através da incubação da proteína a diferentes temperaturas (30-100°C) durante 30 minutos. Os ensaios de AH foram realizados em todos os testes.

Avaliação da presença de glicídios constituintes

A presença de carboidratos neutros na lectina purificada foi realizada pelo método de DUBOIS et al., (1956).

Concentração mínima inibitória (MIC) e Concentração mínima bacteririca (CBM)

Estirpes de bactérias Gram-positivas *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Bacillus cereus* (ATCC11778), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Rhodococcus equi* e bactérias Gram-negativas, *Escherichia coli* (ATCC 35218), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella XLD*, *Salmonella typhimurium* (ATCC 14023), *Salmonella enterica* (ATCC 10708), *Shigella flexneri* (ATCC12022) e *Serratia marcescens* (ATCC 13880) provenientes do Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Vale do São Francisco-Univasf, foram utilizadas no ensaio de atividade antimicrobiana.

As culturas das bactérias foram mantidas em agar nutriente (NA) ou agar Müller Hinton e armazenadas a 4 ° C. Para determinar a atividade antimicrobiana, cultivaram-se bactérias em caldo de Müller Hinton a 37 ° C durante 24 horas. As culturas foram ajustadas turbidimetricamente a 0,5 na escala McFarland.

Alíquota (200 μL) de MesLL – lectina purificada das folhas de mandioca (0,5 mg/mL Tampão Fosfato de Sódio, 0,05 M) foi diluída 1: 2 em 200 μL de Caldo Müller Hinton (MH) e diluída serialmente. Em seguida, todos os poços foram inoculados com 20 μL de cultura bacteriana e incubados a 37 ° C durante 24 h. O controle negativo continha MH e bactéria. Também foi feito o controle MH + Tampão Fosfato de Sódio, 0,05 M. As bactérias foram incubadas em estufa 37° C por 24 horas. A concentração mínima inibitória (MIC) foi

determinada como a menor concentração da lectina em que houve uma redução do crescimento da bactéria em relação ao controle negativo.

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) é definida como a menor concentração que a amostra em estudo é capaz de causar a morte do inoculo. O conteúdo de cada poço da microplaca foi inoculado em placas contendo ágar *Mueller Hinton* com o auxílio de um replicador e incubados por 24 horas em uma placa contendo meio *Mueller Hinton Ágar*. A menor concentração onde não foi observado crescimento no ágar é considerada a CBM. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Atividade aglutinante entre a lectina (MesLL) e as bactérias endofíticas das folhas de mandioca

Foram selecionadas 20 islados bacterianos endofíticos (FR5, FR6, FR8, FR13, FR18, FR21, FR26, FR33, FR37, FR44, FR77, FR81, FR83 e FR88) isoladas das folhas de mandioca cv. Recife, além das bactérias uma amostra da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizada como controle positivo. Essas bactérias foram crescidas em 5 mL de meio líquido caldo nutriente e incubadas por 48 horas sob agitação (180 rpm) a 28°C. Após crescimento, as células bacterianas foram centrifugadas 9.000 g por 2 minutos, lavadas 3 vezes com NaCl 0,15 M, passando em cada lavagem pelo processo de centrifugação (9.000 g por 2 minutos). As suspensões de cada bactéria foram ajustadas para aproximadamente 10^8 células por mL⁻¹.

O ensaio de aglutinação foi realizado em placas de microtitulação (96 poços). Neste ensaio adicionou-se primeiramente aos poços 25 µL de NaCl 0,15 M como diluente, pulou o primeiro poço (controle) e no seguinte foi colocado 25 µL da lectina (MesLL) na concentração de 0,1 mg/mL e realizado diluições sucessivas. Após diluição da lectina, 25 µL da suspensão bacteriana 10^8 células por mL⁻¹ de cada bactéria foi adicionado aos poços. A atividade de aglutinação foi observada e fotografada após 24 horas, utilizando microscópio OLYMPUS BH-2.

Resultados e Discussão

Extração, atividade hemaglutinante e dosagem de proteínas

Os resultados de extração protéica (extrator tampão citrato-fosfato 0,01M, pH 6,5, contendo NaCl 0,15 M) são apresentados na tabela 1. Nas concentrações iniciais obtidas de proteínas, não era observado hemaglutinação visível nos primeiros poços da placa de hemaglutinação e sim uma forte precipitação dos eritrócitos no pico retido proveniente da

coluna de agarose-manose. Esse fato pode ser explicado devido a estequiometria existente entre o alto teor da lectina e a quantidade de eritrócitos na amostra nas primeiras diluições.

Foi necessário efetuar diluição da amostra purificada de 1:50 utilizando como solvente tampão fosfato de sódio 0,05 M pH 7,0, o teor de proteína inicial era de 3,06 mg/mL e, após a diluição foi de 0,0612 mg.mL⁻¹.

Observa-se que em cada passo do processo de purificação, os teores de proteína e atividade hemaglutinante aumentam. Quanto ao valor de hemaglutinação do pico retido foi de 512 UH e seu fator de purificação nessa fração é aumentado significativamente em relação à fração saturada com sulfato de amônio. Esse fato indica alta atividade da lectina nas frações retidas da coluna de afinidade. Em pesquisas realizadas com folhas da mesma espécie estudada mudando somente a cultivar – Cacao, (PEREIRA et al., 2008) encontrou maior AH na fração saturada a 50% e essa atividade foi de 16 unidades hemaglutinantes. Esse baixo valor de AH comparado ao nosso trabalho pode estar relacionado com o extrator utilizado. Da mesma forma (SILVA et al., 2010 B) encontrou valores inferiores de AH em folhas de mandioca cv. Cacao. Esses autores utilizaram água destilada como extrator e essa solução pode extrair menos proteínas que o tampão citrato-fosfato 0,01M, pH 6,5, contendo NaCl 0,15 M, em função da força iônica ser mais baixa.

Analisando os valores de purificação nota-se que a metodologia aplicada é eficiente para obtenção da lectina pesquisada.

Tabela 1. Purificação da lectina de *Manihot esculenta* Crantz.

Etapas	Volume (mL)	Proteína (mg.mL ⁻¹)	Proteína total (mg)	AH ^a	AHT ^b	AHE ^c	Fator de Purificação
Extrato Bruto	400	0,350	140,00	128	51200	365,71	1
Fração 60%	280	0,440	123,20	256	71680	581,82	1,59
MesLL	6	0,061	0,37	512	3072	8.393,44	22,95

^a Atividade hemaglutinante foi realizada com uma suspensão de 2% de eritrócitos de coelho glutarizado; ^b Atividade hemaglutinante total=AH*volume (mL); ^c Atividade hemaglutinante específica= AH/proteína⁻¹ (mg). ^d Atividade aglutinante foi realizada com uma suspensão de células da levedura *S. cerevisiae* (1 x 10⁸); ^e Atividade aglutinante total=AA*volume (mL); ^f Atividade aglutinante específica= AA/proteína⁻¹ (mg).

Caracterização e atividade da lectina

A lectina isolada das folhas de mandioca aglutinou eritrócitos de coelho e humano com concentrações de 0,0612 mg.mL⁻¹ e, também células de *Saccharomyces cerevisiae* (Tabela 2) apresentando atividade biológica com essa levedura. Resultados similares foram obtidos por

MISAKI et al., (1997), estudando a lectina isolada de *Crocus vernus* All, eles observaram que a mesma interagiu seletivamente tanto com a levedura *S. cerevisiae*, quanto com eritrócitos de coelho.

Tabela 2. Atividade Biológica entre a lectina (MesLL) e a levedura *S. cerevisiae*

Etapas	Volume (mL)	Proteína (mg.mL ⁻¹)	Proteína total (mg)	AA ^d	AAT ^e	AAE ^f	Fator de Purificação
Extrato Bruto	400	0,350	140,00	64	25.600	182.86	1
Fração 60%	280	0,440	123,20	512	143.360	1.163,64	6,36
MesLL	6	0,061	0,37	1024	6.144	16.786,89	91,80

^d Atividade aglutinante foi realizada com uma suspensão de células da levedura *S. cerevisiae* (1×10^8);

^e Atividade aglutinante total=AA*volume (mL); ^f Atividade aglutinante específica= AA/proteína⁻¹ (mg).

A lectina purificada apresentou atividade em todos os valores de pHs testados, mas sua maior atividade hemaglutinante (AH), foi obtida em meio neutro pH 7,0 (Figura 1A), e, esta atividade foi dependente do íon metálico manganês. Os resultados de Pereira *et al.* (2008), também trabalhando com folhas de mandioca, obtiveram maior atividade hemaglutinante em pH 6,0, mas essa atividade foi inferior a encontrada nesta pesquisa. Com relação à sua termoestabilidade verificou-se que a atividade hemaglutinante foi reduzida, mas não houve inativação da proteína mesmo com a temperatura atingindo 100 °C por 30 minutos (Figura 1B). Resultados semelhantes em relação a termoestabilidade foi observado por (SILVA *et al.*, 2012) na lectina de sementes *Bauhinia forficata* que mostrou estabilidade a 100 °C por 30 minutos. Em estudos de purificação parcial da lectina de folhas de mandioca cv. Cacao, testando a fração saturada a 80% com sulfato de amônio Silva *et al.*, (2010 A) observaram que essa fração aglutinava eritrócitos humano tipo A, Rh positivo com estabilidade até a temperatura de 70 °C por 30 minutos.

Em relação ao conteúdo de açúcares solúveis totais, só foi detectado glicídios no extrato bruto numa concentração de 0,5 mg/mL, mas nas próximas etapas de purificação não há presença desses açúcares. Indicando que provavelmente a lectina não seja uma glicoproteína. Da mesma forma a lectina isolada de sementes de *Dioclea rostrata* não apresentou carboidratos ligados covalentemente a sua estrutura (CAVADA et al., 1996). No entanto, a lectina isolada das sementes de *Jatropha curcas* apresentou em sua estrutura o teor total de açúcares neutros de 4,91%, caracterizando-a assim como uma glicoproteína (LIN *et al.*, 2010).

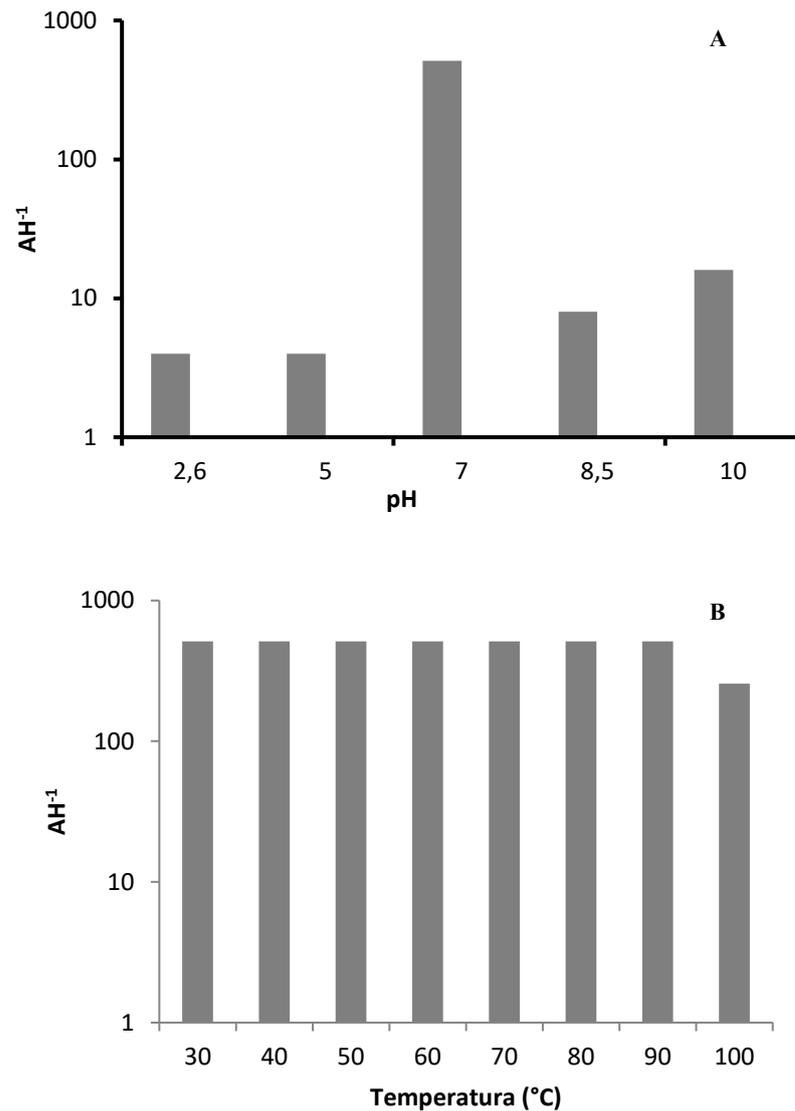


Figura 1. (A) Efeito do pH e da (B) temperatura da lectina de *Manihot esculenta* Crantz.

Ensaio de inibição da atividade aglutinante por açúcares

O efeito de vários açúcares sobre a ligação da lectina das folhas de mandioca junto às células de eritrócitos de coelho foi avaliado. Entre os açúcares testados a manose foi o único que conseguiu inibir parcialmente a ligação da lectina numa concentração mínima de 0,48 mM frente aos eritrócitos. Nos trabalhos com purificação parcial da lectina de mandioca por Pereira *et al* (2008) e Silva *et al.*, (2010 A) não foi verificado ensaio de especificidade à açúcares. No nosso estudo, essa análise foi essencial para a utilização da matriz na cromatografia de afinidade. Esta especificidade de ligação a manose também é uma característica das lectinas isoladas de *Cratylia mollis* Mart (CORREIA; COELHO, 1995), *Canavalia ensiformis* (KENNEDY *et al.*, 1995), *Parkia platycephala* (CAVADA *et al.*, 1997), *Castanea mollissima* (NG *et al.*, 2002) e *Parkia biglobosa* (SILVA *et al.*, 2013).

Para LIS & SHARON (1998), a seletividade das lectinas para monossacarídeos nem sempre está tão alto. Assim, muitas lectinas são capazes de tolerar variações no C2 do anel de piranosídico e aquelas que se ligam especificamente a manose podem ligar-se ao epímero glicose. Com base nestes dados, podemos incluir a lectina estudada (MesLL) ao grupo ligante de glicose/manose.

Purificação parcial da lectina

A purificação parcial da lectina presente nas folhas de mandiocas foi realizada usando cromatografia de afinidade em coluna de agarose-manose. Na figura 2 encontra-se o perfil de eluição da amostra. É observado dois picos distintos obtidos da cromatografia de afinidade, entre os quais o pico II (retido) apresentou alto valor de atividade hemaglutinante, e, essa fração retida apareceu como uma banda única com massa molecular aparente de aproximadamente 64 kDa em SDS-PAGE (Figura 3). Lectinas isoladas de alguns gêneros pertencentes à família das euforbiáceas apresentam massa molecular entre 60 e 67 kDa (PUSZTAI, 1991; VAN DAMME *et al.*, 1998), esse fato corrobora os dados encontrados. Silva *et al.*, (2010) conseguiram identificar quatro bandas em SDS-PAGE a partir da coluna Sepharose CL-4B com a fração saturada de folhas de mandioca e, essas bandas apresentam 13, 58, 61 e 64 kDa, uma das bandas possui o mesmo tamanho da isolada neste estudo, mas no trabalho citado não foi possível determinar quais dessas bandas corresponde a lectina das folhas de mandioca. Ainda como exemplo de comportamento similar podemos citar a Ricina lectina dimérica pertencente a euforbiáceas e que possui duas subunidades distintas e com peso molecular de 63 kDa (POVINELI & FINARDI-FILHO, 2002), em pesquisas mais recentes DEENEN *et al.*, (2011) explicam que a forma ativa da Ricina uma glicoproteína dimérica (65 kDa) é composta de uma cadeia tóxica A (31kDa) que está ligada por uma ligação de açúcar a uma cadeia B (34 kDa) via ligação dissulfeto. De forma semelhante a lectina dimérica de *Euphorbia heterophylla* apresenta massa de 65 kDa com duas subunidades idênticas de 32 kDa (NSIMBA *et al.*, 1983).

De acordo com a análise em SDS-PAGE, a lectina do látex de *Synadenium carinatum* pareceu ser uma glicoproteína composta de duas cadeias polipeptídicas de 28 e 30 kDa, mas cromatografia de exclusão por tamanho (Sephadex G-100) e PAGE nativa revelou uma proteína de peso molecular aparente 120-130 kDa composta de subunidades 28 e 30 kDa (SOUZA *et al.*, 2005).

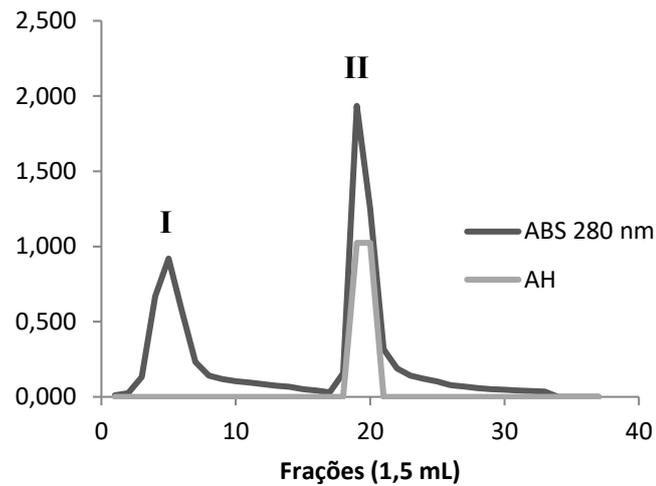


Figura 2. Purificação de lectina de mandioca (*M. esculenta* Crantz - MesLL) por cromatografia de afinidade (agarose-manose).

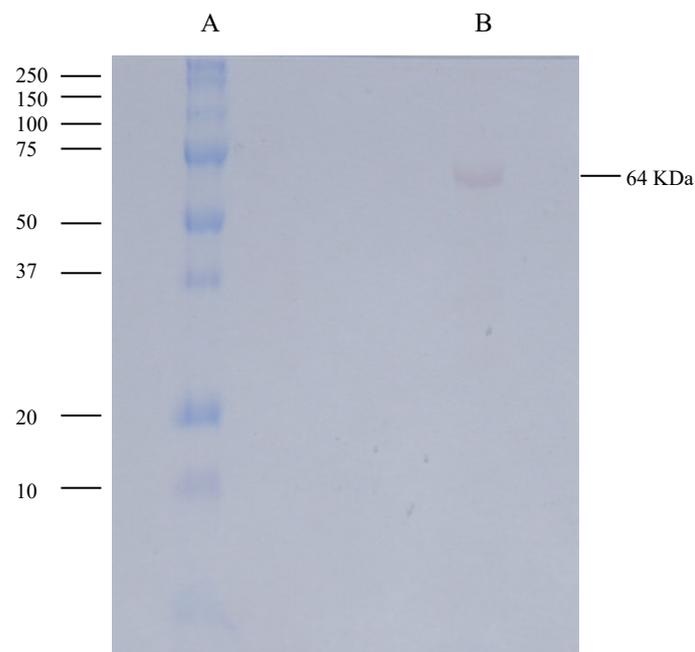


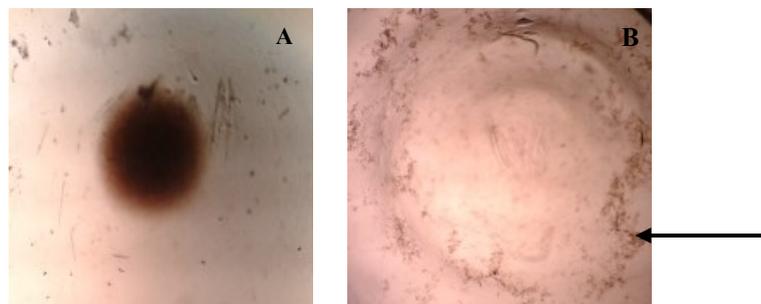
Figura 3 - Análise eletroforética em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) da lectina purificada de folhas de mandioca (*Manihot esculenta*) - 64 kDa, retida na coluna agarose-manose. (A) marcador molecular (GE-Amersham^T e (B) MesLL (25 µg).

Concentração mínima inibitória (MIC) e Concentração mínima bacteririca (CBM)

A lectina isolada das folhas de mandioca (MesLL) não apresentou atividade antimicrobiana frente as bactérias testadas, havendo crescimento em todas as diluições, ou seja, não houve inibição microbiana pela lectina.

Atividade aglutinante entre a lectina (MesLL) e as bactérias endofíticas das folhas de mandioca

Os ensaios de aglutinação foram realizados para investigar a possível interação de MesLL, uma lectina específica de manose, com bactérias endofíticas isoladas das folhas de mandioca. A aglutinação bacteriana foi expressa como o grau da solução aglutinina-bactéria no fundo da placa de microtitulação diferente do controle negativo (que contém somente o diluente NaCl 0,15 M e a suspensão bacteriana para cada amostra). A aglutinação foi observada visualmente após a incubação das placas durante 24 horas, indicando claramente a concentração mínima de unidades aglutinantes (UA) que provocam a aglutinação bacteriana (Figura 4). A observação das placas revelou aglutinação entre MesLL e 10 (FR4-8 UA, FR18-8 UA, FR26-4 UA, FR33-8 UA, FR36-256 UA, FR44-2 UA, FR77-16 UA, FR81-16 UA, FR83-128 UA e FR88-16 UA) dos 20 isolados testados, além da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (1024 UA) com um título de aglutinação variável em cada isolado. Em pesquisa similar RAMOS et al., (2016), verificaram aglutinação visível entre a lectina (BmoLL) isolada das folhas de *Bauhinia monandra* (galactose específica) e a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA598, com o título de 16^{-1} unidades aglutinantes, mas não houve aglutinação com os endofíticos isolados das folhas de *Bauhinia monandra*. Esses autores relatam que não há um mecanismo plausível sugerido para a interação de lectinas com endofíticos foliares e, a lectina poderia estar interagindo com micro-organismos endofíticos como um fator inibidor, simbiótico ou estimulante.



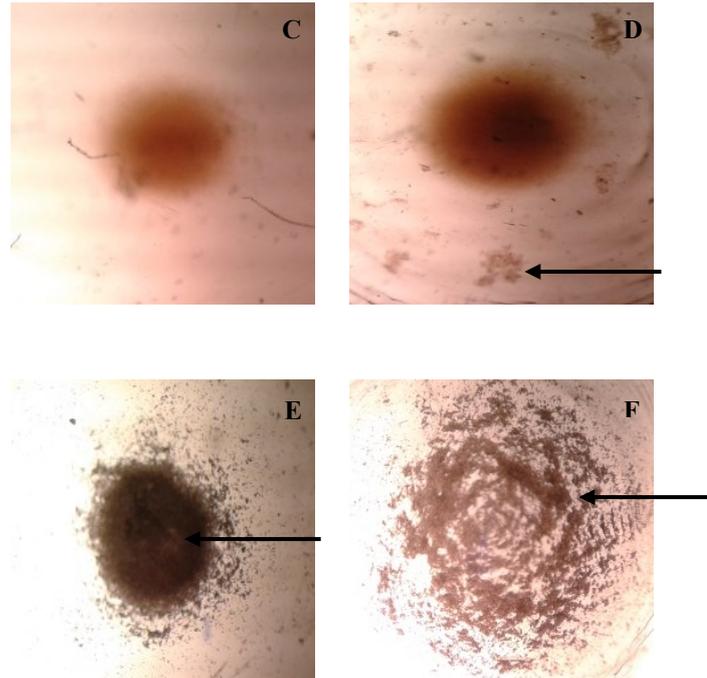


Figura 4. Aglutinação de bactérias endofíticas e lectina purificada de folhas de mandioca (*Manihot esculenta*) MesLL. A- Suspensão do isolado FR33, controle; B- Suspensão do isolado FR33 com a lectina MesLL; . C- Suspensão do isolado FR88, controle; D- Suspensão do isolado FR88 com a lectina MesLL; . E- Suspensão da levedura *S. cerevisiae*, controle; F- Suspensão da levedura *S. cerevisiae* com a lectina MesLL; () Aglutinação.

Conclusões

As folhas da cultivar Recife de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) apresentam lectina que pode ser incluída no grupo ligante de glicose/manose com inibição à manose, revelando especificidade tanto a eritrócitos de coelho e humano quanto à células de *Saccharomyces cerevisiae* e, em SDS-PAGE aparece como uma banda única de aproximadamente 64 kDa. Nos testes de atividade antimicrobiana, a lectina não inibiu o desenvolvimento das bactérias patogênicas. No entanto, foi observado interação da lectina tanto com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, quanto com bactérias endofíticas isoladas das folhas.

Referências

APPUKUTTAN PS, SUROLLA A, BACHHAWAT BK. Isolation of two galactose-binding proteins from *Ricinus communis* by affinity chromatography. **Indian J Biochem Biophysics**, 1977; 14 (4): 382-384.

BLUM H, BEIER H, GROSS HJ. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, 1987; 8: 93 – 99.

BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 1976; 72: 248-254.

CARVALHO EVMM, BEZERRA RF, BEZERRA RS, ARAÚJO JM, SANTOS AJG, CORREIA MTS, COELHO LCBB. Detection of the first lectin with antimicrobial activity present in serum of the Amazonian fish tambaqui *Colossoma macropomum*. **Chem and Biochem**, 2012; 78: 879–887.

CAVADA BS, SANTOS CF, GRANGEIRO TB, SILVA LMM, CAMPOS MJO, SOUSA FAM, CALVETE JJ. Isolation and partial characterization of a lectin from *Parkia platycephala* Benth seeds. **Physiol Mol Biol Plants**, 1997; 3: 109–115.

CAVADA. Isolation and partial characterization of a lectin from *Dioclea rostrata* Benth seeds. **Bras. Fisiol. Veg.**, 1996; 8 (1):31-36.

COELHO JS, SANTOS NDL, NAPOLEÃO TH, GOMES FS, FERREIRA RS, ZINGALI RB, COELHO LCBB, LEITE SP, NAVARRO DMAP, PAIVA PMG. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**, 2009; 77(7): 934-938.

COELHO LCBB, SILVA MBR. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochem Analysis**, 2000; 11(5): 295–300.

CORREIA MTS, COELHO LCBB. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). **Applied Biochem and Biotech**, 1995; 55: 261-273.

COSTA RMPB, VAZ AFM, OLIVA MLV, COELHO LCBB, CORREIA MTS, CARNEIRO-DA-CUNHA MG. A new mistletoe *Phthirusa pyrifolia* leaf lectin with antimicrobial properties. **Process Biochem**, 2010; 45(4): 526-533.

DEENEN NV, PRÜFER D, SCHULZE CG. A latex lectin from *Euphorbia trigona* is a potent inhibitor of fungal growth. **Biologia Plantarum**, 2011; 55(2): 335-339.

DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON JK, REBERS PA, SMITH F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, 1956; 28: 350-356.

EMBRAPA. **Mandioca: o pão do Brasil**. Brasília (DF): Embrapa; 2005; 284p.

KENNEDY JF, PAIVA PMG, CORREIA MTS, CAVALCANTI MSM, COELHO LCBB. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, 1995; 26(3): 219-230.

LAEMMLI UK. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 1970; 227: 680-685.

LIMA-RIBEIRO MHM, SANTOS-OLIVEIRA R, SANTANA MF, PINTO TJA, KIKUCHI IS, MOTHÉ CG, COELHO LCBB, CORREIA MTS, CARNEIRO-LEÃO AMA. *In Vitro* Evaluation of Gamma Irradiation on a Gel Formulation of *Cratylia mollis*: Rheological Properties and Microbiological Control. **J of Cosmet, Dermat Scienc and Applic**, 2012; 2: 45-50.

LIN J, ZHOU X, WANG J, JIANG P, TANG K. Purification and characterization of curcin, a toxic lectin from the seed of *Jatropha curcas*. 2010; 40(2):107-108.

LIS H, SHARON N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chem. Rev.** 1998; 98: 637-674.

LORENZI, JO. Mandioca. 2^a ed. CATI:Campinas, 2012. (Boletim Técnico, 245)

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J.; **J. Biol. Chem.** 1951, 193, 265.

MISAKI A, KAKUTA M, MEAH Y, GOLDSTEIN IJ. Purification and characterization of the α -1,3-mannosylmannose-recognizing lectin of *Crocus vernus* Bulbs. **J of Biolog Chem**, 1997; 272(41): 25455–25461.

NAPOLEÃO TH, GOMES FS, LIMA TA, SANTOS NDL, SÁ RA, ALBUQUERQUE AC, COELHO LCBB, PAIVA PMG. Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. **Internat Biodeteriorat & Biodegrad**, 2011; 65(1): 52-59.

NG TB, YU YL, CHU KT. Isolation of a novel legumin-like lectin with potent hemagglutinating activity from seeds of the Chinese chestnut *Castanea mollissima*. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, 2002; 133: 453-460.

NSIMBA-LUBAKI M, PEUMANS WJ, CARLIER AR. Isolation and partial characterization of a lectin from *Euphorbia heterophylla* seeds. **Biochem. J**, 1983; 215: 141-145.

ODA Y, MINAMI K. Isolation and characterization of a lectin from tulip bulbs, *Tulipa gesneriana*. **Eur J Biochem**, 1986; 159: 239-245.

OLIVEIRA CFR, LUZ LA, PAIVA PMG, COELHO LCBB, MARANGONI S, MACEDO MLR. Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. **Process Biochem**, 2011; 46: 498-504.

PAIVA PMG, COELHO LCBB. Purification and partial characterization of two lectins isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). **Applied Biochem and Biotech**, 1992; 36(2): 113-118.

PEREIRA CA, CORRÊA AD, SANTOS CD, ABREU CMP, SOUSA RV, MAGALHÃES MM. Hemaglutinina de folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz): purificação parcial e toxicidade. **Ciênc. Agrotec**, 2008; 32: 900-907

PEUMANS WJ, VAN DAMME EJM. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. **Biotech and Genetic Eng Reviews**, 1998; 15: 199 - 228.

POVINELI KL, FINARDI FILHO F. As multiplas funções das lectinas vegetais. **J Brazilian Soc Food Nutr**, 2002; 24: 135-136.

PUSZTAI, A. Plant Lectins. **Chemistry & Pharmacology of Natural Products**, Cambridge University Press, Cambridge, 1991; 253 p.

RAMOS, SAF.; SILVA, LCN.; CORREIA, MTS.; ARAÚJO, JM.; COELHO, LCBB. Endophytic microorganisms from *Bauhinia monandra* leaves: Isolation, antimicrobial activities and interaction with galactose-specific lectin BmoLL. **African Journal of Microbiology Research**, Vol. 10(17), pp. 600-607, 7 May, 2016

SALLES HO, BRAGA ACL, NASCIMENTO MTSC, SOUSA AMP, LIMA AR, VIEIRA LS, CAVALCANTE ACR, EGITO AS, ANDRADE LBS. Lectin, hemolysin and protease inhibitors in seed fractions with ovicidal activity against *Haemonchus contortus*. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, 2014; 23(2): 136-143.

SANTOS NDL, MOURA KSM, NAPOLEÃO TH, SANTOS GKN, COELHO LCBB, NAVARRO DMAF, PAIVA PMG. Oviposition-Stimulant and Ovicidal Activities of *Moringa oleifera* Lectin on *Aedes aegypti*. **PLoS ONE**, 2012; 7: 1-8.

SILVA HC, BARI AU, ROCHA BAM, NASCIMENTO KS, PONTE EL, PIRES AF, DELATORRE P, TEIXEIRA EH, DEBRAY H, ASSREUY AMS, NAGANO CS, CAVADA BS. Purification and primary structure of a mannose/glucose-binding lectin from *Parkia biglobosa* Jacq. seeds with antinociceptive and anti-inflammatory properties. **J Mol Recognit**, 2013; 26: 470–478.

SILVA MC, CORRÊA AD, SANTOS CD, MARCOS FCA, ABREU CMP. Extração da lectina da folha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e o efeito de cátions divalentes na atividade hemaglutinante. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, 2010B; 30: 103-107.

SILVA MC, CORRÊA AD, SANTOS CD, MARCOS FCA, ABREU CMP. Partial purification of leaf lectin from *Manihot esculenta* and screening its fungicidal activity. **Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development** 2010A; 2: 136-141.

SILVA MCC, SANTANA LA, MENTELE R, FERREIRA R S, MIRANDA A, SILVA-LUCCA RA, SAMPAIO MU, CORREIA MTS, OLIVA MLV. Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from *Bauhinia forficata* seeds. **Process Biochemistry**, 2012; 47: 1049–1059.

SILVA, J, FERREIRA FILHO JR. **Produção de biomassa de mandioca**. Documentos 34, Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2007. [Documentos On line]

SOUZA MA, AMÂNCIO-PEREIRA F, CARDOSO CRB, SILVA AG, SILVA EG, ANDRADE LR, PENA JDO, LANZA H, AFONSO-CARDOSO SR. Isolation and Partial Characterization of a D-Galactose Binding Lectin from the Latex of *Synadenium carinatum*. **Braz. Arch of Biol and Tech**, 2005; 48(5): 705-716.

SOUZA JD, SILVA MBR, ARGOLO ACC, NAPOLEÃO TH, SÁ RA, CORREIA MTS, PAIVA PMG, SILVA MDC, COELHO LCBC. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 2011; 65: 696-702.

VALLE TL, CARVALHO CRL, RAMOS MTB, MUHLEN GS, VILLELA OV. **Conteúdo cianogênico em progênies de mandioca originais do cruzamento de variedades mansas e bravas**. Vol. 63, Bragantia: Campinas; 2004.

VAN DAMME EJ, PEUMANS WJ, PUSZTAI A, BARDOCZ S. **Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications**. John Wiley & Sons; 1998.

CONCLUSÕES

- Conhecimento e compreensão sobre a cultura da mandioca através da realização da Revisão Bibliográfica.
- Não houve diferenças significativas entre os meios de culturas utilizados na quantidade de bactérias endofíticas isoladas. No entanto, a frequência de bactérias foi maiores nas raízes e menores nos ramos secundários, nas duas cultivares analisadas.
- As colônias isoladas foram caracterizadas morfológicamente e fenotipicamente. A população de bactérias encontrada nas duas cultivares de mandioca apresentou variação. De maneira geral, as duas cultivares mostraram colonização por bactérias endofíticas dos gêneros: *Curtobacterium*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Kosakonia*, *Rhizobium*, *Pantoea*, *Cronobacter*, *Bacillus*, *Microbacterium* e *Stenotrophomonas*. Os gêneros *Pantoea*, *Cronobacter* foram encontrados somente na cultivar Recife e os *Microbacterium* e *Stenotrophomonas* na cultivar Engana Ladrão. O gênero *Pseudomonas* mostrou-se o mais representativo para as duas cultivares de mandioca.
- No ensaio de atividade antimicrobiana foi detectada atividade inibitória entre as bactérias testadas das duas cultivares selecionadas e os fungos patogênicos *Lasiodiplodia theobromae*, *Neofusicoccum parvum*, *Botryosphaeria dothidia* e *Colletotrichum dianesii*, variando a frequência de inibição.
- As folhas da cultivar Recife de mandioca apresentam lectinas que podem ser incluídas no grupo ligante de glicose/manose com inibição à manose.
- A lectina apresenta especificidade tanto a eritrócitos de coelho e humano, bem como quanto às células de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Em SDS-PAGE aparece como uma banda única de aproximadamente 64 kDa.
- Nos testes de atividade antimicrobiana, a lectina não inibiu o desenvolvimento das bactérias patogênicas.
- Em relação à interação da lectina com bactérias endofíticas isoladas das folhas da cultivar Recife, observou-se aglutinação visível em alguns isolados.

REFERÊNCIAS

- ABHARY M, SIRITUNGA D, STEVENS G, TAYLOR NJ, FAUQUET CM. Transgenic Biofortification of the Starchy Staple Cassava (*Manihot esculenta*) Generates a Novel Sink for Protein. **PLoS ONE**, 2011; 6 : 1-9.
- ALLEM AC. The origin of *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiaceae). **Genetic Resources and Crop Evolution**, 1994; 41: 133-150.
- ANTONIO RP, SILVA A.F, LIRA ICSA, SANTOS JDS, SILVA NETO JL, SANTOS THN. **Banco Regional de Germoplasma de Mandioca do Semiárido do Nordeste do Brasil**. In: II Simpósio da Rede de Recursos Genéticos Vegetais do Nordeste, 2015,
- ANDERSON JV, DELSENY M, FREGENE MA, JORGE V, MBA C, LOPEZ C, RESTREPO S, SOTO M, PIEGU B, VERDIER V, COOKE R, TOHME J, HORVATH DP. An EST resource for cassava and other species of Euphorbiaceae. **Plant Molecular Biology**, 2004; 56: 527–539.
- APPUKUTTAN PS, SUROLLA A, BACHHAWAT BK. Isolation of two galactose-binding proteins from *Ricinus communis* by affinity chromatography. **Indian J Biochem Biophysics**, 1977; 14 (4): 382-384.
- AZEVEDO, J. L. In: MELO, I. S. de; AZEVEDO, J. L. de. **Ecologia Microbiana**. Jaguaraúna. Embrapa – CNPMA, 1998. 488p.
- AZEVEDO, J. L., MACCHERONI JR, W., PEREIRA, J. O., ARAÚJO, W. L., 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**. 3, No.1, 2000. ISSN: 0717-3458
- BARRAQUIO, W.L.; REVILLA, L.; LADHA, J.K. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. **Plant and Soil**, v.194, p.15-24, 1997.
- BATISTA, D. C.; LIMA NETO, F. P.; BARBOSA, J. S.; AMORIM, C. C.; BARBOSA, M. A. G. **Avaliação da resistência de 47 acessos de mangueira aos fungos *fusicoccum aesculis* e *neofusicoccum parvum***. Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP, v. 34, n. 3, p. 823-831, Setembro 2012.
- BORGES MF, FUKUDA WMG, ROSSETTI AG. Avaliação de variedades de mandioca para consumo humano. **Pesq. agropec. bras.**, 2002; 37 (11): 1559-1565.
- BROWN CH, CLEMENT CR, EPPS P, LUEDELING E, WICHMANN S. The Paleobiolinguistics of Domesticated Manioc (*Manihot esculenta*). **Ethnobiology Letters**, 2013; 4: 61-70.
- BLUM H, BEIER H, GROSS HJ. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, 1987; 8: 93 – 99.
- BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 1976; 72: 248-254.

CAMPOS AL, ZACARIAS AJ, COSTA DL, NEVES LG, BARELLI MAA, SOBRINHO SP, LUZ PB. Avaliação de acessos de mandioca do banco de germoplasma da UNEMAT Cáceres – Mato Grosso. **Revista Tropica**, 2010; 4: 44-54.

CARVALHO EVMM, BEZERRA RF, BEZERRA RS, ARAÚJO JM, SANTOS AJG, CORREIA MTS, COELHO LCBB. Detection of the first lectin with antimicrobial activity present in serum of the Amazonian fish tambaqui *Colossoma macropomum*. **Chem and Biochem**, 2012; 78: 879–887.

CAVADA BS, SANTOS CF, GRANGEIRO TB, SILVA LMM, CAMPOS MJO, SOUSA FAM, CALVETE JJ. Isolation and partial characterization of a lectin from *Parkia platycephala* Benth seeds. **Physiol Mol Biol Plants**, 1997; 3: 109–115.

CAVADA. Isolation and partial characterization of a lectin from *Dioclea rostrata* Benth seeds. **Bras. Fisiol. Veg.**, 1996; 8 (1):31-36.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N. **Caracterização fenotípica de rizóbio nativos isolados de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi**. Maringa, v. 32, n. 1, p. 161-169, 2010.

CHAURASIA, B.; PANDEY, A.; PALNI, L. M. S.; TRIVEDI, P.; BHAVESH KUMAR, NIHARIKA COLVIN. **Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi in vitro**. Microbiological Research 160, 75—81, 2005.

CHEN, S. F.; PAVLIC, D.; ROUX, J.; SLIPPERS, B.; XIE, Y. J.; WINGFIELD, M. J.; ZHOU, X. D. **Characterization of Botryosphaeriaceae from plantation-grown *Eucalyptus* species in South China**. Plant Pathology, 60, 739-751. 2011.

COELHO JS, SANTOS NDL, NAPOLEÃO TH, GOMES FS, FERREIRA RS, ZINGALI RB, COELHO LCBB, LEITE SP, NAVARRO DMAF, PAIVA PMG. Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. **Chemosphere**, 2009; 77(7): 934-938.

COELHO LCBB, SILVA MBR. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochem Analysis**, 2000; 11(5): 295–300.

COHEN KO, OLIVEIRA SS, CHISTÉ RC. **Quantificação de teores de compostos cianogênicos totais em produtos elaborados com raízes de mandioca**. Embrapa- Amazônia Oriental, 2007. 23p. Documentos, 290.

CORREIA MTS, COELHO LCBB. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). **Applied Biochem and Biotech**, 1995; 55: 261-273.

COSTA RMPB, VAZ AFM, OLIVA MLV, COELHO LCBB, CORREIA MTS, CARNEIRO-DA-CUNHA MG. A new mistletoe *Phthirusa pyrifolia* leaf lectin with antimicrobial properties. **Process Biochem**, 2010; 45(4): 526-533.

COSTA, L. E. O.; QUEIROZ, M, V.; BORGES, A. C.; MORAES, C. A.; ARAÚJO, E. F. **Isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from the leaves of the common bean (*Phaseolus vulgaris*)**. Brazilian Journal of Microbiology, 1562-1575, 2012

COSTA MR, CARDOSO ER, OHAZE MMM. Similaridade genética de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta*) por meio de marcadores RAPD. **Ciênc. agrotec**, 2003; 27: 158-164.

CREPALDI I.C. Origem, evolução e geografia da mandioca: uma revisão. **Sitientibus**, 1992; 10: 89-94.

DEENEN NV, PRÜFER D, SCHULZE CG. A latex lectin from *Euphorbia trigona* is a potent inhibitor of fungal growth. **Biologia Plantarum**, 2011; 55(2): 335-339.

DUBOIS M, GILLES K A, HAMILTON JK, REBERS PA, SMITH F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, 1956; 28: 350-356.

EMBRAPA. **Mandioca: o pão do Brasil**. Brasília (DF): Embrapa; 2005; 284p.

EMBRAPA. **Mandioca no Cerrado: orientações técnicas / editores técnicos**, Josefino de Freitas Fialho, Eduardo Alano Vieira. – Planaltina, DF : Embrapa Cerrados, 2011. 208 p.

FARIAS ARN, EZETA FN, DANTAS, JLL. **O mandarová da mandioca**. Embrapa-CNPMPF, 1980. 12p. Circular técnica, 5.

FERREIRA AL, SILVA AF, PEREIRA LGR, BRAGA LGT, MORAES SA, ARAÚJO G G L. Produção e valor nutritivo da parte aérea da mandioca, maniçoba e pornunça. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. 2009; 10: 983-990.

FERREIRA FC, ALVES E, PESTANA KN, JUNGHANS DT, KOBAYASHI AK, SANTOS VJ, SILVA RP, SILVA PH, SOARES E, FUKUDA W . Molecular characterization of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) with yellow-orange roots for beta-carotene improvement. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**. 2008; 8: 23-29.

FERREIRA, A. L.; SILVA, A. F.; PEREIRA, L. G. R.; BRAGA, L. G. T.; Moraes, S. A. de; ARAÚJO, G. G. L. de . **Produção e valor nutritivo da parte aérea da mandioca, maniçoba e pornunça**. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, v. 10, p. 983-990, 2009.

FUKUDA WMG, COSTA IRS, SILVA SO. **Manejo e Conservação de Recursos Genéticos de Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) na Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**. EMBRAPA-CNPMPF, 2005; 4p. Circular Técnica, 74. (a)

FUKUDA WMG. **Banco de germoplasma de mandioca: manejo, conservação e caracterização**. Embrapa-CNPMPF, 1996; 103 p. Documentos, 68.

FUKUDA WMG, GUEVARA CL. **Descritores morfológicos e agronômicos para a caracterização de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. EMBRAPA-CNPMPF, 1998; 38 p. Documentos, 78.

FÜRSTENBERG-HÄGG J, ZAGROBELNY M, BAK S. Plant Defense against Insect Herbivores. **Int. J. Mol. Sci**, 2013; 14: 10242-10297.

GARCIA, T. V.; KNAAK, N.; FIUZA, L. M. **Bactérias endofíticas como agentes de controle biológico na orizicultura.** Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.82, 1-9, 2015.

JANSZ ER, ULUWADUGÊ DI. Biochemical aspects of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) with special emphasis on cyanogenic glucosides-A review. **J. Natn. Sci. Coun**, 1997; 25: 1-24.

JØRGENSEN K, MORANT AV, MORANT M, JENSEN NB, OLSEN CE, KANNANGARA R, MOTAWIA MS, MØLLER BL, BAK S. Biosynthesis of the Cyanogenic Glucosides Linamarin and Lotaustralin in Cassava: Isolation, Biochemical Characterization, and Expression Pattern of CYP71E7, the Oxime-Metabolizing Cytochrome P450 Enzyme. **Plant Physiology**, 2011; 155: 282–292.

LAEMMLI UK. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 1970; 227: 680-685.

LIMA-RIBEIRO MHM, SANTOS-OLIVEIRA R, SANTANA MF, PINTO TJA, KIKUCHI IS, MOTHÉ CG, COELHO LCBB, CORREIA MTS, CARNEIRO-LEÃO AMA. *In Vitro* Evaluation of Gamma Irradiation on a Gel Formulation of *Cratylia mollis*: Rheological Properties and Microbiological Control. **J of Cosmet, Dermat Scienc and Applic**, 2012; 2: 45-50.

LIN J, ZHOU X, WANG J, JIANG P, TANG K. Purification and characterization of curcin, a toxic lectin from the seed of *Jatropha curcas*. 2010; 40(2):107-108.

LIS H, SHARON N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chem. Rev.** 1998; 98: 637-674.

LEELASUPHAKUL, W.; HEMMANEE, P.; CHUENCHITT, S. **Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit.** Postharvest Biology and Technology, Amsterdam, v.48, n.1, p.113-121, 2008.

LIMA, A. A.; FERNANDES JÚNIOR, P. I.; PASSOS, S. R.; DE PAULO, F. S.; NOSOLINE, S. M.; FARIA, S. M.; GUERRA, J. G. M.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. **Diversidade e Capacidade Simbiótica de Rizóbios Isolados de Nódulos de Mucuna-Cinza e Mucuna-Anã.** R. Bras. Ci. Solo, 36:337-348, 2012.

LIMA JÚNIOR DM, MONTEIRO PBS, RANGEL AHN, MACIEL MV, OLIVEIRA SEO, FREIRE DA. Fatores anti-nutricionais para ruminantes. **Acta Veterinaria Brasilica**, 2010; 3: 132-143.

LORENZI J.O. **Mandioca.** 2ª ed. Campinas, CATI 2012. 129p. ilus. 23 cm (Boletim Técnico, 245).

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J.; **J. Biol. Chem.** 1951, 193, 265.

MANOEL ARAÚJO TEIXEIRA, M. A.; MELO, I. S.; ROSANA FARIA VIEIRA, R. F.; COSTA, F. E. C.; HARAKAVA, R. **Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas**

comerciais e etnovarietades em três estados brasileiros. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.42, n.1, p.43-49, jan. 2007.

MONTEON OJEDA, ABRAHAM, MORA AGUILERA, JOSÉ ANTONIO, VILLEGAS MONTER, ÁNGEL, NAVA DIAZ, CRISTIAN, HERNÁNDEZ CASTRO, ELÍAS, OTERO-COLINA, GABRIEL, & HERNÁNDEZ MORALES, JAVIER. **Temporal analysis and fungicide management strategies to control mango anthracnose epidemics in Guerrero, Mexico.** *Tropical Plant Pathology*, 37(6), 375-385. 2012.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo.** Lavras, MG: UFLA, 2006. 729p.

MISAKI A, KAKUTA M, MEAH Y, GOLDSTEIN IJ. Purification and characterization of the a-1,3-mannosylmannose-recognizing lectin of *Crocus vernus* Bulbs. **J of Biolog Chem**, 1997; 272(41): 25455–25461.

NAPOLEÃO TH, GOMES FS, LIMA TA, SANTOS NDL, SÁ RA, ALBUQUERQUE AC, COELHO LCBB, PAIVA PMG. Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms. **Internat Biodeteriorat & Biodegrad**, 2011; 65(1): 52-59.

NG TB, YU YL, CHU KT. Isolation of a novel legumin-like lectin with potent hemagglutinating activity from seeds of the Chinese chestnut *Castanea mollissima*. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, 2002; 133: 453-460.

NSIMBA-LUBAKI M, PEUMANS WJ, CARLIER AR. Isolation and partial characterization of a lectin from *Euphorbia heterophylla* seeds. *Biochem. J*, 1983; 215: 141-145.

NASSAR NMA. Wild cassava, *Manihot* spp.: Biology and potentialities for genetic improvement. **Genetics and Molecular Biology**, 2000; 23: 201-212.

NASSAR NMA. Cassava, *Manihot esculenta* Crantz, genetic resources: origin of the crop, its evolution and relationships with wild relatives. **Genet Mol Res**. 2002; 31: 298-305.

NASSAR NMA, HASHIMOTO DY, FERNANDES SDC. Wild *Manihot* species: botanical aspects, geographic distribution and economic value. **Genetics and Molecular Research**. 2008; 7: 16-28.

NASSAR, N.M.A.; HASHIMOTO DY, FERNANDES SDC. **Wild *Manihot* species: botanical aspects, geographic distribution and economic value.** *Genetics and Molecular Research*, 7: 16-28, 2008.

OLIVEIRA NT. UCHÔA SCP, ALVES JMA, SEDIYAMA T, ALBUQUERQUE JAA, SOUZA ED, MELVILLE CC. Ácido cianídrico em tecidos de mandioca em função da idade da planta e adubação nitrogenada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 2012; 47 (10): 1436-1442.

ONZO A, HANNA R, SABELIS MW. **Biological control of cassava green mites in Africa: impact of the predatory mite *Typhlodromalus aripo***. Entomologische Berichten, 2005; 65: 2-7.

OLIVEIRA CM, FIALHO JF, FONTES JRA. **Bioecologia: disseminação e danos da cochonilha-das-raízes da mandioca *Protortonia navesi* Fonseca (Hemiptera: Margarodidae)**. 2005. 29 p. Documentos 142.

PARSA S, KONDO T, WINOTAI A. The Cassava Mealybug (*Phenacoccus manihoti*) in Asia: First Records, Potential Distribution, and an Identification Key. **PLoS ONE**, 2012; 10: 1-11.

ODA Y, MINAMI K. Isolation and characterization of a lectin from tulip bulbs, *Tulipa gesneriana*. **Eur J Biochem**, 1986; 159: 239-245.

OLIVEIRA CFR, LUZ LA, PAIVA PMG, COELHO LCB, MARANGONI S, MACEDO MLR. Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. **Process Biochem**, 2011; 46: 498-504.

PAIVA PMG, COELHO LCB. Purification and partial characterization of two lectins isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). **Applied Biochem and Biotech**, 1992; 36(2): 113-118.

PEIXOTO NETO, P. A. S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. **Microrganismos Endofíticos**. Biotecnologia, Ciências & Desenvolvimento, ano 05, nº 29, nov-dez, 2002.

PELCZAR JUNIOR, M. J.; CHAN, E. C. S.; NOEL, R. K. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2ª ed. v. 1. São Paulo, SP: Pearson Makron Books, 522p, 2005.

PEREIRA, A. L.; SILVA, G. S.; RIBEIRO, V. Q. **Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae***. Fitopatol. bras., Brasília, v. 31, n. 6, p. 572-578, Dec. 2006.

PEREIRA, J.O. **Fungos endofíticos dos hospedeiros tropicais *Stylosanthes guianensis* e *Musa cavendish***. 1993. 105f. Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, São Paulo. 1993.

PEREIRA CA, CORRÊA AD, SANTOS CD, ABREU CMP, SOUSA RV, MAGALHÃES MM. Hemaglutinina de folhas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz): purificação parcial e toxicidade. **Ciênc. Agrotec**, 2008; 32: 900-907

PEUMANS WJ, VAN DAMME EJM. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. **Biotech and Genetic Eng Reviews**, 1998; 15: 199 - 228.

PISARSKA, K.; PIETR, S. J. **Biodiversity of Dominant Cultivable Endophytic Bacteria Inhabiting Tissues of Six Different Cultivars of Maize (*Zea mays* L. ssp. *mays*) Cropped under Field Conditions**. Polish Journal of Microbiology, V. 64, 2, 163–170, 2015.

POVINELI KL, FINARDI FILHO F. As multiplas funções das lectinas vegetais. **J Brazilian Soc Food Nutr**, 2002; 24: 135-136.

PUSZTAI, A. Plant Lectins. **Chemistry & Pharmacology of Natural Products**, Cambridge University Press, Cambridge, 1991; 253 p.

RAMOS, SAF.; SILVA, LCN.; CORREIA, MTS.; ARAÚJO, JM.; COELHO, LCBB. Endophytic microorganisms from *Bauhinia monandra* leaves: Isolation, antimicrobial activities and interaction with galactose-specific lectin BmoLL. **African Journal of Microbiology Research**, Vol. 10(17), pp. 600-607, 7 May, 2016

SANTOS APG, SILVA AF, FRANÇA CRRS, OLIVEIRA DS, SANTOS F. C.; OLIVEIRA APD. **Teor de ácido cianídrico em variedades de mandioca cultivadas. In: I Congresso brasileiro de recursos genéticos.** 2010, Salvador. Bancos de germoplasma: descobrir riqueza, garantir o futuro, 2010.

SALLES HO, BRAGA ACL, NASCIMENTO MTSC, SOUSA AMP, LIMA AR, VIEIRA LS, CAVALCANTE ACR, EGITO AS, ANDRADE LBS. Lectin, hemolysin and protease inhibitors in seed fractions with ovicidal activity against *Haemonchus contortus*. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, 2014; 23(2): 136-143.

SANTOS NDL, MOURA KSM, NAPOLEÃO TH, SANTOS GKN, COELHO LCBB, NAVARRO DMAF, PAIVA PMG. Oviposition-Stimulant and Ovicidal Activities of *Moringa oleifera* Lectin on *Aedes aegypti*. **PLoS ONE**, 2012; 7: 1-8.

SILVA HC, BARI AU, ROCHA BAM, NASCIMENTO KS, PONTE EL, PIRES AF, DELATORRE P, TEIXEIRA EH, DEBRAY H, ASSREUY AMS, NAGANO CS, CAVADA BS. Purification and primary structure of a mannose/glucose-binding lectin from *Parkia biglobosa* Jacq. seeds with antinociceptive and anti-inflammatory properties. **J Mol Recognit**, 2013; 26: 470–478.

SILVA MC, CORRÊA AD, SANTOS CD, MARCOS FCA, ABREU CMP. Extração da lectina da folha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e o efeito de cátions divalentes na atividade hemaglutinante. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, 2010B; 30: 103-107.

SILVA MC, CORRÊA AD, SANTOS CD, MARCOS FCA, ABREU CMP. Partial purification of leaf lectin from *Manihot esculenta* and screening its fungicidal activity. **Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development** 2010A; 2: 136-141.

SILVA MCC, SANTANA LA, MENTELE R, FERREIRA R S, MIRANDA A, SILVA-LUCCA RA, SAMPAIO MU, CORREIA MTS, OLIVA MLV. Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from *Bauhinia forficata* seeds. **Process Biochemistry**, 2012; 47: 1049–1059.

SILVA, J, FERREIRA FILHO JR. **Produção de biomassa de mandioca.** Documentos 34, Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2007. [Documentos On line]

SOUZA MA, AMÂNCIO-PEREIRA F, CARDOSO CRB, SILVA AG, SILVA EG, ANDRADE LR, PENA JDO, LANZA H, AFONSO-CARDOSO SR. Isolation and Partial Characterization of a D-GalactoseBinding Lectin from the Latex of *Synadenium carinatum*. **Braz. Arch of Biol and Tech**, 2005; 48(5): 705-716.

SOUZA JD, SILVA MBR, ARGOLO ACC, NAPOLEÃO TH, SÁ RA, CORREIA MTS, PAIVA PMG, SILVA MDC, COELHO LCBC. A new Bauhinia monandra galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 2011; 65: 696-702.

SILVA AF, OLIVEIRA DS, SANTOS APG, SANTANA LM, OLIVEIRA APD. Comportamento de variedades de mandioca submetidas a fertilização em comunidades dependentes de chuva no semiárido brasileiro. **Rev. Bras. de Agroecologia**, 2013; 8: 221-235.

SILVA AF, SILVA MCBC. AGRICULTURA NO NORDESTE SEMIÁRIDO E OS RESÍDUOS ORGÂNICOS APROVEITÁVEIS. **Revista Equador**, v. 5, p. 102-119, 2016.

SILVA AF, SANTANA LM, FRANÇA CRRS, MAGALHÃES CAS, ARAÚJO CR, AZEVEDO SG. Produção de diferentes variedades de mandioca em sistema agroecológico. **R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental**, 2009; 13: 33–38.

SILVA AF, SANTOS CAF, ARAUJO FP, LIMA NETO FP, MOREIRA JN, FERREIRA MAJF, LEAO PCS, DIAS RCS, ALBUQUERQUE SG. Recursos genéticos vegetais conservados na Embrapa Semiárido. In: SA, I. B.; SILVA, P. C. G. da. (Ed.). **Semiárido brasileiro: pesquisa, desenvolvimento e inovação**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2010. cap. 8, p. 274-315.

SILVA J, FERREIRA FILHO JR. **Produção de biomassa de mandioca**. EMBRAPA-CNPMF, 2007; 2 p. Documentos, 34.

SILVA HSA, OLIVEIRA SAS, HADDAD F. Uso de imagens digitalizadas em metodologias de seleção para resistência à podridão radicular de mandioca - Dados eletrônicos. Embrapa-CNPMF, 2011. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 54.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI FILHO, S.; PINHEIRO, M. L. B.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. **Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens bentham***. ACTA AMAZONICA, V. 34 (2), 185 – 195, 2004.

SOUZA, R. D.; MENDONÇA, E. A. F.; SOARES, M. A. **Atividade antagônica a microrganismos patogênicos por bactérias endofíticas isoladas de *Echinodorus scaber Rataj***. *Summa Phytopathol.*, Botucatu, v. 41, n. 3, p. 229-232, 2015.

SOUZA, S. A.; XAVIER, A. A.; COSTA, M. R.; CARDOSO, A. M. S.; PEREIRA, M. C. T.; NIETSCHE, S. **Endophytic bacterial diversity in banana ‘Prata Anã’ (*Musa spp.*) roots**. *Genetics and Molecular Biology*, 36, 2, 252-264, 2013.

SUZUKI, M.T. **Isolamento, identificação e Caracterização de linhagens endofíticas de *Bacillus thuringiensis* mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. 2006. 102f. Dissertação (mestrado em Interunidades em Biotecnologia) - Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

TEIXEIRA, M. A.; MELO, I. S.; VIEIRA, R. F. **Diversidade de bactérias endofíticas na cultura da mandioca** – Jaguariúna : Embrapa meio Ambiente, (Embrapa Meio Ambiente. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 33), 22 p, 2005.

VALLE TL, CARVALHO CRL, RAMOS MTB, MUHLEN GS, VILLELA OV. **Conteúdo cianogênico em progênies de mandioca originais do cruzamento de variedades mansas e bravas**. Vol. 63, Bragantia: Campinas; 2004.

VAN DAMME EJ, PEUMANS WJ, PUSZTAI A, BARDOCZ S. **Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications**. John Wiley & Sons; 1998.

VIEIRA EA, FIALHO JF, SILVA MS, FUKUDA WMG, FALEIRO FG. Variabilidade genética do banco de germoplasma de mandioca da Embrapa cerrados acessada por meio de descritores morfológicos. **Científica**, 2008; 36: 56-67.

VIEIRA EA, FIALHO JF, FALEIRO FG, BELLON G, FONSECA KG, SILVA MS, PAULA-MORAES SV, CARVALHO LJCB. Caracterização fenotípica e molecular de acessos de mandioca de indústria com potencial de adaptação às condições do Cerrado do Brasil Central. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 2, p. 567-582, mar./abr. 2013.

WHITE WLB, ARIAS-GARZON DI, MCMAHON JM, SAYRE RT. Cyanogenesis in Cassava: The Role of Hydroxynitrile Lyase in Root Cyanide Production. **Plant Physiol**, 1998; 116: 1219–1225.

YOUSTEN, A. A. **Bacillus sphaericus: microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide**. *Advances in Biotechnology Processes*, v.3, p.315-343, 1984.

ANEXO 1 – NORMAS DO PERIÓDICO ADVANCES IN RESEARCH

Journal of Advances in Mathematics and Computer Science

xx(x):, 20yy; Article no.JAMCS.xxxxx

ISSN: 2456-9968

(Past name: British Journal of Mathematics & Computer Science, Past ISSN: 2231-0851)

Type the title here Type the title here Type the title here

Author1¹ and author2²

¹Type full address here,

Type full address here

²Type full address here,

Type full address here,

Type full address here

Type of Article

Received: XX December 20XX

Accepted: XX December 20XX

Online Ready: XX December 20XX

Abstract

Aims/ objectives: To correlate platelet count, splenic index (SI), platelet count/spleen diameter ratio and portal-systemic venous collaterals with the presence of esophageal varices in advanced liver disease to validate other screening parameters.

Study design: Cross-sectional study.

Place and Duration of Study: Department of Medicine (Medical Unit IV) and Department of Radiology, Services Institute of Medical Sciences (SIMS), Services Hospital Lahore, between June 2009 and July 2010.

Methodology: We included 63 patients (40 men, 23 women; age range 18-75 years) with liver cirrhosis and portal hypertension, with or without the medical history of gastrointestinal bleeding. Clinical as well as hematological examination (platelet count) and ultrasonography (gray as well as color Doppler scale including splenic index and splenorenal/pancreaticoduodenal collaterals) was done.

Results: Out of 63 patients, 36 patients with small varices (F1/F2) and 27 with larger (F3) varices were detected on endoscope. Significant increase in mean splenic index from low (86.7 +/- 27.4) to high (94.7 +/- 27.7) grade varices was documented.

Conclusion: Non-invasive independent predictors for screening esophageal varices may decrease medical as well as financial burden, hence improving the management of cirrhotic patients. These predictors, however, need further work to validate reliability.

Keywords: Divine; Bach; Weyl; Yang; Ricci; eigenvalue; Divine-Einstein

2010 Mathematics Subject Classification: 53C25; 83C05; 57N16

⁴Corresponding author: E-mail: abc@abc.com

1 Introduction

Provide a factual background, clearly defined problem, proposed solution, a brief literature survey and the scope and justification of the work done. [(4)].

1.1 Sub-heading

Provide a factual background, clearly defined problem, proposed solution, a brief literature survey and the scope and justification of the work done, objective, etc.

2 Section 2 OR Materials and Methods

Give adequate information to allow the experiment to be reproduced. Already published methods should be mentioned with references. Significant modifications of published methods and new methods should be described in detail. This section will include sub-sections. "Tables" & "figures" should be placed inside the text. "Tables" and "figures" should be presented as per their appearance in the text. It is suggested that the discussion about the tables and figures should appear in the text before the appearance of the respective tables and figures. No tables or figures should be given without discussion or reference inside the text. Tables should be explanatory enough to be understandable without any text reference. Double spacing should be maintained throughout the table, including table headings and footnotes. Table headings should be placed above the table. Footnotes should be placed below the table with superscript lowercase letters. Each figure should have a caption. The caption should be concise and typed separately, not on the figure area. Figures should be self-explanatory. Information presented in the figure should not be repeated in the table. All symbols and abbreviations used in the illustrations should be defined clearly. Figure legends should be given below the figures.

Examples of some equations are given below:

Definition 2.1. An Einstein manifold (N, g) intimated with a Divine structure (g, G) is called a Divine Einstein manifold. Thus a triple (N, g, G) in which an Einstein metric g and a Divine structure G compatible with g are involved, is called a Divine Einstein manifold.

With the aid of the propositions (2.1) & (1.1) of [(7)] and [(2)] respectively, we can prove the following:

Proposition 2.1. A Divine Einstein manifold (N, g, G) bears the property

$$G^n = F_n G_j^2 + F_{n-1} \delta_j^2, \quad (2.1)$$

for any integer number $n > 0$. Here $(F_n)_n$ is the well known Fibonacci sequence.

Proof. From equation (??), it is easy to get

$$G^2 = 2G_j^2 + \delta_j^2,$$

and in general, if we suppose that

$$G^{n+1} = F_n G^2 + F_{n-1} (G_j^2 + \delta_j^2) = (F_n + F_{n-1}) G_j^2 + F_n \delta_j^2,$$

which due to Fibonacci properties evidently produces (2.1). \square

Proposition 2.2. The Divine Einstein structure (g, G) defined for an n -dimensional Einstein manifold (K, g) bears the trace property given as

$$\text{trace}(G^2) = \text{trace}(G) + n. \quad (2.2)$$

Proof. The equation (2.2) can be evidently derived from (??), if we operate (??) by trace operator and note that $\text{trace } g_j^j = n$. However, if we use the concept of orthonormal basis (E_1, E_2, \dots, E_n) of tangent space $T_x(K)$ at a point $x \in K$ [7], we have from (??)

$$g(G^i E_i, E_i) = g(G E_i, E_i) + g(E_i, E_i). \quad (2.3)$$

Summing (2.3) with respect to i , the equation (2.2) automatically set up. \square

It is very clear that the proposition (2.5) of [2] also holds good in our case, i.e.,

2.1 Sub-heading

Provide a factual background, clearly defined problem, proposed solution, a brief literature survey, etc.

Examples of some equations are given below:

Proposition 2.3. The projector operators L_1 and L_2 defined on a Divine Einstein manifold satisfy the conditions:

$$L_1 + L_2 = \delta_j^j, \quad L_1^2 = L_1, \quad L_2^2 = L_2 \quad (2.4)$$

and

$$G_j^i \circ L_1 = L_2 \circ G_j^i = (1 - \phi)L_1, \quad G_j^i \circ L_2 = L_1 \circ G_j^i = \phi L_2, \quad (2.5)$$

where

$$L_1 = \frac{1}{\sqrt{\phi}}(\phi \delta_j^j - G_j^j), \quad \text{and } L_2 = \frac{1}{\sqrt{\phi}}((\phi - 1)\delta_j^j + G_j^j). \quad (2.6)$$

Here, for every $x \in K$, the projectors L_1 & L_2 for two complementary distributions D^{1_1} and D^{1_2} respectively are defined to be the systems of C^∞ -tensor fields of the type $(1, 1)$ and will be given by the relations;

$$\pi_i(x) : D^{1_1}(x) \rightarrow D^{1_1}(x), \quad \sum_{i=1}^k \pi_i = I, \quad \pi_i \pi_j = \delta_j^i \pi_i \quad (2.7)$$

and

$$\pi_i(x) : D^{1_2}(x) \rightarrow D^{1_2}(x), \quad \sum_{i=1}^k \pi_i = I, \quad \pi_i \pi_j = \delta_j^i \pi_i. \quad (2.8)$$

In order to discuss the conformally Divine Einstein manifolds, let us define the conformal Divine structure as follows:

3 Section 3 OR Results and Discussion

Results should be clearly described in a concise manner. Results for different parameters should be described under subheadings or in separate paragraph. Table or figure numbers should be mentioned in parentheses for better understanding. The discussion should not repeat the results, but provide detailed interpretation of data. This should interpret the significance of the findings of the work. Citations should be given in support of the findings. The results and discussion part can also be described as separate, if appropriate.

3.1 Sub-heading

Provide a factual background, clearly defined problem, proposed solution, a brief literature survey, etc.

Examples of some equations are given below: Tables & figures should be placed inside the text. Tables and figures should be presented as per their appearance in the text. It is suggested that the discussion about the tables and figures should appear in the text before the appearance of the respective tables and figures. No tables or figures should be given without discussion or reference inside the text. Tables should be explanatory enough to be understandable without any text reference. Double spacing should be maintained throughout the table, including table headings and footnotes. Table headings should be placed above the table. Footnotes should be placed below the table with superscript lowercase letters. Sample paper format is given in Table 1 and Table 2.

Table 1: Physical, chemical and biological properties of experimental soil (0-20 cm)

Particulars	Value	Methods
Sand (%)	61.3	Pipette Method (Piper, 1966)
Silt (%)	21.4	
Clay (%)	17.3	
Bulk density, Mg m ⁻³	1.64	Core Sampler (Piper, 1966)
pH (1 : 2.5: Soil : Water)	5.20	Glass Electrode pH Meter (Jackson, 1973)
Organic carbon (g kg ⁻¹)	2.9	Glass Electrode pH Meter (Jackson, 1973)
Total N, %	0.048	Modified Kjeldahl Method (Chapman and Pratt, 1961)

*Moisture content on oven dry weight basis

Table 2: Physical and chemical properties of organic and industrial wastes used in the experiments

Particulars	Organic wastes		Industrial wastes	
	Farmyard manure	Water hyacinth	Paper factory sludge	Rice husk ash
Colour	Brownish black	Brownish black	Blackish ash	Blackish ash
Basic organic material	Crop wastes and cow dung	Whole plant water hyacinth	Wastes of paper factory	Rice husk
Texture	Small lumps	Dried leafy	Coarse lumpy dust	Coarse dust
Bulk density, Mg m ⁻³	0.48	0.43	0.58	0.43
pH**	5.54	5.35	5.88	7.57
Organic carbon, %	20.9	21.5	25.2	4.89
N, %	0.83	1.23	0.71	0.06
P, %	0.28	0.38	0.16	0.31
K, %	0.65	2.09	0.30	0.14
C:N	25:1	17:1	36:1	92:1

*Oven dry weight basis; **Material : Water = 1:3

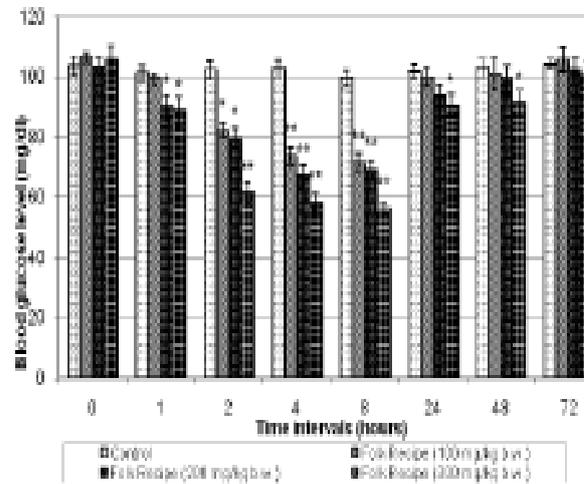


Figure 1: Effect of different doses of aqueous extract of Folk Recipe (100, 200, 300 mg/kg) on blood glucose levels at different time intervals in normal rabbits
 Test drugs: significant from normal control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$
 Mean \pm S.E.M = Mean values \pm Standard error of means of six experiments

4 CONCLUSIONS

This should briefly state the major findings of the study. It is advisable that they should be explained pointwise. Some examples are given below.

- a. In the section (1), a brief digest on the historical evolution and applications of Divine number has been discussed.
- b. In the subsection (3.1), we have studied the development of Divine structure and various algebraic as well as geometric features of this beautiful structure. The Golden Riemann structure has also been delineated.

Acknowledgment

A brief acknowledgment section may be given after the conclusion section just before the references. The acknowledgments of people who provided assistance in manuscript preparation, funding for research, etc. should be listed in this section.

References

- [1] Bergman, J. (2004). Conformal Einstein spaces and Bach tensor generalizations in n dimensions. Institute of Technology, Linköping University, Sweden (published Ph. D thesis No. 1113).

-
- [2] Crăsmăreanu, M. and Hraţcanu, C-E. (2008). Golden differential geometry. *Chaos, Solitons & Fractals*, 38(5), 1229–1238.
- [3] Fischler, R-H. (2000). *The Shape of the Great Pyramid* Waterloo, Ontario: Wilfrid Laurier University Press.
- [4] Fischler, R-H. (1998). *A Mathematical History of the Golden Number*. Dover Publications.
- [5] Goldberg, S-I and Yano, K. (1970). Polynomial structures on manifolds. *Kodai Math. Sem. Rep.*, 22 (MR 42#2380), 199–218.
- [6] Goldberg, S-I and Petrică, N-G. (1973). Differentiable solutions of algebraic equations on manifolds. *Kodai Math Sem. Rep.* 25, 111-128.
- [7] Hraţcanu, C-E. and Crăsmăreanu, M. (2009). Applications of the Golden Ratio on Riemannian Manifolds. *Turk J Math* 33 (doi:10.3906/mat-0711-29), 179-191.
- [8] Hraţcanu, C-E. and Crăsmăreanu, M. (2007). On some invariant submanifolds in Riemannian manifold with Golden Structures. *Scientific Annals of Alexandru Ioan Cuza University - Mathematics, Iasi, Romania, s. I-a, Math.* 53, 199-211.
- [9] Hraţcanu, C-E. (2007). Submanifolds in Riemannian manifold with Golden Structures. In: *Workshop on Finsler geometry and its applications*, Hungary.
- [10] Livo, M. (2002). *The Golden Ratio: The Story of phi, the World's Most Astonishing Number*. Broadway, MR 2003k:1025.
- [11] Miron, R. and Anastasiei, M. (1994). *The geometry of Lagrange spaces: theory and applications*. Kluwer Academic Publishers FTPH No. 59, MR 95t: 53120.
- [12] Perkins, K. (2008). *The Cartan-Weyl conformal geometry of a pair of second order partial differential equations*. University of Pittsburgh, *Unpublished Ph.D thesis*.
- [13] Seichi, I. and Akifumi, K. (2008). Golden duality in dynamic optimization. In: *Proceedings of kosen workshop MTE2008-mathematics, technology and education-Ibataki national college of technology Hitachinaka, Ibaraki, Japan: February 15–18*.
- [14] Yano, K. and Kon, M. (1994). *Structures on Manifolds*. World Scientific, Singapore, Series in pure mathematics, 3.
- [15] Encyclopedia. (2011). Golden ratio. http://en.wikipedia.org/wiki/Golden_ratio. (Last accessed on 18 January 2011 at 12:02).

[References should be listed alphabetically at the end of the manuscript. Every reference related in the text must also present in the reference list and vice versa.

Articles submitted for publication, unpublished findings and personal communications should not be included in the reference list but may be mentioned in the text (e.g., T. Nelson, Purdue University, USA, Unpublished results or personal communication). Standard reference style of the journal should be followed to include these references in the reference list. Unpublished result which has been accepted for publication in any journal should be cited as "in press". When two or more works published in different years by author(s), references should be cited first alphabetically then chronologically.

All references should follow the following style:

For single author: the author's name followed by the year of publication;

For two authors: both authors' names followed by the year of publication;

For more than two authors: first author's name followed by "et al." and the year of publication.

e.g., Brown, A. (2003, 2005); Brown, A., Nelson, R. (2003).

When two or more works of an author has been published during the same year, the reference should be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication. This should be followed both in the text and reference list. e.g., Hilly, P. (2002a, 2002b); Hilly, A., Nelson, R. (2004).

Examples:

Reference to a journal publication: Hilly, M., Adams, M., Nelson, S.C. (2009). Potential fly-ash utilization in agriculture. *Progress in Natural Sci.*, 19, 1173-1186.

Reference to a book: Brown, W., White, S.R. (1985). *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book: Mottam, G.R., Adams, L.B. (1999). How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281304.].

©2011 Author(s). This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ANEXO 2 – NORMAS DO PERIÓDICO MICROBIOLOGICAL RESEARCH



MICROBIOLOGICAL RESEARCH

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Audience	p.1
•	Impact Factor	p.1
•	Abstracting and Indexing	p.2
•	Editorial Board	p.2
•	Guide for Authors	p.4



DESCRIPTION

Microbiological Research is devoted to publishing reports on prokaryotic and eukaryotic microorganisms such as yeasts, fungi, bacteria, archaea, and protozoa. Research on interactions between pathogenic microorganisms and their environment or hosts are also covered. The research should be original and include molecular aspects to generate a significant contribution of broad interest. Papers of rather specialised or of preliminary and descriptive content will normally not be considered. Studies in the following sections are included:

Reviews/Minireviews on all aspects Microbiology and Genetics Molecular and Cell Biology Metabolism and Physiology Signal transduction and Development Biotechnology Phytopathology Environmental Microbiology and Ecology

AUDIENCE

Microbiologists, biotechnologists, phytopathologists, researchers in molecular biology, researchers in agricultural and environmental sciences, biochemists, cellbiologists, biotechnologists, geneticists, ecologists, forest scientists, limnologists, agriculturists, specialists in plant cultivation

IMPACT FACTOR

2021: 5.070 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2022

ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS Citation Index
 Chemical Abstracts
 Current Advances in Protein Biochemistry
 Current Advances in Genetics and Molecular Biology
 Current Contents - Agriculture, Biology & Environmental Sciences
 CAB International
 Chemical Engineering and Biochemical Abstracts (CEBA)
 Elsevier BIOBASE
 Engineering Information Compendex
 Field Crop Abstracts
 GEO
 Horticultural Abstracts
 PubMed/Medline
 NISC - National Information Services Corporation
 Research Alert
 Review of Medical and Veterinary Mycology
 Science Citation Index
 Science Citation Index Expanded
 Web of Science
 Scopus
 Soils and Fertilizers
 Weed Abstracts

EDITORIAL BOARD

Co-Editors-in-Chief

Gerardo Puopolo, University of Trento Center Agriculture Food Environment, Via Edmund Mach, 1, 38010, Trento, Italy

Xiaohui Zhou, University of Connecticut Department of Pathobiology and Veterinary Science, 61 N. Eagleville Rd, 06269-3089, Storrs, Connecticut, United States of America

Senior Editors

Gurusamy Anandurai, Manonmaniam Sundaranar University, 627012, Tirunelveli Sub-district, India

Xiaonan Lu, Université McGill, Sherbrooke Street West Qc H3a 2t7 855 - rue de Mon, Montreal, Quebec, Canada

Xue-Song Zhang, New York University Grossman School of Medicine, 10016, New York, New York, United States of America

Associate Editors

Siddhardha Busi, Pondicherry University, School of Life Sciences, Department of Microbiology, Puducherry, Puducherry, India

Vittorio Capozzi, Institute of Sciences of Food Production National Research Council, Bari, Italy

Massimiliano Cardinale, University of Salento Department of Biological and Environmental Sciences and Technologies, Lecce, Italy

Thamy Livia Ribeiro Correa, Biorenewables National Laboratory, Campinas, Brazil

Daniele Daffonchio, University of Milan Department of Food Environmental and Nutritional Sciences, Milano, Italy

Christopher Dunlap, USDA-ARS National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, Illinois, United States of America

Paulina Estrada de los Santos, National Polytechnic Institute National School of Biological Sciences, Ciudad de Mexico, Mexico

Jorge Luis Folch-Mallol, UAEM Biotechnology Research Centre, Cuernavaca, Mexico

Carlos Manuel Franco Abuin, University of Santiago de Compostela, Department. of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, Food Inspection and Control Hygiene Laboratory, Lugo, Spain

Filippo Fratini, University of Pisa, Pisa, Italy

Chirlei Glienke, Federal University of Parana Department of Genetics, CURITIBA, Brazil

En Huang, University of Arkansas for Medical Sciences, Little Rock, Arkansas, United States of America

Mohamed Jebbar, European Institute for Marine Studies, Plouzane, France

Linghuo Jiang, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu, China

Mohan Chandra Joshi, Multidisciplinary Centre for Advanced Research and Studies, New Delhi, Delhi, India

Fu-Cheng Lin, Zhejiang University Library, Hangzhou, China

Wei Lin, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China

Xiao-Hong Liu, Zhejiang University Library, Hangzhou, China

Alexander Lorenz, University of Aberdeen Institute of Medical Sciences, Aberdeen, United Kingdom

Rebeca Martínez-Contreras, Autonomous University of Puebla Center for Microbiology Research, Puebla, Mexico

Justyna Hozejko-Ciesielska, University of Warmia and Mazury In Olsztyn, Department of Microbiology and Mycology, Olsztyn, Poland

Govarthanan Muthusamy, Kyungpook National University, Daegu, South Korea

Maria Carolina Quecine, University of Sao Paulo Lutz de Queiroz College of Agriculture, Piracicaba, Brazil

Gustavo Santoyo Pizano, UMich Institute of Chemical Biological Research, Morelia, Mexico

Christoph Schöller, Institute of Applied Genetics and Cell Biology, Wien, Austria

Haoyu Si, University of Maryland Baltimore, Baltimore, Maryland, United States of America

Palanivel Velmurugan, Jeonbuk National University, Jeonju-si, South Korea

Jay Prakash Verma, Banaras Hindu University Institute of Environment & Sustainable Development, Varanasi, India

Lianrong Wang, Wuhan University School of Pharmaceutical Sciences, Wuhan, China

Qiyao Wang, East China University of Science and Technology, Shanghai, China

Zhenzhong Yu, Nanjing Agricultural University College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing, China

Changyi Zhang, University of Illinois Urbana-Champaign, Champaign, Illinois, United States of America

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Microbiological Research is devoted to publishing reports on prokaryotic and eukaryotic microorganisms such as yeasts, fungi, bacteria, archaea, and protozoa. Research on interactions between pathogenic microorganisms and their environment or hosts are also covered. The research should be original and include molecular aspects to generate a significant contribution of broad interest. Papers of very specialised or of preliminary and descriptive content will normally not be considered.

Studies in the following sections are included:

- Reviews/Minireviews on all aspects
- Microbiology and Genetics
- Molecular and Cell Biology
- Metabolism and Physiology
- Signal transduction and Development
- Biotechnology
- Phytopathology
- Environmental Microbiology and Ecology

Types of paper

Four types of peer-reviewed papers will be published:

- Research articles on reports on any aspects of microbiological research. Original articles should not exceed 8000 words in length. The word count is from the introduction through to the end of the conclusion/discussion and does not include abstract, tables, figures, acknowledgements or reference list.
- Reviews on topics of importance to readers in diverse geographic areas. These should be comprehensive and fully referenced. Article requirements: Word count for the main part of the manuscript from introduction to conclusion/ discussion: 4000 to max of 8000 words.
- Correspondence relating to papers recently published in the Journal, or containing brief reports of unusual or preliminary findings. Maximum length 1000 words, two tables or figures and a maximum of 20 references.
- Letters to the Editor: Please be informed that we reserve Letters to the Editor to comments on papers previously published by MICRES. If you are reporting original data, please ensure that Article type is set to Research paper.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information on [Ethics in publishing](#).

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double anonymized) or the manuscript file (if single anonymized). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify compliance, your article may be checked by [Crossref Similarity Check](#) and other originality or duplicate checking software.

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. When coding terminology is used, we recommend to avoid offensive or exclusionary terms such as "master", "slave", "blacklist" and "whitelist". We suggest using alternatives that are more appropriate and (self-) explanatory such as "primary", "secondary", "blocklist" and "allowlist". These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example](#).

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal uses the Elsevier Article Transfer Service to find the best home for your manuscript. This means that if an editor feels your manuscript is more suitable for an alternative journal, you might be asked to consider transferring the manuscript to such a journal. The recommendation might be provided by a Journal Editor, a dedicated *Scientific Managing Editor*, a tool assisted recommendation, or a combination. If you agree, your manuscript will be transferred, though you will have the opportunity to make changes to the manuscript before the submission is complete. Please note that your manuscript will be independently reviewed by the new journal. [More information](#).

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information on this](#)). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement, it is recommended to state this.

Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <https://www.editorialmanager.com/micres/>.

Suggesting reviewers

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential reviewers.

You should not suggest reviewers who are colleagues, or who have co-authored or collaborated with you during the last three years. Editors do not invite reviewers who have potential competing interests with the authors. Further, in order to provide a broad and balanced assessment of the work, and ensure scientific rigor, please suggest diverse candidate reviewers who are located in different countries/regions from the author group. Also consider other diversity attributes e.g. gender, race and ethnicity, career stage, etc. Finally, you should not include existing members of the journal's editorial team, of whom the journal are already aware.

Note: the editor decides whether or not to invite your suggested reviewers.

PREPARATION

Queries

For questions about the editorial process (including the status of manuscripts under review) or for technical support on submissions, please visit our [Support Center](#).

Peer review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review](#).

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor. Number pages and lines consecutively throughout the manuscript.

Article structure

Subdivision - unnumbered sections

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

Please see an example at the following link:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501320305401>

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. Further information on the preparation of electronic artwork.

Illustration services

Elsevier's Author Services offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, Crossref and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambek W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Preprint references

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, the formal publication should be used as the reference. If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but are not yet formally published, these may be referenced. Preprints should be clearly marked as such, for example by including the word preprint, or the name of the preprint server, as part of the reference. The preprint DOI should also be provided.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use

reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software.](#)

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999)... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51-59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr, W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. *Cancer statistics reports for the UK*. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Reference to software:

Coon, E., Berndt, M., Jan, A., Svyatsky, D., Atchley, A., Kikinzon, E., Harp, D., Manzini, G., Shelef, E., Lipnikov, K., Garimella, R., Xu, C., Moulton, D., Karra, S., Painter, S., Jafarov, E., & Molins, S., 2020. *Advanced Terrestrial Simulator (ATS) v0.88 (Version 0.88)*. Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.3727209>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal requires and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. When sharing data in one of these ways, you are expected to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data page](#).

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into a data article published in *Data in Brief*. A data article is a new kind of article that ensures that your data are actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and made publicly available to all upon publication (watch this [video](#) describing the benefits of publishing your data in *Data in Brief*). You are encouraged to submit your data article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed, published open access and linked to your research article on ScienceDirect. Please note an open access fee is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use this [template](#) to write your *Data in Brief* data article.

Data statement

To foster transparency, we require you to state the availability of your data in your submission if your data is unavailable to access or unsuitable to post. This may also be a requirement of your funding body or institution. You will have the opportunity to provide a data statement during the submission process. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE

Availability of accepted article

This journal makes articles available online as soon as possible after acceptance. This concerns the Journal Pre-proofs (both in HTML and PDF format), which have undergone enhancements after acceptance, such as the addition of a cover page and metadata, and formatting for readability, but are not yet the definitive versions of record. A Digital Object Identifier (DOI) is allocated, thereby making it fully citable and searchable by title, author name(s) and the full text. The article's PDF also carries a disclaimer stating that it is an unedited article. Subsequent production stages will simply replace this version.

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via [Elsevier's Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on [ScienceDirect](#) and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from [Frequently Asked Questions](#) to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or [find out when your accepted article will be published](#).

ANEXO 3 – NORMAS DO PERIÓDICO ENVIRONMENTAL TECHNOLOGY

AUTHORSERVICES
Supporting Taylor & Francis authors

 Taylor & Francis Group
an informa business

Writing your paper

Everything you need to know to prepare and write an effective research paper



Guidance, developments, news, and ideas for Taylor & Francis authors

 @tandfonline  TaylorandFrancisGroup  authorservices.taylorandfrancis.com

CONTENTS

/ INTRODUCTION	4	Write the discussion and conclusions	19
/ WRITING YOUR PAPER CHECKLIST	5	Write the introduction	20
/ WHERE TO START	6	Write the abstract	21
Make sure you've selected the journal you want to submit to	6	Create a compelling title	22
Understand your target journal's instructions for authors	7		
What information is included in the instructions for authors?	7		
Understand the editorial policies and standards of reporting	8		
Think about the four A's: aims, audience, awareness, and articulation	9		
/ ARTICLE STRUCTURES AND FORMATTING	10	/ REFINING YOUR WRITING: how to create an effective, compelling paper	23
Study your target journal	10	Communicating your ideas effectively	23
IMRAD: Standard structure for a STEM journal	11	Make sure you've stuck to the point	23
Structuring review articles	11	Don't be afraid to explain further	23
Using standard article templates	12	Ensure you've included your unique standpoint	24
Format-free submission	12	State your case with confidence	24
/ CHOOSING KEYWORDS AND WRITING FOR SEO	13	Refining your language and grammar	24
Using keywords	13	Need help? Contact our Editing Services	25
Writing your article with search engine optimization in mind	14		
1. Create a search engine friendly title	14	/ FINALIZING THE DETAILS – from authorship to competing interests	26
2. Optimize your abstract	14	Authorship	26
3. Use keywords throughout your article	14	Standards of reporting	27
		Competing interests	27
		What is categorized as a competing interest?	28
		Use of third party material	29
		Patient and study participant consent	29
		Using mathematical scripts and special characters	29
/ HOW TO WRITE YOUR MANUSCRIPT – a step-by-step guide	16	/ CONSIDERING ETHICS – a final submission checklist	30
Prepare tables and figures (if required)	16		
Write up the literature review (if required)	17	/ GLOSSARY	31
Write the method	17		
Write up your results	18	/ WHERE TO NEXT?	22

/ INTRODUCTION

No matter which subject area you specialize in, publishing the results of your research is a critical part of your academic career. But writing an academic paper can feel like a daunting task – there's nothing worse than staring at a blank screen after all.

This guide will take you through all the stages of writing your paper, from preparation and structure, through to writing each section of the paper, and beyond.

By following the advice and guidance here, you'll be able to produce a paper that's a great fit for your chosen journal.



/ WHERE TO START

You've completed your research and now it's time to write it up. But where do you start? Here we've laid out the first four critical steps to help you begin your write-up the right way.

1 Make sure you've selected the journal you want to submit to

One of the biggest mistakes you can make is to start writing up your research without first choosing the journal you want it to be published in.

How you write your paper, from the style and structure to the audience you should have in mind while writing, and even the article length, will depend on which journal you're targeting. Choosing the journal before you start writing also means you can tailor your work to build on research that's already been published there. This can help editors to see how a paper adds to the 'conversation' in their journal.

To help you with this crucial step, take a look at our guide on [selecting the right journal for your research](#).



WRITING YOUR PAPER CHECKLIST

Work your way through this checklist, using the contents of this guide, to help you find the best journal for your work.

- Choose your target journal
- Understand the journal's instructions for authors
- Familiarize yourself with editorial policies and standards of reporting
- Consider the four A's: aims, audience, awareness, and articulation
- Determine your article structure
- Choose your keywords and learn how to write for SEO
- Write up your manuscript:
 - Prepare tables and figures (if required)
 - Write up the literature review (if required)
 - Write the method
 - Write up your results
 - Write the discussion and conclusions
 - Write the introduction
 - Write the abstract
 - Create a compelling title
- Edit and refine your completed manuscript
- Check the editorial policies and instructions for authors to ensure you've included everything required by the journal



2 Understand your target journal's instructions for authors

Once you've chosen your target journal, you need to understand what they're looking for in papers submitted to them. And the first place to look is the instructions for authors (IFAs). These are an individual set of requirements for a journal that help guide potential authors to construct their article in the correct way and prepare it for submission.

They will tell you exactly what the journal's editorial board expects to see in articles submitted to the journal. And the IFAs will also include details of specific processes to follow to ensure there are no problems during production should your article be accepted.



What information is included in the instructions for authors?

The instructions for authors include all the essential information you'll need to know before you submit your article, for example:

- ✔ General guidelines, like which online submission system you need to use, and which languages the journal publishes in
- ✔ Word count
- ✔ Formatting and whether article templates can be used
- ✔ Style guides
- ✔ Specific policies relating to the journal, such as clinical trial registry or ethics compliance
- ✔ Open access options

By following these guidelines you'll know your article is in exactly the right format for submission and includes everything the editorial board would like to see.

You can find the IFAs for any Taylor & Francis journal on the journal's home page via [Taylor & Francis Online](#).

ARTICLE STRUCTURES AND FORMATTING

Depending on your subject, research focus, journal choice, and any number of other considerations, the type of article you write could vary widely.

STEM research articles tend to follow a similar structure, while Humanities and Social Sciences (HSS) articles vary. You could also be considering writing a review article, case study, technical note, or case report.

Given this variation, there's no set formula for structuring your article. But we've provided some hints and tips here to get you started.

Study your target journal

The best way to determine how to structure your article is to study your target journal. Look through the journal's instructions for authors, as discussed above, but also read through back issues of the journal. This will enable you to review how other articles like the one you intend to write are structured.

Structuring review articles

A review article, also called a literature review, is a survey of previously published research on a topic. A good review article will give an overview of current thinking on the chosen topic and, unlike an original research article, won't present new experimental results. As a result, review article structure is a little different.

While review articles can vary, a typical review article will include:

- Abstract
- Introduction
- Literature review
- Critical discussion
- Conclusions

For some in-depth tips on writing review articles take a look at the [dedicated page on our website](#).



IMRAD: Standard structure for a STEM journal

If you're writing a STEM article, the chances are that the journal will use the 'IMRAD' structure for standard research articles. IMRAD covers the structure of the body of the research manuscript (after the Title and Abstract). This consists of:

The aims and scope statement includes:

- Introduction
- Method
- Results
- And
- Discussion and Conclusions

Not all journals use these section titles in this order, but most published STEM articles have a structure similar to IMRAD.

Using standard article templates

Although many journals have basic elements of style in common, each journal can have its own specific formatting. This defines how an article will look when it is published online or in print.

To make this easier, journals often provide templates (for example in Word or LaTeX). Using a template will immediately help you determine how to structure your article correctly. Many of our journals have templates you can simply download. You can find links to these on your chosen journal's homepage on [Taylor & Francis Online](#) under the instructions for authors. Each version of the template has its own instructions file, which explains how to save and use it.



Format-free submission

An increasing number of Taylor & Francis journals allow format-free submission. This means that, as long as you use a consistent citation format and include everything necessary for review, you can submit work without needing to worry about formatting your manuscript to meet that journal's requirements. The instructions for authors for your chosen journal will tell you whether it operates format-free submission.



CHOOSING KEYWORDS AND WRITING FOR SEO

Using keywords

When you submit your article you'll often need to include keywords. These will be used to index your article on the journal or publisher's website, as well as on search engines like Google Scholar.

These keywords will help others find your article quickly and accurately – think of them as the labels for your article. And keywords aren't just about improving your article's discoverability, a strong correlation exists between the online hits an article receives and the subsequent number of citations it receives. So picking your keywords wisely is worth your while.

But how do you choose your keywords?

- Think about how you search for articles yourself and what words or phrases you put in.
- Think about your own article and what keywords are most relevant to the focus of your work.
- Once you've drawn up a shortlist, try searching with them, to ensure the results fit with your article and so you can see how useful they would be to others.
- You can also check and compare specific keywords on Google Trends to see which are the most used.
- If you're still unsure, check the keywords used in your field's major papers.



Not all journals use these section titles in this order, but most published STEM articles have a structure similar to IMRAD.

Writing your article with search engine optimization in mind

Google, Google Scholar, and other search engines drive a huge amount of traffic to journal articles. Journals and their publishers do a lot of work behind the scenes on search engine optimization (SEO), but you can also play a crucial role in optimizing the search results for your article. Ultimately, this will help more people to find, read, and cite your work.

But how can you write for SEO? Here are some tips...

1 Create a search engine friendly title

It's vital to incorporate your most relevant keywords in your title. This will mean your article is more likely to be included in the results for relevant online searches. Ideally, it should include 1-2 keywords related to your topic, and these keywords should be within the first 65 characters of your title so that they're visible in the search engine results.



2 Optimize your abstract

To have the maximum impact in search engines, you should aim to place essential findings and keywords in the first two sentences of your abstract. Only the first two sentences normally display in search engine results, so if you make them enticing and keyword relevant, it should encourage people to click through and read further.

In addition, you should aim to repeat your keywords 2-6 times within your abstract. But try to do this naturally, as the purpose of your abstract is to express the key points of your research, clearly and concisely.

3 Use keywords throughout your article

Keywords aren't just important in your title and abstract. You should aim to ensure you use them consistently throughout your article. In particular, if you're able to incorporate keywords into headings, this will help search engines to understand the content and structure of your article.

However, make sure you let keywords flow naturally and in a contextual way. Search engines dislike too much keyword repetition, known as keyword stuffing, and may 'un-index' your article if it seems keywords are being repeated without context.

14 | AUTHOR SERVICES // Writing your paper

Clear and concise title built around keywords.

Modelling malaria dynamics with partial immunity and protected travellers: optimal control and cost-effectiveness analysis

ABSTRACT

Abstract

A mathematical model of malaria dynamics with naturally acquired transient immunity in the presence of protected travellers is presented. The qualitative analysis carried out on the autonomous model reveals the existence of backward bifurcation, where the locally asymptotically stable malaria-free and malaria-present equilibria coexist as the basic reproduction number crosses unity. The increased fraction of protected travellers is shown to reduce the basic reproduction number significantly. Particularly, optimal control theory is used to analyse the non-autonomous model, which incorporates four control variables. The existence result for the optimal control quadruple, which minimizes malaria infection and costs of implementation, is explicitly proved. Effects of combining at least any three of the control variables on the malaria dynamics are illustrated. Furthermore, the cost-effectiveness analysis is carried out to reveal the most cost-effective strategy that could be implemented to prevent and control the spread of malaria with limited resources.

KEYWORDS: Malaria model, temporary immunity, protected travellers, optimal control, cost-effective analysis

Modeling malaria dynamics with partial immunity and protected travellers: optimal control and cost-effectiveness analysis by S. Oleye, K. O. Odekan, S. O. Adeseye & R. S. Leloko is licensed under CC BY 4.0

Keywords used throughout the abstract in a natural way, without affecting readability.

Five keywords highlighting the main points covered in the article

AUTHOR SERVICES // Writing your paper | 17

HOW TO WRITE YOUR MANUSCRIPT – A STEP-BY-STEP GUIDE

Every article is unique – and as discussed, the structure of your article and the sections it includes will depend on both the type of article you're writing and the subject of study. For example, Humanities and Social Sciences articles may be less likely to include tables and figures or materials.

However, there are several standard sections that many researchers need to tackle when writing a manuscript. We've laid these out below – in the order in which you would normally write them – with hints and tips for making the most of each section.

1 Prepare tables and figures (if required)

They say a picture is worth a thousand words – and you could say the same for a table or figure in a manuscript. They are often the most impactful and efficient way to present your results.

Tables and figures should present new information rather than duplicating what is in the text. And readers should be able to interpret them without reference to the text (although you will need to refer to them in the text).

When creating tables and figures for your article, make sure to check the journal's instructions for authors and editorial policies, which may stipulate on layouts, use of color, and a number of other formatting points.



In particular, it's important to consider the size of each table or figure and whether it will fit on a single journal page. If the table is cramped in a Microsoft Word document, it will undoubtedly be difficult to represent it clearly on a journal page. If this is the case, you could consider splitting the data into two or more tables.

Take a look at our [guidance on creating tables](#) for more information on layouts in Taylor & Francis Journals.

16 | AUTHOR SERVICES // Writing your paper

2 Write up the literature review (if required)

Literature reviews aren't always required, but often form an important part of Humanities and Social Sciences manuscripts. Typically, you would expect a literature review to:

- ▶ Discuss what's already known about the topic of the article
- ▶ Identify gaps in current knowledge
- ▶ Present your approach to addressing those gaps

As you write, make sure to follow these tips:

- ▶ **Summarize and synthesize:** give an overview of the main points of each source and combine them into a coherent whole.
- ▶ **Analyze and interpret:** don't just paraphrase other researchers – add your own interpretations, discussing the significance of findings in relation to the literature as a whole.
- ▶ **Critically evaluate:** mention the strengths and weaknesses of your sources.
- ▶ **Bring it all together:** draw connections, comparisons, and contrasts.

3 Write the method

The method section (often 'methods and materials' in STEM) provides the reader with all the details of how you conducted your research.

A good way to start this section is to check the instructions for authors for your target journal to see whether they state any requirements on how it should be presented. It's also worth reviewing previously published papers in the journal or sample reports on the journal website.

When you come to write your method section, you should:

- ▶ Use subheadings to separate different methodologies
- ▶ Describe what you did in the past tense
- ▶ Describe new methods in enough detail that another researcher could reproduce what you've done
- ▶ Describe established methods briefly and include a reference where readers can find more detail
- ▶ State any statistical tests and parameters



Writing a review article? Don't forget that as well as the advice below we also have some specific tips for review article writing on our website.

4 Write up your results

In the results section, you're ultimately responding to the question 'what have you found?'

To write an effective results section, follow these tips:

- ✔ Simply state what you found, but do not interpret the results or discuss their implications.
- ✔ Only include representative results that are essential for your discussion points. However, remember that many journals offer the possibility of adding supporting or supplemental materials, so use them freely for data or findings of secondary importance.
- ✔ Use subheadings to separate the results of different experiments/methods.
- ✔ Present your results in a logical order – this will usually be in order of importance, not necessarily the order in which you carried out the research.
- ✔ Use the past tense to describe your results, but refer to any figures and tables in the present tense.
- ✔ Don't duplicate data among figures, tables, and text. As mentioned earlier, you don't need to repeat the information contained in a figure or table. Simply use the text to summarize what the reader will find in the table, or mention one or two of the most important data points.



5 Write the discussion and conclusions

These sections are aimed at answering the question: what do your results mean? In other words, they should be an interpretation of your results.

To write an effective discussion and conclusion, follow these tips:

- ✔ Discuss your conclusions in order of most to least important.
- ✔ Compare your results with those from other studies – for example, are they consistent with other findings? And if not, you should also discuss why that might be the case.
- ✔ Talk about any inconclusive results and explain them as best you can. You can also suggest additional experiments needed to clarify the results further.
- ✔ While it may seem counterintuitive, it's important to briefly describe any limitations of your study. This shows reviewers and readers that you have considered the weaknesses of your research. Doing this will make a positive impression with editors and reviewers, as it makes it clear that you have an in-depth understanding of your topic and can think objectively about your research.
- ✔ Discuss what your results may mean for researchers in the same field as you, researchers in other fields, and the general public. How could your findings be applied?
- ✔ Explain how your results extend the findings of previous studies.
- ✔ If your findings are preliminary, suggest future studies that need to be carried out.

At the end, state your main conclusions once again.



6 Write the introduction

It's simpler to introduce and summarize something you've already written than something that doesn't exist yet. So, while you may be tempted to write the introduction first – after all, it's the start of your article – you'll actually find it much easier to write it once the main body of your article is complete.

Your introduction should provide readers with the background information needed to understand your study and the reasons why you conducted your experiments.

A good introduction should answer the following questions:

- ✔ What is the problem to be solved?
- ✔ Are there any existing solutions?
- ✔ Which is the best?
- ✔ What is its main limitation?
- ✔ What do you hope to achieve?

First, write the background and follow the below tips for including appropriate citations. Citations should be:

- ✔ **Well balanced:** If experiments have found conflicting results on a question, make sure you cite studies with both kinds of results.
- ✔ **Current:** Every field is different, but you should aim to cite references that are not more than 10 years old if possible. Although be sure to cite the first discovery or mention in the literature even if it was more than 10 years ago.
- ✔ **Relevant:** This is the most important requirement. The studies you cite should be strongly related to your research question.

Once you have provided background material and stated the problem or question for your study, tell the reader the purpose of your study. Usually, the reason is to fill a gap in the knowledge base or to answer a previously unanswered question.

The final thing to include at the end of your introduction is a clear and exact statement of your study aims. And a brief sentence or two on how you conducted the study.



7 Write the abstract

Your abstract is the selling pitch of your article. This is where researchers can get a quick insight into your research and decide whether to read and cite your content or look elsewhere. So it's worth spending time to get it right.

Think about abstracts for other researchers' articles that you have read in the past. What qualities would encourage you to read the full article? What would put you off? Consider these factors when creating your own.

An abstract should focus on:

- ✔ What your research is about
- ✔ What methods have been used
- ✔ What your main findings are

Each journal will have its own word limit for abstracts which you'll find in the instructions for authors, but approximately 100–200 words are what you'll have to work with. Check the guidelines before you start writing.

The key rules for writing your abstract are:

- ✔ **Accuracy is crucial.** Whatever you argue or claim in the abstract must reflect what is in the main body of your article. There's no room for hyperbole.
- ✔ **The abstract must be self-contained,** without abbreviations, footnotes, or incomplete references. It needs to make sense on its own.

Finally, it's important to note that there's a significant difference between original research papers and review papers when it comes to abstracts:

- ✔ **For original papers,** you should introduce your research, describe your methods and procedures, and summarize your findings.
- ✔ **For reviews,** you must first state the primary objective of the review, the reasoning behind your choice, the main outcomes, and results of your review. Then cover the conclusions that might be drawn, including their implications for further research, application, or practice.

Reminder: Don't forget about keywords when writing your title and abstract. See the keywords and SEO section on page 13 for more information.

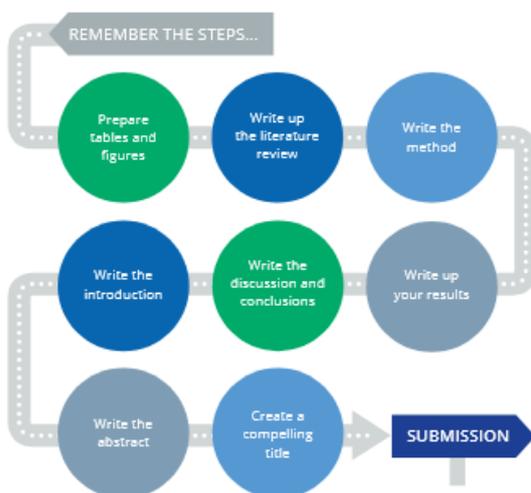


8 Create a compelling title

Your title is your first (and possibly only) opportunity to attract a reader's attention. And don't forget that the first readers are the editors – it needs to capture their attention too.

A good title should be concise, accurate, and informative. It should tell the reader exactly what the article is about and it should also help make your article more discoverable.

It's also important to try to make your title understandable to readers from outside your field and avoid abbreviations, formulas, and numbers. This will help increase the potential audience for your article and make it more accessible to readers with a different native language.



22 / AUTHOR SERVICES // Writing your paper

REFINING YOUR WRITING: HOW TO CREATE AN EFFECTIVE, COMPELLING PAPER

Completing the first draft of your manuscript is a big milestone. But it's certainly not the finish point. The making of a really good article is effective reviewing and editing, to ensure your ideas and findings are communicated clearly throughout.

In this section, we're going to take you through a whole host of tips on refining and editing your paper to ensure you're communicating effectively and your paper is written in a way that enables it to reach the widest possible audience.

Communicating your ideas effectively

First drafts often tend to be written in quite a 'train of thought' manner. This is no bad thing – it helps to get everything down on paper (so to speak). But it's important to then review everything you've written to ensure that the core messages of your research aren't getting lost.

Here are our key tips for ensuring your core ideas and findings are clear:



1. Make sure you've stuck to the point

The strongest papers usually have one point to make. They make that point powerfully, back it up with evidence, and position it within the field. Review your article with this in mind and make changes if you feel that point has got lost along the way.

2. Don't be afraid to explain further

You're so familiar with your area of research that some things which may seem obvious to you, might not seem so to your reader. Review your paper and consider whether you've fully explained yourself – particularly when describing your methods. Even better, you could ask a colleague who isn't directly involved with your research to give it a once over so they can point out anything they don't understand.



3. Ensure you've included your unique standpoint

Have you communicated your unique point of view to stand out? You may be building on a concept already in existence, but you still need to have something new to say. Make sure you've said it convincingly, and that you've made it clear you fully understand – and have referenced – what has gone before.



4. State your case with confidence

It's easy to add caveats to your work – for example, to fend off imagined criticism – but this can make your case less impactful unnecessarily. Review what you've written and ensure you've put across your key points confidently and unambiguously.

Refining your language and grammar

The way you write your article can make all the difference to how it will be received, both by your target journal editors, reviewers, and – hopefully – readers. And it's important to think about all your potential audiences when reviewing your writing.

For example, if researchers or practitioners outside your field may read your article, it's worth reviewing it with them in mind. Will they understand the terms you've used, the references you've made? If not, you'll need to explain them further.

It's also important to remember that not everyone reading the paper will be a native English speaker, so using 'flowery language' or overcomplicated sentences could make things very difficult for them to understand. We've put together the following tips to help you refine your writing...



- ▲ Keep sentences short and simple – if you find yourself using commas, after comma, after comma, your sentence is too long. Ideally, you should be able to read a sentence out loud without having to pause for breath.
- ▲ Express one main point per sentence – more ideas mean more complex sentences. Don't get sidetracked.
- ▲ Front-load your sentences – put the most important information at the beginning of your sentence, where scanning readers are likely to see it.
- ▲ Build every paragraph on one idea or topic – when you change to another idea or topic, start a new paragraph. (It's also worth bearing in mind that shorter paragraphs are generally easier to read, especially online.)
- ▲ Check your use of technical language – ask yourself whether someone unfamiliar with your research would understand the technical terms you're using.
- ▲ Avoid using initials and acronyms, and always explain them if you do use them – unless an acronym is so commonly used that it's likely to be understood by a wide range of audiences (e.g. DNA), don't use it without explaining it first.
- ▲ Clear out the 'deadwood' – 'deadwood' refers to a word or phrase that can be omitted or simplified without a loss of meaning. Removing it shortens and clarifies your copy. Some examples:
 - ~~very~~ unique
 - ~~eddie~~ bonus
 - ~~currently~~ underway
 - ~~a large number of studies~~ many studies
 - ~~adequate number of measurements~~ enough measurements

Need help? Contact our Editing Services

Let us help you maximize the impact of your research and improve the quality of your manuscript with our full range of pre-submission manuscript preparation services. These include English language editing, translation with editing, manuscript formatting, plagiarism check, and technical review.

Visit our [Editing Services website](#) to find out more.

FINALIZING THE DETAILS – FROM AUTHORSHIP TO COMPETING INTERESTS

You should be familiar with the editorial processes and policies of your target journal at this point. But when you've completed the final draft of your manuscript, it's important to check it back against these processes and policies.

While every journal and publisher may have varying guidance, below we've highlighted a few key areas that you need to pay particular attention to.

(For reference, you can find Taylor & Francis' portfolio-wide [Editorial Policies on our website](#).)



Authorship

Prior to submission, the authorship list and order on your article must be agreed between all listed authors. And you must also agree on who will take on the role of the corresponding author. It's the responsibility of the corresponding author to reach a consensus with all co-authors regarding all aspects of the article, including the authorship order, and to ensure all correct affiliations have been listed.

Find out more about [our authorship policies](#).

Competing interests

A competing interest, also known as a 'conflict of interest', can occur when you (or your employer or sponsor) have a financial, commercial, legal, or professional relationship with other organizations, or with the people working with them, that could influence your research. Full disclosure of any competing interests is required when you submit your paper to a journal.

Standards of reporting

We mentioned these right at the start as something you'd need to adhere to while writing up your research. Now's the time to revisit them and ensure you've covered off all requirements.

Research should be communicated in a way that supports verification and reproducibility. Standards of reporting encourage researchers to provide comprehensive descriptions of their research rationale, protocol, methodology, and analysis.

Find out more about [our standards of reporting](#).

AUTHOR SERVICES // Writing your paper // 23

What is categorized as a competing interest?

Competing interests can be financial or non-financial in nature.

Examples of financial competing interests include (but are not limited to):

- ▶ Employment or voluntary involvement.
- ▶ Collaborations with advocacy groups relating to the content of the article.
- ▶ Grants from an entity paid to the author or organization.
- ▶ Personal fees received by the author(s) as honoraria, royalties, consulting fees, lecture fees, testimonies, etc.
- ▶ Patents held or pending by the authors, their institutions or funding organizations, or licensed to an entity whether earning royalties or not.
- ▶ Royalties being received by the authors or their institutions.
- ▶ Stock or share ownership.
- ▶ Benefits related to the development of products as an outcome of the work.

Examples of non-financial competing interests include (but are not limited to):

- ▶ Receipt of drugs, specialist equipment, tools, computer programs, digital applications, etc or access to data repositories, archival resources, museum collections, etc by an entity that might benefit or be at a disadvantage financially or reputationally from the published findings.
- ▶ Holding a position on the boards of industry bodies or private companies that might benefit or be at a disadvantage financially or reputationally from the published findings.
- ▶ Writing assistance or administrative support from a person or organization that might benefit or be at a disadvantage from the published findings.
- ▶ Personal, political, religious, ideological, academic and intellectual competing interests which are perceived to be relevant to the published content.
- ▶ Involvement in legal action related to the work.

If there are no competing interests to declare, you should include a statement to the article to confirm that there are no relevant financial or non-financial competing interests to report.

Visit our website for [more information on competing interests](#).



Use of third-party material

Third-party material refers to anything included in your article which is owned and held in copyright by a third party. This includes – but is not limited to – any proprietary text, illustration, table, or other material, including data, audio, video, film stills, screenshots, musical notation, and any supplemental material.

Most journals will require that you obtain written permission to include such third-party material in your article, although there may be some limited exceptions.

Find out more about [our policies on using third-party material](#).

Patient and study participant consent

All journals will have policies regarding patient and study participant consent. At Taylor & Francis, we ask all authors to follow the [ICMJE requirements](#) on privacy and informed consent from patients and study participants.

This means that when you submit an article to one of our journals, you'll need to confirm that any patient, service user, or participant (or that person's parent or legal guardian) in any research, experiment, case study, or clinical trial described in your paper has given written consent to the inclusion of material pertaining to themselves. It must also state that they acknowledge they cannot be identified via the paper, and that you have fully anonymized them. Where someone is deceased, you'll need to ensure you have written consent from their family or estate.

There's more information, including an 'consent to publish' form which you can use, [on our website](#).

Using mathematical scripts and special characters

Your target journal and/or publisher will usually have guidance on how to use mathematical scripts and special characters within your manuscript, so make sure you've followed these correctly.

Take a look at our guidance on [mathematical scripts and special characters](#).



Considering ethics – a final submission checklist

Be clear on authorship

Have you included all the contributors to your article (in the right order), and are your acknowledgements up-to-date? Agree with your co-authors which journal you are submitting to, and tell them when you submit.

Agreement makes getting published easier. Disputes on authorship can slow down peer review and publication, so make sure decisions have been made together and everyone is aware.

Who checks?
Editors and reviewers will look for similarities to other published articles, as part of the peer review process. CrossCheck is used by Taylor & Francis to check papers against a database of over 40 million published articles.

Avoid plagiarism (and self-plagiarism)

Have you checked you've cited your own, and others, work correctly? You'll also need to have written permissions for any reproduced figures or tables.

Double check your data

Using datasets gathered by someone else? Check you have permission to use them in your work. Plus, if a statistician helped with data analysis make sure you acknowledge this.

Include everything: check the instructions for authors. Some journals may need supplemental data to be submitted along with your article. Check the journal's instructions for authors to make sure you've included everything you need.

Transparency is essential.
Relevant interests and relationships that could be seen as influencing your findings (whether financial or otherwise) must always be declared to the journal editors, reviewers or readers.

Declaring any interests

Make sure you've declared any funding, and the role of the funder, in your cover letter.

Upholding standards

Describing experiments or procedures? Make sure you include warnings of any hazards that could be involved in replicating these (including any instructions, materials or formulae you've mentioned). You'll also need to cite any relevant standards or codes of practice, and include a reference to them.

Evidence you've followed procedure. National and international procedures govern experimentation on people and animals. Statements of ethical approval, trial registration and informed patient consent will all be needed with your submission.

One at a time

Remember to submit your article to just one journal at a time, so it is only ever being considered by one editor and one set of reviewers. If you decide you want to send it to another journal, you can always withdraw your paper.

/ GLOSSARY

Term	Definition
article templates	Journals often provide article templates (for example in Word or LaTeX) to help you submit your article in the right format.
authorship	Authorship refers to defining the authorship of your article. For example, prior to submission, the authorship list and order on your article must be agreed between all listed authors. And you must also agree on who will take on the role of the corresponding author.
competing interests	A competing interest, also known as a conflict of interest, can occur when you (or your employer or sponsor) have a financial, commercial, legal, or professional relationship with other organizations, or with the people working with them, that could influence your research.
editing services	Editing services can be used by researchers to support them in refining and editing their manuscript to get it ready for publication.
editorial policies	A set of guidelines from the journal and/or publisher that clearly lays out the expectations of the journal/publisher with regards to standards of reporting, ethics, use of third-party material, authorship, and more.
format-free submission	An increasing number of journals allow format-free submission. This means that, as long as you use a consistent citation format and include everything necessary for review, you can submit work without needing to worry about formatting your manuscript to meet that journal's requirements.
Google Scholar	A publicly available search engine, providing a simple way to broadly search for scholarly literature, including articles, theses, books, and abstracts.
Google Trends	Google Trends is a website by Google that analyzes the popularity of top search queries in Google Search across various regions and languages.
HSS	Humanities and Social Sciences
IRAs	see Instructions for authors
instructions for authors	An individual set of requirements for a journal that help guide potential authors to construct their article in the correct way and prepare it for submission. Also abbreviated to IRAs.
keywords	Keywords are ideas and topics that define what your content is about. In terms of search engine optimization, they're the words and phrases that searchers enter into search engines to find the content they're looking for.
literature review	A literature review is a scholarly paper (or section of a paper) that presents the current knowledge on a topic.
search engine optimization	Search engine optimization (SEO) in relation to research articles is the process of optimizing a paper so that it can easily be found on search engines like Google or Google Scholar.
standards of reporting	Standards of reporting encourage researchers to provide comprehensive descriptions of their research rationale, protocol, methodology, and analysis. This means research is communicated in a way that supports verification and reproducibility.
STEM	Science, Technology, Engineering, and Mathematics
supplemental material	Supplemental material can mean anything – from tables to datasets, figures to presentations, video to audio files – which is included as a supplement to your main article.
third-party material	Third-party material refers to anything included in your article which is owned and held in copyright by a third party.

/ WHERE TO NEXT?

Now you've finished your article, what do you do next? Why not take a look at our other researcher guides to help you with navigating the submission process and promoting your published work.

- > Article submission and peer review
- > Research impact

Visit [Author Services](#) for everything you need to know about submitting your article to a Taylor & Francis journal.

Guidance, developments, news, and ideas for Taylor & Francis authors

-  @tandfonline
-  TaylorandFrancisGroup
-  Taylor & Francis Group
-  authorservices.taylorandfrancis.com