



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS DE CURITIBANOS
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOSISTEMAS AGRÍCOLAS E
NATURAIS - PPGEAN**

CRISTINA BELINCANTA

BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS À MICROPROPAGAÇÃO DE BAMBU

Curitibanos

2019

CRISTINA BELINCANTA

**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS À MICROPROPAGAÇÃO DE
BAMBUS**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ecossistemas Agrícolas e Naturais da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof^o. Dr. Miguel Pedro Guerra

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Gloria Botelho

Curitibanos

2019

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo Seu infinito amor.

A minha mãe Isabel I. Belincanta e demais familiares: Zelma B. Bellincanta, Jaime P. Bellincanta, Rosa A. V. F. Bellincanta, Felisberto M. Belincanta, Juliana C. Belicanta, Débora N. Belincanta e Natália E. Belincanta, por ser meu sustento.

Ao meu orientador prof^o Dr. Miguel P. Guerra e co-orientadora prof^a Dra. Glória Botelho, por todas as correções e contribuições, mediadas pela paciência no ensino.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação, PPGEAN.

Ao prof^o Dr. Lírio Dal Vesco, por todo ensino e atenção prestados nesta nova área do conhecimento na qual me foi apresentada, a Biotecnologia vegetal.

Ao doutorando Thiago S. Ornellas, por sua postura profissional ao ensinar-me além do assunto proposto, como também, por toda ajuda e parceria de trabalho.

A todos os colegas do grupo de pesquisa Rizobactérias, da UFSC Curitibanos, em especial, a Géssica Eutrópio, a Sabrina Rodrigues e a Jussara C. Stinghen por toda a ajuda.

Aos técnicos de laboratório de Química e Biotecnologia da UFSC Curitibanos pelo auxílio e dedicação.

A todos os colegas do laboratório LFDGV, em especial ao Thiago S. Ornellas, a Julia Zappelini, a Carolina K. Marchetti e a Lilian de O. Machado por toda a ajuda nos diversos trabalhos.

Aos amigos de Curitibanos que me acolheram durante esses dois anos sendo também família: Larissa R. Topanotti, Emanoela C. Vogel, Valdeir P. Lima, Enio P. Belotto, Patrícia F. de L. Almeida, Ronaldo Almeida, Bernardo Almeida, Lorenzo Almeida, Patrícia F. S. Assumpção, Taybar Assumpção e Cláudio Júnior.

A Larissa R. Topanotti, pela acolhida, instalação, amizade e contribuições científicas.

A Emanoela C. Vogel, que além de amiga foi dádiva e amparo para minha permanência no mestrado.

Aos colegas do PPGEAN, em especial, Valdeir P. Lima, Bruna H. Ricardo, Camila Bitencourt, Luziane Salles, Melina I. Bonatto, Maria Virgínia D. M. Davissonne, Fabio Sampaio, Andressa Kemer, Aline Bireahls, Fernanda B. de Santo e Pedro H. da S. Medrado. Entre as diversas convivências possibilitaram, também, meu crescimento pessoal, sendo diferenciais neste período.

Aos amigos do GOU (Grupo de Oração Universitário) Jhennifer M. Dias, Luiz C. Bertoldi, Francieli S. Blugoslowski e Werner A. Kupske, bem como todo o MUR (Ministério Universidades Renovadas) de Lages, pelo sustento na amizade e oração.

As amizades iniciadas em Florianópolis, em especial à Anna Flávia N. de Almeida, a Anyela M. R. Molina, a Daniela Goeten, o Lenon R. Modesto, a Julia Zappelini, a Lilian de O. Machado, a Luiza G. Polesi, o Edison C. Medina e o Patrick D. Marques.

A Anna Flávia N. de Almeida e a Daniela Goeten por todo apoio durante a fase final da dissertação, foram fundamentais.

Aos amigos do Paraná e demais estados, que foram presença, ainda que distantes, em especial: a Dayane Dal Vesco, o Lucas Vieira, a Caroline Oliveira, a Julia Veras, a Laís S. Risso, a Alini Tumelero, o Robson Prado e a Ana Claudia Poletto.

E por último e não menos importante, ao Dr. Italo Marsili, que, em sua generosidade contribuiu e muito, no meu processo de maturidade neste último ano. Fortalecendo minha personalidade, reinstalando-me à realidade da vida e restituindo o pilar da esperança em minha vida.

À todos o meu muito obrigado.

RESUMO

O avanço do uso do bambu em diversos setores socioeconômicos, além da sua importância ambiental, vem estimulado à necessidade de serem desenvolvidos e disponibilizados métodos rápidos e eficazes para sua propagação. Dentre esses métodos inclui o desenvolvimento de protocolos de micropropagação, a fim de suprir a demanda crescente por mudas de boa qualidade. Um dos principais gargalos para o sucesso da micropropagação é a elevada taxa de contaminação por microrganismos. No entanto, estudos preliminares sugerem que esses microrganismos considerados contaminantes podem ser endófitos e promovem o crescimento vegetativo. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo identificar e avaliar o potencial na promoção do crescimento vegetal de bactérias isoladas dos bambus *Dendrocalamus asper*, *Bambusa oldhamii* e *Guadua chacoensis*, na inoculação de brotações *in vitro* do abacaxizeiro-*Ananas comosus* var. Pérola e do bambu *Guadua chacoensis*. Foram obtidos 32 isolados bacterianos, destes 31 provenientes dos bambus *D. asper* e *B. oldhamii* e um de *G. chacoensis*. Após purificação desses isolados, foi realizada a caracterização fenotípica, a quantificação da produção de ácido indol acético (AIA) e a identificação molecular. Para a padronização da metodologia da inoculação dos isolados realizou-se um ensaio em brotações de abacaxizeiro *Ananas comosus* var. Pérola. Neste ensaio, os isolados foram selecionados com base na coloração das colônias e inoculados em brotos *in vitro* de abacaxizeiros var. Pérola (*A. comosus* (L.) Merr). Avaliou-se o uso dos isolados bacterianos em dois tratamentos: 1) inoculação concomitante a repicagem das brotações e; 2) em brotações com 30 dias em cultivo em meio de cultura Murashige e Skoog (1962) (MS) líquido. Como tratamentos controle, utilizaram-se dois: um com e outro sem o meio de cultura Luria Bertani (LB). As brotações de abacaxizeiro foram cultivadas em meio de cultura MS líquido enriquecido e com a inoculação dos isolados. Após 30 dias da multiplicação, resultou em maior sobrevivência, quando comparados com a inoculação concomitantes a repicagem das brotações, que não sobreviveram. Da mesma forma, o cultivo em meio de cultura com LB (controle) promoveu maior desenvolvimento das brotações em relação ao meio sem LB, isto por estimular as bactérias associadas ao abacaxi, as quais induziram o crescimento da parte aérea das plantas. Entre os 32 isolados bacterianos, três foram selecionados com base na baixa, média e alta produção de AIA. Entre estes o isolado

Ba16 com baixa produção (3,00 µg/mL), o isolado Ba03 com média produção (9,03 µg/mL) e o isolado Ba24 com alta produção (15,73 µg/mL). Os três isolados foram então inoculados em culturas *in vitro* de *G. chacoensis*, com 15 dias em cultivo em meio MS semi-sólido, 100 µL de cada isolado em cada planta. Após 30 dias da inoculação dos isolados, o experimento foi avaliado por meio de medidas do número e altura dos brotos, número e comprimento de raízes e da taxa de oxidação. Observou-se que o isolado Ba16 apresentou diferença no parâmetro de comprimento de raiz, quando comparados aos demais isolados Ba03 e Ba24, sugerindo o seu uso potencial associado as plantas micropropagadas de *G. chacoensis*. Posteriormente, o isolado oriundo de *G. chacoensis* e outros 7 isolados selecionados pela produção de AIA foram identificados por amplificação da sequência parcial do gene 16S RNAr. Por meio da análise do BLASTn, as espécies que apresentaram similaridade com os isolados Ba03, Ba16 e Ba24, foram *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis* e *Brevibacillus parabrevis*, respectivamente. Sendo assim, o uso desses isolados pode ser empregado para melhorar o protocolo de micropropagação do bambu *G. chacoensis*, utilizando-se do co-cultivo entre plantas e bactérias.

Palavras-chave: Propagação *in vitro*; isolados bacterianos; *Ananas comosus*; *Guadua chacoensis*; inoculação *in vitro*.

ABSTRACT

The use of bamboo has advanced in diverse socioeconomic sectors, besides its environmental importance. As a consequence, it has been stimulating the need to develop and provide fast and effective methods for its propagation. These methods include the development of micropropagation protocols in order to meet the growing demand for good quality seedlings. The high rate of contamination by microorganisms causes one of the main bottlenecks effect for the success of micropropagation. However, preliminary studies suggest that these microorganisms considered contaminants, may be endophytic and beneficial for promoting vegetative growth. This study aimed to identify and evaluate the potential of plant growth concerning the bacteria isolated from *Dendrocalamus asper*, *Bambusa oldhamii* and *Guadua chacoensis* bamboos applied *in vitro* shoots inoculation of pineapple-*Ananas comosus* var. Perola and bamboo *Guadua chacoensis*. Thirty-two bacterial isolates were obtained, thirty-one of these isolates from the bamboos *D. asper* and *B. oldhamii*, and one of them from *G. chacoensis*. After the purification of these isolates, the phenotypic characterization, quantification of indoleacetic acid production (IAA) and molecular identification were performed as procedure. The inoculation of the isolates was carried out on sprouts of pineapple *Ananas comosus* var. Perola in order to standardize this methodology. In this assay, the isolates were selected based on colony staining and inoculated *in vitro* shoots of Perola (*A. comosus* (L.) Merr) variety. The use of bacterial isolates was evaluated in two treatments: 1) inoculation in concomitance to the shoots transplantation and; 2) in 30-days shoots exposed to liquid Murashige and Skoog (1962) (MS) cell culture medium. As control treatments, one sort was applied in *Luria Bertani* culture medium (LB); another one was not submitted to this procedure. The pineapple shoots were cultivated in enriched liquid MS cell culture medium with the inoculation of isolates. After 30 days of multiplication, the result was their higher survival in comparison to the isolates inoculation in concomitance to the shoots transplantation. As a matter of fact, these isolates did not survive. Likewise, the cultivation in culture medium with LB (control) promoted greater development of shoots in relation to medium without LB. In addition, the LB medium stimulated the associated bacteria inducing the growth of the aerial part in the plants. Among the 32 bacterial isolates, three were selected based on low, medium and high IAA production. Among them, the isolate Ba16 with low production (3.00 µg / mL), the isolate Ba03 with

medium production (9.03 µg / mL) and the isolate 24 with high production (15.73 µg / mL). Then, three isolates were inoculated into *in vitro* cultures of *G. chacoensis* with 15 days in semi-solid MS culture medium, 100 µL of each isolate in each plant. After 30 days of inoculation of the isolates, the experiment was evaluated by means of measure regarding the number and the height of the shoot, the number and the root length and the oxidation rate. It was observed the isolate Ba16 showed a significant difference in the root length parameter in comparison to the other isolates Ba03 and Ba24. It suggests its potential use associated with micropropagated plants of *G. chacoensis*. Subsequently, the isolate from *G. chacoensis* and other 7 isolates selected for the production of IAA were identified by amplification of the partial sequence of the 16S RNAr gene. Considering the BLASTn analysis, the species that showed similarity to the isolates Ba03, Ba16 and Ba24 were *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis* and *Brevibacillus parabrevis*, respectively. Therefore, the use of these isolates may be used to improve the micropropagation protocol of *G. chacoensis* bamboo, using co-cultivation between plants and bacteria.

Keywords: *In vitro* propagation; Bacterial isolates; *Ananas comosus*; *Guadua chacoensis*; *In vitro* inoculation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição mundial dos bambus. Fonte: Kelchner; BP, 2013.....	15
Figura 2. A) Distribuição do gênero <i>Guadua</i> na America do Sul. B) <i>Guadua chacoensis</i> . Fonte: Bystriakoya <i>et al.</i> (2002); Jardim Botânico Virtual.....	16
Figura 3. Coloração amarela, branca e vermelha das colônias de isolados bacterianos obtidos das culturas in vitro de bambu.....	29
Figura 4. Coloração de Gram dos isolados de bambu micropropagados. Ampliação de 1000x. Bastonetes Gram-positivos. a) Isolado Ba03. b) Isolado Ba16. c) Isolado Ba24.....	33
Figura 5. Inferência Bayesiana das sequencias do gene 16S RNAr geradas de cada isolado. Nome a direita representa acesso GenBank de maior identidade. Os valores de probabilidade.....	34
Figura 6. Inferência Bayesiana do conjunto de dados 'Ba03'. Os valores de probabilidade posterior estão indicados na árvore.....	35
Figura 7. Inferência Bayesiana do conjunto de dados 'Ba16'. Os valores de probabilidade posterior estão indicados na árvore.....	35
Figura 8. Inferência Bayesiana do conjunto de dados 'Ba24'. Os valores de probabilidade posterior estão indicados na árvore.....	36
Figura 9. Inoculação de isolados de bambu em abacaxi. a) Brotos de abacaxi inoculados após a repicagem. b) Após dez dias de desenvolvimento dos brotos inoculados com os isolados bacterianos. c - d) Depois de dez dias do desenvolvimento dos brotos. Com destaque.....	50
Figura 10. Inoculação dos isolados bacterianos na base das culturas in vitro de <i>Guadua chacoensis</i>	62
Figura 11. Desenvolvimento de colmos de <i>Guadua chacoensis in vitro</i> após inoculação dos isolados. a, b e c) Isolados Ba03, Ba16 e Ba24, após três dias da inoculação em meio de cultura MS. e, f e g) Bambus <i>Guadua chacoensis</i> após 30 dias da inoculação dos isolados bacterianos. d, h) Testemunhas. d) Tratamento com Luria Bertani (LB) h) Tratamento com LB após 30 da inoculação.....	63
Figura 12. Avaliação das alturas dos colmos entre fatorial e testemunha (MS).....	64
Figura 13. Avaliação do número de raízes entre fatorial e testemunha (MS).....	64
Figura 14. Avaliação do comprimento de raízes entre fatorial e testemunha (MS). ..	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Caracterização morfológica das colônias dos isolados bacterianos obtidos das culturas in vitro de bambus.....	31
Tabela 2. Sequências parciais da região 16S RNAr dos isolados em estudo.....	33
Tabela 3. Produção de AIA ($\mu\text{g/mL}$) pelos isolados bacterianos.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA ácido abscísico

ABI 3500xl Modelo do analisador genético

ABI Ácido abscísico

AIA Ácido indol acético

ANAVA Análise de variância

Atm Atmosfera

BAP Benzilaminopurina/Benzylaminopurine

BLASTn Basic Local Alignment Search Tool

CCA Centro de ciências agrárias

CLC Main Workbench V 8.0.1 *Software* para análises de dados genéticos

CV Coeficiente de variação

DIC Delineamento Inteiramente Casualizado

DNTPs Deoxynucleotide Triphosphates

EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético

FeCl₃ Cloreto Férrico

g Gramas

GA3 Ácido giberélico

H Horas

H₂SO₄ Ácido sulfúrico

HKY+I+G Modelo evolutivo

IAA Indole Acetic Acid

LFDGV Laboratório de fisiologia do desenvolvimento e genética vegetal

L Litros

LB Luria Bertani

M Molar

mL Mililitro

Min Minutos

MgCl₂ Cloreto de Magnésio

MS Murishe&Skoog

N norte

NAA Naftalen Acetic Acid

NaCl Cloreto de sódio

P valor de 'p'

PP Probabilidade posterior

PCR Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

PEG8000 Polietilenoglicol

RNAr Ácido ribonucleico ribossomal

Rpm Rotação por minuto

RGV Recursos Genéticos Vegetais

S sul

SNK Teste de separação de médias (Student-Newman-Keuls)

Taq DNA Taq DNA polimerase

TIM+I+G Modelo evolutivo

TrN+I+G Modelo evolutivo

TrN+G Modelo evolutivo

UFC Unidade formadora de colônia

UFSC Universidade Federal de Santa Catarina

ZR Zeatina ribosídeo

2,4-D Ácido diclorofenoxiacético

°C Graus Celcius

μL Micro litro

μM Micro molar

μg Micro grama

16S cromossomo 16S RNA ribossomal

27F Primer *forwad*

1492R Primer *reverse*

ng nanograma

nm nanometro

SUMÁRIO

1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA.....	14
2 OBJETIVOS.....	22
2.1 OBJETIVO GERAL.....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3 HIPÓTESE.....	22
4 CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS BACTERIANOS OBTIDOS DA MICROPROPAGAÇÃO DE BAMBU.....	23
4.1 INTRODUÇÃO	25
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.2.1 Obtenção e purificação dos isolados bacterianos de bambu	26
4.2.2 Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos de bambu	27
4.2.3 Identificação molecular de isolados bacterianos de bambus	27
4.2 RESULTADOS.....	29
4.2.1 Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos de bambu	29
4.2.1.1 Coloração de Gram dos isolados bacterianos de bambu	33
4.2.1.2 Identificação molecular dos isolados bacterianos	33
4.2.2 Filogenia dos isolados.....	34
4.2.2.1 Filogenia do isolado Ba03	34
4.2.2.2 Filogenia do isolado Ba16	35
4.2.2.3 Filogenia do isolado Ba24	35
4.3 DISCUSSÃO	36
4.3.1 Caracterização fenotípica e identificação molecular dos isolados.....	36
4.4 CONCLUSÃO	37
5 CAPÍTULO II – BACTÉRIAS ASSOCIADAS A BAMBUS <i>IN VITRO</i> E SEU POTENCIAL DE USO NA MICROPROPAGAÇÃO DE ABACAXIZEIRO.....	45
5.1 INTRODUÇÃO	47
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	48
5.2.3 Produção de Ácido Indol Acético (AIA) em isolados bacterianos de bambu	49
5.4 DISCUSSÃO	51
5.5 CONCLUSÃO	53

6 CAPÍTULO III - EFEITOS DA INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE AIA EM CULTURAS <i>IN VITRO</i> DE <i>GUADUA CHACOENSIS</i> (ROJAS)	
LONDOÑO & P. M. PETERSON.....	56
6.1 INTRODUÇÃO	58
6.2 MATERIAL E MÉTODOS	60
6.2.1 Material vegetal	60
6.2.2 Isolamento e preparo do inóculo	60
6.2.3 Efeito dos isolados bacterianos em <i>G. chacoensis</i>	61
6.2.4 Análises estatísticas	62
6.3 RESULTADOS.....	62
6.3.1 Quantificação de UFC nos isolados selecionados.....	62
6.3.1 Efeito da inoculação <i>in vitro</i> de plantas de <i>Guadua chacoensis</i>	63
6.4 DISCUSSÃO	65
6.4.1 Efeitos da inoculação <i>in vitro</i> de plantas de <i>G. chacoensis</i>	65
6.5 CONCLUSÃO	67

1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

Os bambus pertencem à família das Poaceae e se agrupam em 650 gêneros e 1200 espécies. Fazem parte da subfamília Bambusoideae, consideradas gramíneas lenhosas não arbóreas (SORENG *et al.*, 2015). Estas espécies são reconhecidas por suas características morfológicas, anatômicas, macromoleculares e ecológicas (FIGUEIRAS; SANTOS-GONÇALVES, 2007). Estruturalmente se dividem em raiz, colmo, folhas e inflorescência, sendo a parte subterrânea do colmo denominada rizoma, classificando-os em entouceirantes e alastrantes (FILGUEIRAS; VIANA, 2017).

Os bambus apresentam distribuição natural nas zonas tropicais e subtropicais, entre aproximadamente, 46° N e 47° S de latitude, exceto na Antártica (KELCHNER *et al.*, 2013). Encontram-se naturalmente distribuídos pela Ásia, América e África, com fortes indícios de ser na Ásia, o seu centro de diversidade. No continente americano, os bambus se distribuem desde o Sudeste dos Estados Unidos até a região da Patagônia e as reservas do continente correspondem a 28% dos recursos de bambus no mundo (LOBOVIKOV *et al.*, 2007; DRUMOND; WIEDMAN, 2017).

O Brasil apresenta a maior diversidade de bambus do Novo Mundo, sendo listadas 232 espécies nativas distribuídas em 34 gêneros, com maiores ocorrências na Mata Atlântica e Amazônia (JUDZIEWICZ *et al.*, 1999; FILGUEIRAS; GONÇALVES, 2004). Os primeiros estudos de descrição da estrutura das florestas com bambu, no Brasil, foram realizados na Amazônia sul-ocidental nos anos 70 (CARMO *et al.*, 2017). Observou-se que nessa região que abrange o Brasil, Bolívia e Peru, ocorre umas das maiores florestas nativas de bambu do planeta, onde a espécie se apresenta como elemento principal ou secundário no sub-bosque (DRUMOND; WIEDMAN, 2017; FERREIRA, 2014).



Figura 1. Distribuição mundial dos bambus. Fonte: Kelchner; BP, 2013.

As espécies do gênero *Guadua* habitam florestas tropicais e subtropicais, planícies desérticas, cerrados e penhascos perto de cachoeiras (CLARK, 1990). Este gênero apresenta a maior abrangência na distribuição da América tropical, no México e ao norte da Argentina, sendo a maioria das suas 33 espécies endêmica da América do Sul (LONDOÑO; PETERSON, 1992). Das espécies endêmicas e nativas do Brasil, há apenas 18 espécies do gênero *Guadua*, dentre elas as que estão em domínio fitogeográfico da Mata Atlântica (floradobrasil.jbrj.gov.br). Na lista de espécies prioritárias de bambus para o mundo (RAO *et al.*, 1998), os autores descrevem a única espécie americana da lista, *Guadua angustifolia*. É descrita como de alto valor potencial para comercialização, industrialização e para fins de recuperação ambiental, também, considerada como não domesticada. *G. angustifolia* e *G. amplexifolia* são apontadas como as únicas espécies do gênero que são cultivadas economicamente na América do Sul (LONDOÑO, 1998).

Entre as espécies nativas, encontra-se *Guadua chacoensis*. Em revisão à lista proposta em 1998, Benton (2015) indica *G. chacoensis* como espécie de potencial semelhante ao *G. angustifolia*, sendo ambas, espécies lenhosas. *G. chacoensis* é muito utilizada por povos nativos da América latina.

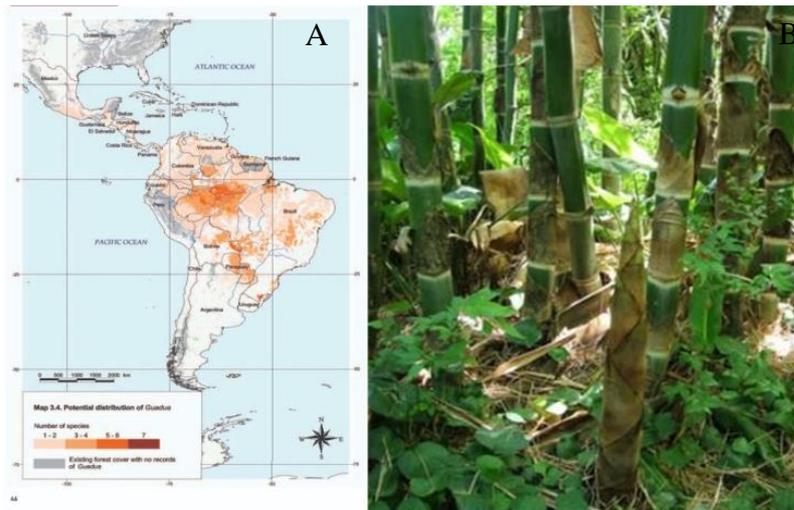


Figura 2. A) Distribuição do gênero *Guadua* na America do Sul. B) *Guadua chacoensis*. Fonte: Bystriakoya *et al.* (2002); Jardim Botânico Virtual.

Os bambus lenhosos ocupam nichos relevantes na ecologia de *habitats* florestais e têm sido de grande importância econômica para a humanidade (KELCHNER *et al.*, 2013). São considerados recursos naturais renováveis, cujas características tecnológicas os tornam materiais capazes de fazer frente às demandas florestais e industriais. Inseridos em um modelo de desenvolvimento sustentável, os bambus apresentam grande importância econômica, social e ambiental, (KIBWAGE *et al.*, 2008; MADHAB, 2003).

Dos bambus exóticos que apresentam maior potencial, estão os pertencentes aos gêneros *Bambusa*, *Dendrocalamus* e *Phyllostachys*. Os bambus se configuram em boas opções para o uso em práticas de contenção de encostas ou recuperação de áreas degradadas, pela periodicidade da colheita dos colmos, possibilitando também, a geração de renda constante para as populações locais. Outros usos dos bambus são como matéria prima para construções civis e na arquitetura, uma vez que seus colmos maduros apresentam alta resistência à compressão, têm bom rendimento e podem substituir outros tipos de madeira (AZZINI; BERALDO, 2001).

O Brasil apresenta alta diversidade de espécies, mas a cadeia produtiva, que ainda é recente, baseia-se em espécies exóticas e em tecnologias advindas dos países origem, ignorando as espécies nativas com alto potencial (ORNELLAS, 2017). Esse cenário é atribuído à ausência da tradição no emprego do bambu como matéria-prima e, também, às lacunas de conhecimento e tecnologias nacionais que permitam usar tanto as espécies de clima temperado, apropriadas às regiões do Sul e Sudoeste

do país. Quanto às espécies tropicais nativas, possuem excelentes propriedades físicas e mecânicas, além do grande potencial comercial (DRUMOND; WIEDMAN, 2017).

Um dos principais gargalos para a consolidação da cadeia produtiva no Brasil é a dificuldade de fornecimento de mudas com boa qualidade genética e fitossanitária em larga escala. Assim, torna-se necessário desenvolver novas metodologias de propagação que possam suprir as demandas do momento e as do futuro (SÁNCHEZ, 2011). Segundo Guerra *et al.*, (1999), técnicas de cultura de tecidos vegetais apresentam grande potencial para o desenvolvimento e a propagação massal de germoplasma elite, com garantia de qualidade genética e fitossanitária (Guerra *et al.*, 1999). Além disso, diante do baixo rendimento e alta heterogeneidade dos métodos convencionais de propagação da maioria dos bambus lignificados, a micropropagação é importante alternativa para produção de mudas (MUDOI *et al.*, 2013). A introdução *in vitro* de determinado genótipo possibilita a sua conservação a médio e longo prazo, por meio de técnicas de conservação *in vitro*, isolando o germoplasma de fatores bióticos e abióticos do meio ambiente (ENGELMANN, 2011).

Diversos tecidos vegetais juvenis, derivados de plantas maduras podem ser utilizados para iniciar culturas *in vitro*. Porém, os mais utilizados em protocolos de organogênese são os segmentos nodais (MUDOI *et al.*, 2013; SINGH *et al.*, 2013). Após o estágio inicial ou indução das culturas, essas passam pelo estágio de multiplicação, no qual, geralmente, utiliza-se citocininas, com destaque para a Benzilaminopurina (BAP) (MUDOI, 2013). As citocininas contribuem na eficiência do estímulo as brotações adventícias e podem favorecer reversão às características juvenis (PREECE, 2008). Durante a fase de multiplicação pode acontecer a rizogênese espontânea em algumas culturas. Já em outras, é necessário passarem por mais um estágio *in vitro* para que haja a indução do enraizamento precedente à aclimatização. Após estabelecer as raízes, as plantas *in vitro* podem ser aclimatizadas. Este procedimento, muitas vezes, é considerado ponto crítico no processo de micropropagação, pois, as plantas passam por rigorosas mudanças ambientais e faz-se necessário a adaptação às novas condições ambientais (ORNELLAS, 2017).

Há dificuldades na introdução de culturas *in vitro* de espécies de bambus. Um dos principais gargalos, tanto na introdução de bambu como na micropropagação

como um todo, é a elevada taxa de desenvolvimento de microrganismos associados à planta-matriz, especialmente quando essa se encontra em condições de campo (CHOUDHURI, 2005; RAMANAYAKE *et al.*, 2006). Muitos desses microrganismos, especialmente as bactérias, são considerados endofíticos, ou seja, com capacidade de colonizar os tecidos vegetais internamente (KUSS *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2007). Estudos apontam que microrganismos endofíticos exercem diversas funções, como fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fósforo, biorremediação, fitorremediação, produção de compostos bioativos de interesse farmacológico, e ainda, atuam estimulando o desenvolvimento vegetal (POLESI, 2011).

A atuação das bactérias relacionadas à promoção do crescimento de plantas pode estar ligada à sua capacidade de produzir fitohormônios, como as auxinas, que auxiliam no crescimento, destacando a produção do ácido indol acético (KUSS *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2007).

Diante desse cenário, visando à produção de mudas de alta qualidade da espécie nativa, *G. chacoensis*, o presente trabalho buscou avaliar o uso potencial de bactérias isoladas do cultivo *in vitro* de duas espécies de bambus, no desenvolvimento de *Guadua chacoensis*, como estratégia de propagação vegetativa. Dessa forma, a dissertação foi estruturada em três capítulos, em que o primeiro capítulo foi realizado a caracterização fenotípica dos trinta e dois isolados bacterianos, a quantificação da produção de ácido indol acético (AIA) pelos isolados bacterianos e também, a identificação molecular de oito isolados, os quais foram selecionados com base na produção de AIA. No segundo capítulo fez-se um ensaio de inoculação dos isolados bacterianos em abacaxizeiro, mediante o conhecimento prévio dos isolados, onde, os dados obtidos serviram de base para a execução do experimento do capítulo três. No terceiro capítulo um experimento de micropropagação foi realizado inoculando-se três isolados bacterianos em *Guadua chacoensis* cultivado *in vitro* e observou-se o desenvolvimento dos bambus.

REFERÊNCIAS

AZZINI, A., BERALDO, A. L. (2001). Métodos práticos para utilização do bambu. Campinas: UNICAMP.

BENTON, A. (2015). Priority species of bamboo. **In Bamboo** (pp. 31-41). Springer, Cham.

do CARMO, L. F. Z., do AMARAL, E. F., BARDALES, N. (2017). Ocorrência, biomassa, perdas e exploração de bambu em florestas da Amazônia no Acre, Brasil. Embrapa Acre-Capítulo em livro técnico (INFOTECA-E).

CHOUDHURI, T. *et al.* (2005). Curcumin selectively induces apoptosis in deregulated cyclin D1-expressed cells at G2 phase of cell cycle in a p53-dependent manner. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 20, p. 20059-20068.

CLARK, L. G. (1990). Diversity and biogeography of Neotropical bamboos (Poaceae: Bambusoideae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 4, n. 1, p. 125-132.

DRUMOND, P., WIEDMAN, G. (2017). Bambus no Brasil: da biologia à tecnologia. Embrapa Acre-Livro técnico (INFOTECA-E).

ENGELMANN, F. (2011). Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 47, n. 1, p. 5-16.

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

FILGUEIRAS, T. S.; SANTOS-GONÇALVES, A. P. (2007). Tupi-guarani: Fonte de informações sobre bambus nativos do Brasil. **Heringeriana**, v. 1, n. 1, p. 35-41.

FILGUEIRAS, T. S., VIANA, P. L. (2017). Bambus brasileiros: morfologia, taxonomia, distribuição e conservação. **Bambus no Brasil: da biologia à tecnologia**. Rio de Janeiro: ICH, 10-27.

FILGUEIRAS, T. S., GONÇALVES, A. S. (2004). A checklist of the basal grasses and bamboos in Brazil (Poaceae). **The journal of the American Bamboo Society**, 18(1), 7-18.

GUADUA in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB13247>. Acesso em 10 Jan. 2019.

GRECO, T. M., RÍOS, H. C. (2011). Bambu: cultivo e manejo. Insular.

JUDZIEWICZ, E. J., CLARK, L. G., LONDONO, X., STERN, M. J. (1999). American bamboos. Smithsonian Institution Press.

KELCHNER, S. A., CLARK, L., CORTÉS, G., et al. (2013). Higher level phylogenetic relationships within the bamboos (Poaceae: Bambusoideae) based on five plastid markers. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 67, n. 2, p. 404–413.

KIBWAGE, J. K., ODONDO, A. J., MOMANYI, G. M. (2008). Structure and performance of formal retail market for bamboo products in Kenya.

KUSS A.V., KUSS V.V., LOVATO T., FLORES M.L. (2007). Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 42(10):1459-1465.

LOBOVIKOV, M., PAUDEL, S., PIAZZA, M., REN, H., WU, J. (2007). World bamboo resources: a thematic study prepared in the framework of the Global Forest Resources Assessment. **FAO, Rome**.

LONDOÑO, X., PETERSON, P. (1992). *Guadua chacoensis* (Poaceae: Bambusoideae), its taxonomic identity, morphology and relationships. **Novon** 2:41–47.

LONDOÑO, X. (1998) Evaluation of bamboo resources in Latin America. **A Summary of the Final Report of Project**, n. 96-8300, p. 01-4.

MADHAB, J. (2003). The Green gold: Under Exploited Wealth of the North East India, Dialogue October-December, 2003, Volume 5 No.2.[http://www.asthabharati.org/Dia Oct 03/ jayant.htm](http://www.asthabharati.org/Dia%20Oct%2003/jayant.htm).

ORNELLAS, T. S. *et al.* (2017). Micropropagação do bambu americano *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & PM Peterson.

RAMANAYAKE, S. M. S. D.; MEEMADUMA, V. N.; WEERAWARDENE, T. E. (2006). *In vitro* shoot proliferation and enhancement of rooting for the large-scale propagation of yellow bamboo (*Bambusa vulgaris* 'Striata'). **Scientia Horticulturae**, v. 110, n. 1, p. 109-113.

RAO, A. N., RAO, V. R., WILLIAMS, J. T. (1998). **Priority species of bamboo and rattan.**

SÁNCHEZ, N. L., GUTIÉRREZ-RANGEL, N., SÁNCHEZ, H. L., SANTOS, M. E. P., PÉREZ, G. S., PÉREZ, U. S., HERNÁNDEZ, J. J. V. (2011). Propagación vegetativa de tres especies de Bambú. Ra Ximhai: **Revista científica de sociedad, cultura y desarrollo sostenible**, 7(2), 205-218.

SANTI, T. (2015). Bambu para toda obra. **O Papel**, 76, 23-34.

SORENG, R. J., PETERSON, P. M., ROMASCHENKO, K., DAVIDSE, G., ZULOAGA, F. O., JUDZIEWICZ, E. J., FILGUEIRAS, T. S., DAVIS, J. I., MORRONE, O. (2015). A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae). **Journal of Systematics and Evolution**, v.53, p.117-137.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de uso de bactérias isoladas do cultivo *in vitro* de espécies de bambus (*Dendrocalamus asper* e *Bambusa oldhamii*) no desenvolvimento de abacaxizeiro - *Ananas comosus* var. Pérola e de bambu *Guadua chacoensis in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar morfológicamente e identificar por sequenciamento do 16S RNAr os isolados bacterianos;
- Avaliar a produção de ácido indol acético (AIA) pelos isolados bacterianos;
- Analisar o desenvolvimento de abacaxizeiros *Ananas comosus* var. Pérola micropropagados com a inoculação dos isolados bacterianos;
- Avaliar o desenvolvimento de bambus *Guadua chacoensis* micropropagados com a inoculação dos isolados bacterianos.

3 HIPÓTESE

Bactérias consideradas contaminantes durante a técnica de micropropagação de bambus são endofíticas e promovem o desenvolvimento das culturas *in vitro* de abacaxizeiro - *Ananas comosus* var. Pérola e bambu *Guadua chacoensis*.

4 CAPÍTULO I - CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS BACTERIANOS OBTIDOS DA MICROPROPAGAÇÃO DE BAMBU

RESUMO

Os bambus são gramíneas lenhosas e não arbóreas. Pertencem a subfamília Bambusoideae e apresentam diversas interações microbianas. Dentre os diversos microrganismos, encontram-se os endofíticos, alguns desses atuam na promoção do crescimento de plantas, devido a fatores como, a biossíntese de ácido-indol acético (AIA). Nas últimas décadas tem aumentado os estudos sobre essa microbiota, onde, busca-se conhecer as características dos microrganismos e explorar os seus usos potenciais. Um dos usos é a inoculação desses microrganismos na biotecnologia, especificamente na biotecnologia vegetal, que visa a possibilidade de trabalhar com o co-cultivo na técnica de micropropagação de plantas. Para isso, faz-se necessário a caracterização da comunidade bacteriana, neste caso, é realizada por meio de métodos fenotípicos e moleculares. No presente trabalho, o objetivo foi caracterizar fenotipicamente e por sequenciamento do 16S RNAr, os isolados endofíticos do cultivo *in vitro* de diferentes espécies de bambu. Foram obtidos um total de 32 isolados que provinham de brotos de bambu, oriundos de propagação *in vitro*. Esses foram classificados por análise morfológica das colônias como, a forma, o perfil e a coloração. Das características observadas, as colônias possuem coloração amarela, branca e vermelha, forma redonda e enrugada, e predominantemente, perfil convexo. Dos 32 isolados, 100% eram bastonetes Gram-positivos. Baseado nos valores de AIA produzido, oito isolados foram selecionados para sequenciamento parcial da região 16S RNAr. Desses, três isolados sequenciados foram escolhidos para elaborar a inferência filogenética. Foi encontrada forte similaridade desses três isolados com três espécies comumente endofíticas: *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis* e *Brevibacillus parabrevis*. As três espécies são produtoras de AIA e tem potencial de promoção de crescimento em plantas.

Palavras-chave: Bactérias endofíticas; caracterização bacteriana; ácido indol acético.

ABSTRACT

Bamboos are woody and non-arboreal grasses. They belong to the subfamily *Bambusoideae*, and present microbial interactions. Among the various microorganisms, the endophytes are found. Some of them promote plants growth due to their acid-indole acetic biosynthesis (IAA) capacity. In recent decades, studies on the microbiota have been increasing in order to raise the knowledge about the characteristics of microorganisms and explore their potential uses. One of them is the inoculation of these microorganisms in biotechnology, specifically in plant biotechnology. It aims at the possibility of working with co-cultivation in the micropropagation technique of plants. For this, the characterization of the bacterial community is required. In this case, the characterization of the bacterial community is performed by morphological and molecular techniques. In this sense, this paper aimed to characterize, phenotypically and by 16S RNAr sequencing, the endophytic isolates cultivated *in vitro* of different types of bamboos. An amount of 32 isolates were obtained from bamboo shoots from *in vitro* propagation. These isolates were classified according to the morphological analysis of the colonies as shape, profiling and staining. Concerning the observed characteristics, the colonies showed yellow, white and red staining, round and wrinkled form, and predominantly, convex profiling. From the 32 bacterial isolates, 100% were Gram-positive rods. Eight partial sequences of 16S RNAr region isolates were made. However, only three sequenced isolates were chosen to make phylogenetic inference. It was found a strong similarity between the 03 isolates with 03 endophytic species, being *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis* and *Brevibacillus parabrevis*. The three species are IAA producers and have the potential to promote plant growth.

Keywords: Endodhytic bacteria; bacterial characterization; indole acetic acid.

4.1 INTRODUÇÃO

Os bambus fazem parte da família Poaceae e subfamília Bambusoideae e são gramíneas lenhosa e não arbóreas com ampla distribuição geográfica (DRUMOND; WIEDMAN, 2017), sendo dividida em três tribos: *Olyreae*, bambus herbáceos, *Bambuseae*, bambus lignificados de regiões tropicais e *Arundinarieae*, bambus lignificados de regiões temperadas (KELCHNER; BP, 2013). Os bambus são utilizados para diversas finalidades, entre elas indústria, construção civil e alimentação (DABA, 2016).

O bambu, como outros vegetais, possui interações microbianas. A interação entre microrganismos e plantas é onipresente e influencia a estrutura das populações e comunidades naturais nos ecossistemas (CAIRNEY, 2000). As plantas exsudam pelas raízes fontes de carbono fixado pela fotossíntese (HUANG *et al.*, 2014), sendo capazes de influenciar o crescimento de microrganismos, especialmente bactérias, as quais colonizam sua rizosfera. Desta forma, pelos exsudatos liberados pelas plantas, há uma zona energética na rizosfera, onde, facilita a mineralização dos nutrientes pelos microrganismos, tornando-os disponíveis às plantas. Há, também, a promoção do crescimento das plantas a partir da produção de fitohormônios sintetizados e fornecidos pelos microrganismos (SCHIPPERS, 1987; AZEVEDO, 1998).

Dentre os diversos microrganismos do solo, encontram-se aqueles capazes de colonizarem o interior dos tecidos vegetais, sem causar-lhes danos aparentes, os denominados endofíticos. Estes microrganismos endofíticos são em geral fungos e bactérias, e se diferenciam dos microrganismos fitopatogênicos e epífitos (AZEVEDO, 1998). Embora o termo 'endófito' tenha sido bastante empregado para fungos, há na literatura trabalhos que abordam a existência de bactérias endófitas (LODEWYCKX, *et al.*, 2002). Segundo Felber *et al.* (2017), a definição de microrganismos endofíticos foi descrita por Azevedo e Araújo (2007), expandida por Mendes e Azevedo no mesmo ano e recentemente Araújo (2014) descreve o termo como microrganismos que podem ou não ser cultiváveis e que habitam o interior dos tecidos vegetais sem causar danos ao hospedeiro.

Os microrganismos endofíticos exercem diversas funções no ecossistema. Dentre essas funções, o estímulo ao desenvolvimento vegetal pela capacidade de atuarem na produção de fitohormônios, na fixação biológica de nitrogênio, na

solubilização de fósforo, no controle biológico de doenças (POLESI, 2011). As bactérias endofíticas têm se destacado, principalmente, em estudos relacionados ao controle biológico de fitopatógenos (MARTINS *et al.*, 2016). Esse fato está relacionado à capacidade de produzirem compostos orgânicos que atuam inibindo fitopatógenos e, simultaneamente, no estímulo ao crescimento e à indução de mecanismos de resistências nos vegetais (HALLMANN *et al.*, 1999).

Os estudos realizados para avaliar a comunidade bacteriana endofítica das plantas, uma vez isoladas, utilizam-se de técnicas de caracterização fenotípicas e moleculares concomitantemente. A associação dos dois tipos de caracterização, explica-se pela restrita aplicação dos métodos fenotípicos apenas aos espécimes cultiváveis, das quais muitas espécies já são conhecidas (LACAVA *et al.*, 2006).

O uso de técnicas fenotípicas na caracterização de isolados bacterianos endofíticos, baseia-se em seu cultivo em meio de cultura, avaliando as características visuais, como coloração das colônias, forma e elevação de bordo, margem e estrutura da colônia, assim como as avaliações sugeridas por Rodina (1972).

Desde a década de 1990, o gene do RNA ribossômico 16S (16S RNAr) (OLSEN *et al.*, 1986; HANDELSMAN, 2004; TOJU, 2015) é o marcador molecular mais comumente empregado na identificação taxonômica e estudos filogenéticos em bactérias (BECKER *et al.*, 2004). A comparação entre sequências do gene 16S RNAr na identificação taxonômica é baseada em suas características básicas, sendo elas: presença em todas as espécies de bactérias; função conservada do gene, o que sugere que variações nas sequências são consequências evolutivas e seu tamanho, de aproximadamente 1500 pb, que é suficientemente informativo para métodos de bioinformática (JANDA; ABBOTT, 2007).

No presente trabalho, o objetivo foi caracterizar fenotipicamente e identificar por sequenciamento do 16S RNAr os isolados bacterianos do cultivo *in vitro* dos bambus *Dendrocalamus asper*, *Bambusa oldhamii* e *Guadua chacoensis*.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Obtenção e purificação dos isolados bacterianos de bambu

O material microbiológico utilizado neste trabalho foi proveniente do projeto de tese de Daniela Weber Ribeiro dos Santos, do programa de pós-graduação em

Recursos Genéticos Vegetais (RGV), no ano de 2014. Os isolados bacterianos foram obtidos do cultivo *in vitro* de explantes de *Dendrocalamus asper* e segmentos nodais de *Bambusa oldhamii*. As bactérias, até então consideradas contaminantes, foram purificadas no Laboratório de Microbiologia, da Universidade Federal de Santa Catarina, *campus* Curitibanos, onde estão estocadas a temperatura de -50 °C.

4.2.2 Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos de bambu

Isolados bacterianos foram cultivados em meio LB sólido (Luria Bertani e Ágar) durante 24 h a 28°C. As características coloniais observadas foram: coloração, tamanho, forma, perfil, borda, transparência e estrutura. Para o agrupamento baseado nas características analisadas foi construída uma matriz com os dados observados nas colônias bacterianas, de acordo com a metodologia de Rodina (1972).

Na sequência, efetuou-se a coloração de Gram, caracterizando o tipo de parede celular dos isolados bacterianos (TORTORA *et al.*, 2012), para a identificação morfofisiológica.

Para o crescimento bacteriano dos isolados foi utilizado 5 mL do meio de cultura LB líquido por tubo de ensaio. A incubação foi a 28 °C com períodos de incubação de 24 h para a maioria dos isolados, com exceção dos isolados Ba22, Ba23, Ba24, Ba25, Ba27 e Ba30 que cresceram em 72 h.

4.2.3 Identificação molecular de isolados bacterianos de bambus

Oito isolados foram selecionados para identificação molecular, baseado na produção de AIA. Esses foram divididos em: isolados de baixa produção (AIA \leq 4 $\mu\text{g/mL}$): Ba16, Ba18 e Ba32; isolados de média produção ($4 > \text{AIA} \leq 10$ $\mu\text{g/mL}$): Ba03, Ba05 e Ba21 e isolados de alta produção (AIA > 10 $\mu\text{g/mL}$): Ba24 e Ba29.

Esses foram cultivados em 5 mL de meio LB líquido, por 24 h a 28 °C para extração do DNA genômico total pelo método Sambrook e Russel (2001). A qualidade e quantidade do DNA extraído foram avaliadas por estimativa visual em eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8 % (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) corado com GelRed® (Biotium).

Para a amplificação da sequência parcial do gene 16S RNAr, foi utilizado o par de *primers* 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'), descritos por Lane *et al.* (1991), amplificando um fragmento de aproximadamente 1500 pb. As reações de PCR foram constituídas de 20 µL contendo 1x PCR buffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,15 mM de dNTPs, 0,15 µM de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 0,8 unidades de Taq DNA polimerase (5U/µL) e 20 ng de DNA genômico. A amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi realizada em termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems), seguindo o programa: 94 °C por 4 min, 30 ciclos de 94 °C por 30 seg, 54 °C por 45 seg, 72 °C por 1 min, seguido de 7 min de extensão final à 72 °C. A qualidade dos produtos de PCR foi verificada em eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5%.

Os produtos de PCR foram purificados por meio de precipitação diferencial com solução de PEG8000 (20% PEG8000 e 2,5M NaCl) (LIS; SCHLEIF, 1975), e verificados em eletroforese horizontal em gel agarose 0,8%. A reação de sequenciamento bidirecional foi realizada com a utilização do kit Big Dye Terminator V3.1 (Applied Biosystems), consistindo em 1µL de *primer* 3,2 µM (*forward* e *reverse*, separadamente) 4 µL de tampão BDT (5x), 1µL de Big Dye Terminator, 1µL de produto de PCR purificado, para um volume final de 20 µL. Os ciclos foram realizados de acordo com o manual do fabricante do BigDye® (APPLIED BIOSYSTEM, 2002). A reação de sequenciamento foi purificada posteriormente pelo protocolo de precipitação com etanol/EDTA/acetato de sódio (APPLIED BIOSYSTEM, 2002).

O sequenciamento foi realizado pelo método Sanger (SANGER *et al.*, 1977) no sequenciador ABI 3500xl, e os eletroferogramas gerados foram analisados pelo *software* Sequencing Analysis v5.3.1. Em ambas as sequências geradas (*forward* e *reverse*), as extremidades de baixa qualidade foram eliminadas para garantir a maior confiabilidade dos dados. Utilizando-se do *software* CLC Main Workbench V 8.0.1, as sequências *forward* e *reverse* alinhadas e editadas, gerando a fita consenso de cada isolado. Todas as sequências geradas serão posteriormente submetidas ao GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

As sequências obtidas foram submetidas, separadamente, ao programa BLAST para nucleotídeos (Basic Local Alignment Search Tool) (ALTSCHUL *et al.*, 1997) para comparação de similaridade com sequências de 16S RNAr de Bacteria e Archea no

banco de dados GenBank. Após o BLASTn, foram selecionados os acessos maior identidade, no limite de 95% de identidade.

Devido ao experimento de inoculação dos isolados, prezou-se por fazer as inferências filogenéticas dos escolhidos para a inoculação, sendo estes os isolados Ba03, Ba16 e Ba24. Com isso, foram gerados quatro conjuntos de dados, sendo eles: i) Sequência do isolado Ba03 comparada a acessos dos GenBank ('Ba03'); ii) Sequência do isolado Ba16 comparada a acessos dos GenBank ('Ba16'); iii) Sequência do isolado Ba24 comparada a acessos dos GenBank ('Ba24'), e; iv) todos as sequências da região parcial do 16S RNAr obtidas no presente estudo para todos os isolados ('Isolados'). Para cada conjunto de dados, as sequências obtidas foram alinhadas pelo *software* ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994) contido no *software* CLC Main Workbench V 8.0.1.

4.2 RESULTADOS

4.2.1 Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos de bambu

Durante a purificação foram observadas três colorações básicas de colônias dos isolados bacterianos: amarela (A), branca (B) e vermelha (V) (Figura 3). Permitiu também, a caracterização das colônias quanto ao tamanho, perfil, tipo de borda, com ou sem transparência e estrutura (Tabela 1).

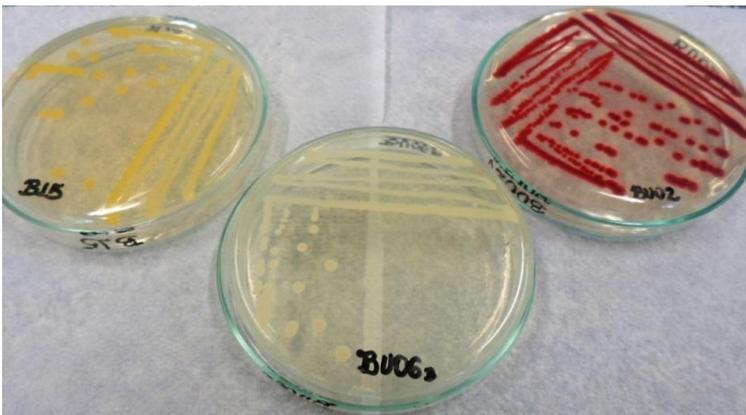


Figura 3. Coloração amarela, branca e vermelha das colônias de isolados bacterianos obtidos das culturas in vitro de bambu.

Tabela 1. Caracterização morfológica das colônias dos isolados bacterianos obtidos das culturas in vitro de bambus.

Isolado	Cor*	Tamanho*	Forma*	Perfil*	Borda*	Transparência	Estrutura*	Gram	Forma da célula	Tempo de crescimento
Ba01	V	M	Redonda	B	A	N	E	+	Bastonetes	24h
Ba02	V	M	Redonda	B	A	N	E	+	Bastonetes	24h
Ba03	V	M	Redonda	B	A	N	E	+	Bastonetes	24h
Ba04	B	G	Redonda	B	A	S	E	+	Bastonetes	24h
Ba05	B	G	Redonda	B	A	S	D	+	Bastonetes	24h
Ba06	B	M	Redonda	B	A	S	E	+	Bastonetes	24h
Ba07	V	M	Redonda	B	A	N	E	+	Bastonetes	24h
Ba08	V	M	Redonda	B	A	N	E	+	Bastonetes	24h
Ba09	V	M	Redonda	B	A	N	E	+	Bastonetes	24h
Ba10	V	M	Redonda	B	A	N	E	+	Bastonetes	24h
Ba11	B	P	Redonda	B	A	N	E	+	Bastonetes	24h
Ba12	A	M	Redonda	A	A	S	E	+	Bastonetes	24h
Ba13	V	M	Redonda	A	A	N	E	+	Bastonetes	24h
Ba14	V	M	Redonda	A	A	N	E	+	Bastonetes	24h
Ba15	B	P	Redonda	A	B	S	E	+	Bastonetes	24h
Ba16	B	G	Enrugada	E	E	N	B	+	Bastonetes	24h
Ba17	B	P	Redonda	A	B	S	E	+	Bastonetes	24h
Ba18	B	M	Enrugada	C	E	N	B	+	Bastonetes	24h
Ba19	B	P	Redonda	E	A	S	E	+	Bastonetes	24h
Ba20	B	G	Redonda	B	A	N	E	+	Bastonetes	24h
Ba21	A	P	Redonda	B	A	S	E	+	Bastonetes	24h
Ba22	B	G	Redonda	B	A	N	E	+	Bastonetes	72h

Isolado	Cor*	Tamanho*	Forma*	Perfil*	Borda*	Transparência	Estrutura*	Gram	Forma da célula	Tempo de crescimento
Ba22	B	G	Redonda	B	A	N	E	+	Bastonetes	72h
Ba23	A	P	Redonda	B	A	S	E	+	Bastonetes	72h
Ba24	A	P	Redonda	B	A	S	E	+	Bastonetes	72h
Ba25	B	M	Redonda	B	A	N	E	+	Bastonetes	72h
Ba26	A	P	Redonda	A	A	N	E	+	Bastonetes	24h
Ba27	A	P	Redonda	A	A	N	E	+	Bastonetes	72h
Ba28	A	P	Redonda	B	A	S	E	+	Bastonetes	24h
Ba29	A	P	Redonda	B	A	S	E	+	Bastonetes	24h
Ba30	B	P	Redonda	B	A	N	E	+	Bastonetes	72h
Ba31	A	P	Redonda	B	A	S	E	+	Bastonetes	24h
Ba32	B	G	Redonda	E	B	N	B	+	Bastonetes	24h

*Características coloniais baseadas em metodologia de Rodina (1972): tamanho, pequeno (P), médio (M) e grande (G); perfil, denominado como reto (A), convexo (B), tipo gota (C), elevado (E); borda, apresentadas como lisa (A), ondulada (B) e irregular (E); com transparência (S) e sem transparência (N); estrutura, apresentada como, friável (B), filiforme (D-E).

4.2.1.1 Coloração de Gram dos isolados bacterianos de bambu

Dos 32 isolados bacterianos, 100% eram bastonetes Gram-positivos (Tabela 1). As células dos três isolados foram coradas com o cristal violeta (Figura 4).



Figura 4. Coloração de Gram dos isolados de bambu micropropagados. Ampliação de 1000x. Bastonetes Gram-positivos. a) Isolado Ba03. b) Isolado Ba16. c) Isolado Ba24.

4.2.1.2 Identificação molecular dos isolados bacterianos

No presente estudo, foram geradas oito sequências parciais, dos isolados Ba03, Ba10, Ba05, Ba16, Ba18, Ba21, Ba24, Ba29 e Ba32, da região 16S do RNAr, as quais foram depositadas, no GenBank. A tabela 2 sumariza os dados resultantes do BLASTn para cada sequência gerada.

Tabela 2. Sequências parciais da região 16S RNAr dos isolados em estudo.

Isolados	Tamanho das sequências (pb)	Acesso GenBank	Espécie	% Identidade
Ba03	1380	NR_114043.1	<i>Serratia marcescens</i>	98,04%
Ba05	1370	NR_157735.1	<i>Bacillus proteolyticus</i>	99,12%
Ba16	1390	NR_102783.2	<i>Bacillus subtilis</i>	98,71%
Ba18	1395	NR_113589.1	<i>Brevibacillus parabrevis</i>	99,28%
Ba21	1396	NR_104940.1	<i>Atlantibacter hermannii</i>	97,64%
Ba24	1415	NR_113589.1	<i>Brevibacillus parabrevis</i>	96,89%
Ba29	1408	NR_104940.1	<i>Atlantibacter hermannii</i>	97,09%
Ba32	1412	NR_118439.1	<i>Bacillus aerius</i>	99,29%

Os modelos evolutivos mais adequados para os diferentes conjuntos de dados foram: TIM+I+G para 'Ba03', HKY+I+G para 'Ba16', TrN+I+G para 'Ba24' e TrN+G para 'Isolados', seguindo o critério Akaike (1974). Após o BLASTn, foram selecionados os acessos de maior identidade, no limite de 95% de comparação.

Após edição manual, os alinhamentos foram submetidos às análises filogenéticas usando a sequência parcial do 16S RNAr de *Escherichia coli* (NR_024570.1) como *outgroup*. As características de cada conjunto de dados estão sumarizadas nas figuras 6, 7 e 8.

4.2.2 Filogenia dos isolados

Os oito isolados cujas sequências parciais do 16S RNAr foram sequenciados no presente trabalho formaram três clados principais (Figura 5).

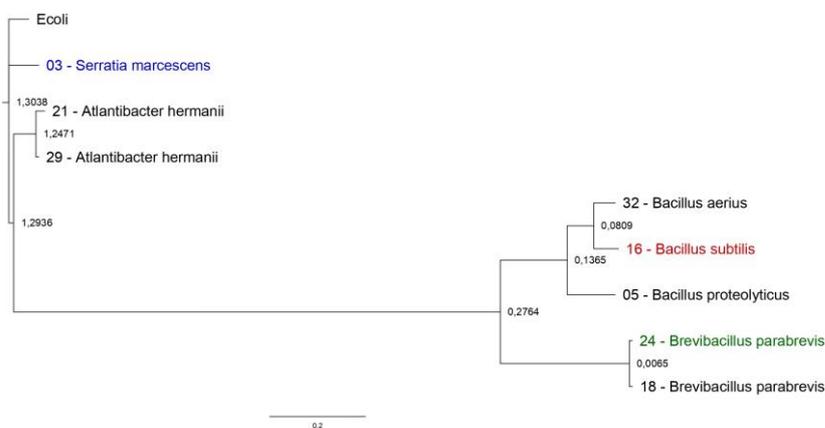


Figura 5. Inferência Bayesiana das sequências do gene 16S RNAr geradas de cada isolado. Nome a direita representa acesso GenBank de maior identidade. Os valores de probabilidade.

4.2.2.1 Filogenia do isolado Ba03

O isolado Ba03 apresentou maior identidade com o gênero *Serratia* pela análise do BLASTn (98-96%) (Figura 6), corroborando com a topologia observada pelas análises filogenéticas. O isolado Ba03 foi posicionado no agrupamento do gênero *Serratia* (PP = 0,78), formando um clado com a espécie *S. marcescens* de forte sustentação (PP = 0,93).

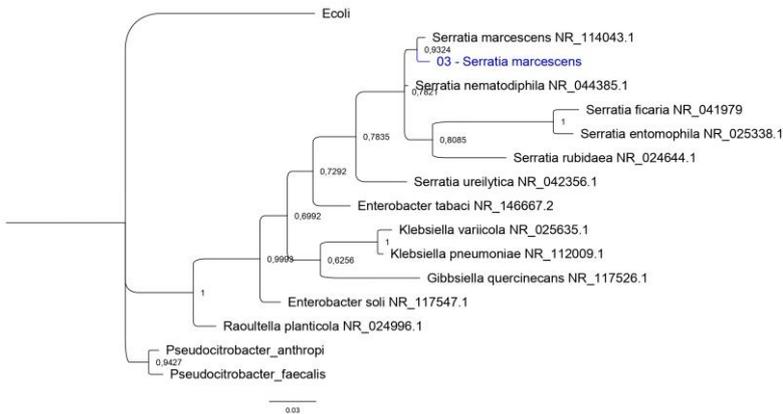


Figura 6. Inferência Bayesiana do conjunto de dados 'Ba03'. Os valores de probabilidade posterior estão indicados na árvore.

4.2.2.2 *Filogenia do isolado Ba16*

O isolado Ba16 apresentou identidade unicamente com o gênero *Bacillus*, com variações entre as espécies. A maior identidade observada, após o BLASTn, foi com *Bacillus subtilis* (99%) (Figura 7). A topologia apresentada agrupou o isolado Ba16 com os acessos de *B. subtilis* com PP = 0,65.

4.2.2.3 *Filogenia do isolado Ba24*

O BLASTn com o isolado Ba24 indicou similaridade da sequência com acessos do gênero *Brevibacillus*, com maior identidade para *Brevibacillus parabrevis* (97%) (Figura 8). O filograma agrupou o isolado 24 com os acessos de *Brevibacillus parabrevis* formando um clado de forte sustentação (PP = 0.98).

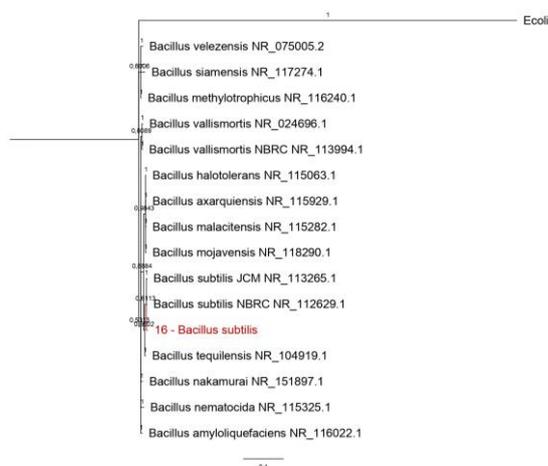


Figura 7. Inferência Bayesiana do conjunto de dados 'Ba16'. Os valores de probabilidade posterior estão indicados na árvore.

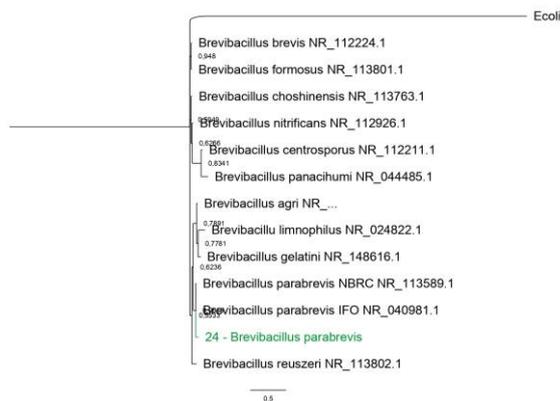


Figura 8. Inferência Bayesiana do conjunto de dados 'Ba24'. Os valores de probabilidade posterior estão indicados na árvore.

4.3 DISCUSSÃO

Os isolados do presente estudo provêm de brotos de bambu e durante o processo de estabelecimento passaram por assepsia, o que fortalece a hipótese de serem isolados endofíticos. Semelhante processo de desinfestação aconteceu no estudo de Yuan *et al.*, (2015) para o isolamento de bactérias do bambu Moso (*Phyllostachys pubescens*).

4.3.1 Caracterização fenotípica e identificação molecular dos isolados

A inferência Bayesiana utilizada em todos os isolados (Figura 5) separou pelo BLAST em clados distintos e famílias. Dentre as famílias encontradas nas sequências dos três isolados em estudo, estão a Paenibacillaceae para *Brevibacillus*, Bacillaceae para *Bacillus* e Enterobacteriaceae para *Serratia*.

Os isolados em clados próximos (Figura 5), *Atlantibacter* e *Serratia* são pertencentes à família Enterobacteriaceae. Esta é a família a qual o isolado Ba03, *Serratia marcescens* pertence. Uma família de bastonetes Gram-negativos, facultativamente anaeróbios, não formadores de esporos e onipresente na natureza (OCTAVIA; LAN, 2014; REBECCA *et al.*, 2013). Os mesmos autores descrevem a caracterização morfológica de *S. marcescens* em concordância com o presente estudo, colônia vermelha, redonda e borda lisa. *Serratia marcescens* é gram negativa, mas na sua análise foi positiva. Por algum motivo, na parede celular da bactéria, possivelmente, os lipídeos não foram removidos adequadamente, restando o cristal e permanecendo azul, dando reação positiva.

Pela identificação molecular, os isolados Ba03 e Ba16, apresentaram forte semelhança com *Serratia marcescens* e *Bacillus subtilis*, respectivamente. Segundo Azevedo, (1998); Schippers, (1987), *Serratia marcescens* e *Bacillus subtilis* fazem parte dos microrganismos essenciais ao ecossistema das plantas, por suprirem as necessidades de elementos de crescimento, como fósforo, nitrogênio e até mesmo, ferro.

A inferência filogenética do Ba16 revelou maior identidade com a espécie *Bacillus subtilis*. A descrição para essa espécie, segundo Brown (1939), corrobora as características das colônias observadas no presente estudo. O autor descreve as colônias com crescimento no meio ágar redondas ou irregulares, superfície sem brilho. Durante o crescimento, tornam-se espessas e opacas, podendo ficar enrugadas e com uma coloração creme ou marrom.

Em um trabalho de isolamento de bactérias de bambu Moso (*Phyllostachys pubescens*), Yuan *et al.*, (2015) encontraram o maior número de bactérias endofíticas nas raízes e no rizoma do bambu. Ainda, segundo os autores, entre os gêneros de maior abundância encontrava se o gênero *Bacillus*, condizente com o observado presente estudo.

A inferência filogenética do isolado Ba24 revelou maior identidade com a espécie *Brevibacillus parabrevis*. Assim como as colônias descritas nesse trabalho, Logan e Vos (2015) descreveram as colônias desse gênero como lisas e amareladas e Gram-positivas. Yuan *et al.*, (2015) encontraram em seus estudos, um isolado no rizoma de bambu Moso (*Phyllostachys pubescens*) com 99% de similaridade com *Brevibacillus parabrevis*, caracterizando-o como endofítico. Akbar *et al.*, (2015) encontraram similaridade de 99% com *Brevibacillus parabrevis* na identificação de seus isolados. Esses estudos confirmam os dados encontrados nesse trabalho, em que se obteve similaridade de 97% do isolado Ba24 com *Brevibacillus parabrevis*.

4.2.4.4 CONCLUSÃO

Os três isolados (Ba03, Ba16 e Ba24) sequenciados por meio da análise parcial da região 16S RNAr, apresentaram alta similaridade com as espécies *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis* e *Brevibacillus parabrevis*, respectivamente, e corroboraram as características fenotípicas observadas em cada isolado.

REFERÊNCIAS

AKAIKE, H. (1974). A new look at the statistical model identification. In *Selected Papers of Hirotugu Akaike* (pp. 215-222). Springer, New York, NY.

AKBAR, S.; SULTAN, S.; KERTESZ, M. (2015). Determination of cypermethrin degradation potential of soil bacteria along with plant growth-promoting characteristics. **Current microbiology**, 70(1), 75-84.

ALTSHUL, S. F. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res**, 25, 3389-3402.

ANDRADE G. 1999. Interacciones microbianas en la rizosfera. In: SIQUEIRA J.O., MOREIRA F.M.S., LOPES A.S., GUILHERME L.R.G., GAQUIM V., FURTINI-NETO A.E., CARVALHO J.G. (eds.). *Interação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas*. Lavras: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciência do Solo, 1999. p. 551-575.

APPLIED BIOSYSTEMS. (2002). **BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol**.

ARAÚJO, W. L. *et al.* (2014). *Micro-organismos Endofíticos: Aspectos Teóricos e Práticos de Isolamento e Caracterização*. **Santarém: UFOPA, PA, Brazil**.

AZEVEDO J.L. (1998). Microorganismos endofíticos. In: MELO I.S., AZEVEDO J.L. (eds.). *Ecologia Microbiana*. Editora EMBRAPA, Jaguariúna, São Paulo, Brasil, pp. 117-137.

AZEVEDO, J. L.; ARAUJO, W. L. (2007). Endophytic fungi of tropical plants: diversity and biotechnological aspects. **Fungi: multifaceted microbes**. **Anamaya Publishers, New Delhi, India**, p. 189-207.

- BECKER, K. *et al.* (2004). Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 11, p. 4988-4995.
- BROWN, J. H. (1939). *Bergey's manual of determinative bacteriology*.
- CAIRNEY J. W. G. (2000). Evolution of mycorrhizal systems. *Naturwissenschaften*, 87(11):467-475.
- CARDOSO E.J.B., NOGUEIRA M.A. (2007). A rizosfera e seus efeitos na comunidade microbiana e na nutrição de plantas. In: SILVEIRA A.P.D., FREITAS S.S. *Microbiota do solo e qualidade ambiental*. Campinas: Instituto Agrônômico, p. 79-96.
- CIPRES – Cyberinfrastructure for Phylogenetic Research. Disponível em: < <http://www.phylo.org/index.php>>. Acesso em 10 de jan. 2019.
- DABA M. (2016). Industrial, carbon sequestration and climate change mitigation potentials of bamboo. **Journal of Scientific Research & Reports**, 12(3):1-8.
- DOYLE, J. J. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12, 13-15.
- FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. (2017). Fungos endofíticos: potencial como controladores biológicos e estudos em videiras. **REVISTA UNINGÁ REVIEW**, v. 14, n. 1, p. 2-2.
- GLICKMANN, E.; DESSAUX, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. **Applied and environmental microbiology**, 61(2), 793-796.

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

HALLMANN, J.; RODRIGUEZ-KÁBANA, R.; KLOEPPER, J. W. (1999). Chitin-mediated changes in bacterial communities of the soil, rhizosphere and within roots of cotton in relation to nematode control. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, n. 4, p. 551-560.

HANDELSMAN, J. (2004). Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 68, n. 4, p. 669-685.

HUANG, X., CHAPARRO, J. M., REARDON, K. F., ZHANG, R., SHEN, Q., VIVANCO, J. M. (2014). Rhizosphere interactions: root exudates, microbes, and microbial communities. **Botany**, Ottawa, v. 92, n. 4, p. 267-275.

JANDA, J. M., ABBOTT, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. **Journal of clinical microbiology**, 45(9), 2761-2764.

KAMPERT, M.; STRZELCZYK, E.; POKOJSKA, A. (1975). Production of auxins by bacteria isolated from the roots of pine seedlings (*Pinus silvestris* L.). **Acta microbiologica Polonica**. Series B: Microbiologia applicata, 7(2), 135-143.

KELCHNER, S. A., GROUP, B. P. (2013). Higher level phylogenetic relationships within the bamboos (Poaceae: Bambusoideae) based on five plastid markers. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 67(2), 404-413.

KHAN, A. R., ULLAH, I., KHAN, A. L., PARK, G. S., WAQAS, M., HONG, S. J., SHIN, J. H. (2015). Improvement in phytoremediation potential of *Solanum nigrum* under cadmium contamination through endophytic-assisted *Serratia* sp. RSC-14 inoculation. **Environmental Science and Pollution Research**, 22(18), 14032-14042.

KUSS A.V., KUSS V.V., LOVATO T., FLORES M.L. (2007). Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas.

Pesquisa Agropecuária Brasileira, 42(10):1459-1465.

LACAVA P.T., ANDREOTE F.D., ARAÚJO W.L., AZEVEDO J.L. (2006).

Caracterização da comunidade bacteriana endofítica de citros por isolamento, PCR específico e DGGE. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 41(4):637-642.

LANE, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**, 115-175.

LIS, J.T.; SCHLEIF, R. (1975). Size fractionation of double-stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol. **Nucleic acids research**, 2(3): 383-390.

LODEWYCKX C., VANGRONSVELD J., PORTEOUS F., MOORE E. R. B., TAGHAVI S., MEZGEAY M., VAN DER LELIE D. (2002) Endophytic bacteria and their potential applications. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 21 (6): 583-606.

LOGAN, N. A., VOS, P. D. (2015). *Brevibacillus*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1-22.

MANDIC-MULEC, I., STEFANIC, P., van ELSAS, J. D. (2016). **Ecology of bacillaceae**. In *The Bacterial Spore: from Molecules to Systems* (pp. 59-85). American Society of Microbiology.

MARTINS, M. da C. B.; SANTOS, C. D. G. (2016). Ação de extratos de plantas medicinais sobre juvenis de *Meloidogyne incognita* raça 2. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 47, n. 1, p. 135-142.

MELLO, I. S. (1998). Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas: descrição e potencial de uso na agricultura. In: MELLO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA. cap. 3, p. 87-116.

MERRIMAN, P. R.; PRICE, R. D. KOLLMORGEN, J. F.; PIGGOTT, T.; RIDGE, E. H. (1974). Effect of seed inoculation with *Bacillus subtilis* and *Streptomyces griseus* on the growth of cereals and carrots. **Australian Journal of Agricultural Research**, 25(2), 219-226.

MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. **In 2010 gateway computing environments workshop (GCE)** (pp. 1-8). Ieee.

MOREIRA J.L.B., CARVALHO C.B.M., FROTA C.C. (2015). Visualização bacteriana e colorações. Fortaleza: Imprensa Universitária, 68 p.

OCTAVIA, S., LAN, R. (2014). The family enterobacteriaceae. *The Prokaryotes: Gammaproteobacteria*, 225-286.

OLSEN, G. J. *et al.* (1986). Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. **Annual reviews in microbiology**, v. 40, n. 1, p. 337-365.

POLESI, N. P. E. (2011). Microrganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Biociências** Porto Alegre, RS, v.9, n.4, p.533-541.

POSADA, D. (2008). jModelTest: Phylogenetic model averaging. **Molecular Biology and Evolution** 25: 1253–1256.

PEREIRA M.A.R., BERALDO A.L. (2007). Bambu de corpo e alma. Bauru, Editora Canal 6.

RADWAN, T. E. S. E. D.; MOHAMED, M. K.; REIS, V. M. (2005). Aeração e adição de sais na produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 40(10), 997-1004.

RAMBAUT, A. (2009). **FigTree v1. 3.1**: Tree figure drawing tool.

RATÓN, T. D. L. M. O., YANO, R., GÁMEZ, O. R., FLOH, E. I. S., DÍAZ, M. D. J. S., BARBOSA, H. R. (2012). Isolation and characterisation of aerobic endospore forming Bacilli from sugarcane rhizosphere for the selection of strains with agriculture potentialities. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 28(4), 1593-1603.

REBECCA, L. J., SUSITHRA, G., SHARMILA, S., DAS, M. P. (2013). Isolation and screening of chitinase producing *Serratia marcescens* from soil. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, 5(2), 192-195.

RODINA, A. G. (1972) **Methods in aquatic microbiology**. Baltimore, University Park Press.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, 19(12), 1572-1574.

SAHARAN, B., NEHRA, V. (2011). Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. **Life Science and Medical Research**, 21, 1-30.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbor, NY.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 74: 5463-5467.

SCHIPPERS, B.; BAKKER, A. W.; BAKKER, P. A. (1987). Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. **Annual review of Phytopathology**, 25(1), 339-358.

TEIXEIRA M.A., MELO I.S., VIEIRA R.F., COSTA F.E.C. HARA KAVA R. (2007). Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etno variedades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 42(1):43-49.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J.; (1994). CLUSTAL, W.: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleid Acid Research** 22: 4673-4680.

TOJU, H. (2015). High-throughput DNA barcoding for ecological network studies. **Population Ecology**, v. 57, n. 1, p. 37-51.

TORTORA, G.J. et al. (2012). **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed. 934p.

TURNER, J. T.; BACKMAN, P. A. (1991). Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. **Plant disease**, 75(4), 347-353.

YUAN, Z. S.; LIU, F.; ZHANG, G. F. (2015). Isolation of culturable endophytic bacteria from Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) and 16S rDNA diversity analysis. **Arch Biol Sci Belgrade**, 118, 57-66.

WANG, H. Y., CUI, K., HE, C. Y., ZENG, Y. F., LIAO, S. X., ZHANG, J. G. (2015). Endogenous hormonal equilibrium linked to bamboo culm development. **Genet Mol Res**, 14(3), 11312-23.

WEST, E. R.; COTHER, E. J.; STEEL, C. C. ASH, G. J. (2010). The characterization and diversity of bacterial endophytes of grapevine. **Canadian Journal of Microbiology**, 56(3), 209-216.

5 CAPÍTULO II – BACTÉRIAS ASSOCIADAS A BAMBUS *in vitro* E SEU POTENCIAL DE USO NA MICROPROPAGAÇÃO DE ABACAXIZEIRO

RESUMO

As biotecnologias associadas à micropropagação compreendem ferramentas úteis para a multiplicação em grande escala de genótipos de elite e conservação de germoplasma. Um obstáculo nessa técnica é a alta taxa de contaminação microbiana, sendo muitos desses endofíticos. No presente trabalho, o objetivo foi avaliar os efeitos de bactérias isoladas dos bambus *Dendrocalamus asper* e *Bambusa oldhamii* na cultura *in vitro* de abacaxi var. Pérola (*Ananas comosus* (L.) Merr). O experimento utilizou três das 32 bactérias isoladas, selecionadas por características morfológicas. Em um primeiro ensaio, a inoculação das bactérias isoladas foi feita simultaneamente com as culturas de abacaxi; em um segundo ensaio, os isolados bacterianos foram inoculados 30 dias após da repicagem nas culturas. Para estes dois ensaios, houve dois tratamentos controle: um com meio de cultura bacteriana Luria Bertani (LB) e outro, sem LB. Culturas de abacaxi inoculadas no primeiro ensaio, não sobreviveram. Para as culturas inoculadas após 30 dias, houve alta taxa de sobrevivência. Aquelas submetidas ao controle com LB, desenvolveram-se melhor que as amostras sem LB. Os resultados sugeriram que o LB estimulou as bactérias associadas às culturas de abacaxi, pois houve indução do crescimento da parte aérea. Isso sugeriu que a inoculação bacteriana fosse diluída para evitar a competição por nutrientes e assim, avaliar seu estímulo ao crescimento e à mitigação da contaminação por patógenos.

Palavras-chave: Bactérias endofíticas; cultivo *in vitro*; ácido indol acético.

ABSTRACT

Biotechnologies associated to micropropagation comprise useful tools for the large-scale elite genotypes multiplication and the germplasm conservation. An obstacle in this technique is the high rate of microbial contamination, mostly endophytic. This study aimed to evaluate the effects of bacterial isolated from the bamboos *Dendrocalamus asper* and *Bambusa oldhamii* in *in vitro* culture of pineapple Pérola (*Ananas comosus* (L.) Merr) variety. The procedure used three from the 32 isolated bacteria selected by morphological characteristics. Firstly, the inoculation of isolated bacterial colony was carried out simultaneously with the pineapple cultures; secondly, the isolated colonies were inoculated 30 days after the transplantation of the cultures. For these two assays, there were two control treatments: one with bacterial culture medium and another without LB. The inoculated pineapple cultures for the first assay did not survive. For the cultures inoculated after 30 days, there was high survival rate. Those submitted to control with LB developed more than those samples without LB. The results showed that LB stimulated the bacteria associated to the pineapple cultures, once there was the induction of the shoot growth in the aerial part. This suggests the inoculation should be diluted in order to avoid competition for nutrients between shoots and bacteria, to assess its stimulus to the growth and mitigation of the pathogen contamination.

Keywords: Endophytic bacteria; *in vitro* cultivation; indole acetic acid.

5.1 INTRODUÇÃO

Ferramentas biotecnológicas baseadas na micropropagação de plantas permitem a multiplicação em larga escala de genótipos elite, homogeneidade de plantas, qualidade fitossanitária e conservação de germoplasma de várias espécies de plantas, incluindo o abacaxi.

Para o desempenho eficiente da cultura do abacaxi, é necessário produzir mudas de boa qualidade para obter maior produtividade e qualidade dos frutos. A técnica convencional de obtenção de plântulas é prejudicial ao estabelecimento da cultura no campo, principalmente devido à contaminação por pragas e doenças. Assim, a produção de mudas de abacaxi em larga escala, livres de patógenos, tem sido um grande desafio, utilizando-se os métodos convencionais (CUNHA *et al.*, 1999; SCHERER *et al.*, 2013).

Uma outra dificuldade referente às técnicas de micropropagação, é a alta taxa de contaminação microbiana que dificulta o estabelecimento de protocolos para regeneração *in vitro*. Vários estudos mostraram que parte dos microrganismos contaminantes ocorre de forma endofítica, em cada planta. Uma definição recente sobre endofítico é relatada por Araújo (2014), como sendo microrganismos que podem ou não ser cultiváveis e habitam o interior dos tecidos vegetais, sem causar danos ao hospedeiro.

Na micropropagação do abacaxi, as taxas de multiplicação variam de acordo com a cultivar, bem como, com a composição do meio de cultura. Dos componentes frequentemente adicionados no meio de cultura para micropropagação, estão a auxina e citocinina, alternando os tipos e as concentrações de cada um. As auxinas, por exemplo, diferem significativamente na estabilidade, eficácia e sua influência na organogênese. Dentre as auxinas mais utilizadas está o ácido indol-acético (AIA) (MURASHIGE, 1974).

O ácido indol acético (AIA) é um hormônio vegetal, com efeito principal em enraizamento. A fim de obter colmos com rápido crescimento, segundo Wang *et al.*, (2015) é necessário um equilíbrio hormonal entre os hormônios endógenos, ácido indol-3-acético (AIA), zeatina ribosídeo (ZR), giberelinas (GA3) e ácido abscísico (ABA).

Com o objetivo de estudar a interação endófito-planta, o presente trabalho avaliou o efeito de isolados bacterianos de bambu, *Dendrocalamus asper* (Schult. & Schult.) Backer ex K. Heynee e *Bambusa oldhamii* Munro micropropagados, em abacaxi micropropagado var. Pérola (*Ananas comosus* (L.) Merr).

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Seleção dos isolados

Os isolados bacterianos utilizados neste trabalho vieram de brotos de bambu inoculados *in vitro* em meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Após uma semana inoculados em meio de cultura, foram observadas altas taxas de contaminação bacteriana, as quais foram isoladas e purificadas. Em seguida, foram armazenadas em criotubos em meio LB líquido com glicerol a 40% e armazenados em freezer a -50 °C.

A escolha das colônias bacterianas isoladas foi baseada na coloração, uma vez que três padrões foram constantemente observados entre os isolados: vermelho, amarelo e branco. As amostras selecionadas foram Ba03, Ba21 e Ba22. O isolado Ba03 possui coloração de colônia vermelha e formato redondo. Isolado Ba21 possui coloração de colônia amarela e forma redonda. O isolado Ba22 possui coloração de colônia branca e formato redondo.

5.2.2 Inoculação dos brotos de abacaxi

O experimento utilizando o abacaxi foi realizado para padronização de metodologia por meio de dois ensaios. Os brotos foram cultivados em frascos de vidro com capacidade de 340mL, cobertos com tampa de rosca de plástico. Cada frasco continha 10mL de MS líquido suplementado com sacarose (30 gL⁻¹), BAP 4 µM/L e ANA 2 µM/L, de acordo com Scherer *et al.* (2013) e foram inoculados com cinco brotos cada.

Os isolados bacterianos foram cultivados em 100mL de meio LB líquido por 24 h a 28°C. Para o primeiro ensaio, os isolados foram inoculados juntamente com brotos de abacaxi cultivados *in vitro*. Antes de serem colocados nos frascos, cada cinco

brotos foram deixados por um minuto em suspensão bacteriana para serem inoculados.

Para o segundo ensaio, 30 dias após o estabelecimento das culturas *in vitro*, os demais brotos de abacaxi repicados foram inoculados com 100 µL da suspensão bacteriana.

Ambos os ensaios tiveram dois tratamentos controle: um com adição de meio LB e outro sem LB. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado (DIC) com três repetições. Os frascos foram mantidos em sala de crescimento a 24 °C +/- 2 °C e com fotoperíodo de 16 h. Foi observado o tempo de sobrevivência.

5.2.3 Produção de Ácido Indol Acético (AIA) em isolados bacterianos de bambu

Simultaneamente às etapas de caracterização, os isolados foram submetidos ao teste de produção de ácido indol acético (AIA), por meio de análise qualitativa e quantitativa. O método colorimétrico Salkowski foi preparado a partir de cloreto férrico em ácido sulfúrico, 4,5g de FeCl₃ por litro em 10,2 M H₂SO₄ (GLICKMANN *et al.*, 1995).

Os isolados foram cultivados em tubos de ensaio contendo 5 mL do meio líquido LB, não enriquecido com triptofano, durante 24 h a 28 °C. Em seguida, a suspensão bacteriana foi adicionada ao reagente de Salkowski, na proporção 1:1 e mantida no escuro por 30 minutos. Cada amostra (isolado) foi avaliada em triplicata. Qualitativamente, a produção de compostos indólicos foi verificada pela intensidade colorimétrica da mistura (coloração rosa – produção de AIA positiva).

Para a quantificação dos compostos indólicos, fez-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 540 nm. A concentração dos compostos indólicos foi estimada pela curva padrão de AIA, previamente obtida, com valores conhecidos (Radwan *et al.*, 2005). Para ajuste da curva, fizeram-se alterações nas concentrações de AIA sintético na construção da curva, aumentando o número de pontos em um intervalo menor de valores, sendo as concentrações: 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10 µg/mL de AIA.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), havendo significância, as médias foram submetidas a teste de Tukey (5%), por meio do programa Sisvar.

5.3 RESULTADOS

Culturas de abacaxi que foram inoculadas 30 dias depois do cultivo mostraram maior taxa de sobrevivência (Figura 9c, 9d). Entre os brotos que foram inoculados simultaneamente à multiplicação, houve maior mortalidade (Figura 9b), bem como, em comparação com o controle sem meio LB (Figura 9c, d).

A coleção de isolados bacterianos apresentou ampla variação na produção de AIA, variando de 3 a 15,73 $\mu\text{g/mL}$. Os isolados Ba03, Ba21 e Ba22 produziram 9,03 $\mu\text{g/mL}$, 9,67 $\mu\text{g/mL}$ e 6,36 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Tabela 3). Na média, a produção dos três isolados foi de 8,35 $\mu\text{g/mL}$, semelhante à média de produção de todos os isolados da coleção (8,41 $\mu\text{g/mL}$) (Tabela 3).

Observou-se a formação de dois grupos de produtores de AIA (Tabela 3). O grupo 1 compreendeu a maior parte da coleção que produziu mais de 7 $\mu\text{g/mL}$. Este grupo produziu na média 10,47 $\mu\text{g/mL}$ de AIA (Tabela 1). Os isolados Ba03, Ba21 e Ba24 se encontram neste grupo.

O Grupo 2 apresentou onze isolados que produziram menos de 7 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 3). Esses produziram em média 4,47 $\mu\text{g/mL}$ de AIA, no qual o isolado Ba22 estava incluso.

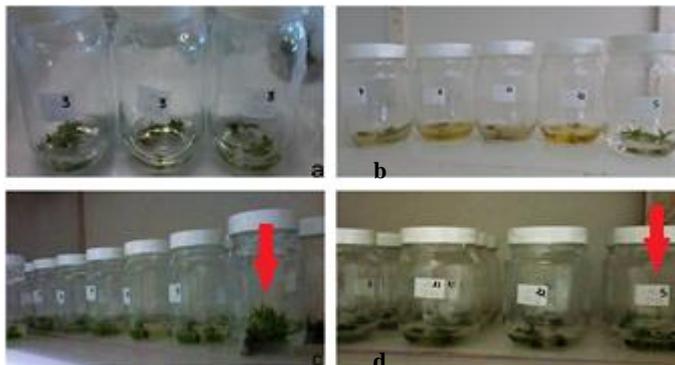


Figura 9. Inoculação de isolados de bambu em abacaxi. a) Brotos de abacaxi inoculados após a replicagem. b) Após dez dias de desenvolvimento dos brotos inoculados com os isolados bacterianos. c - d) Depois de dez dias do desenvolvimento dos brotos. Com destaque.

Dos isolados escolhidos para a inoculação futura no bambu (4.2.3 Cap I), o isolado Ba16 produziu 3 $\mu\text{g/mL}$, sendo o de menor produção e se encontra no grupo 2. Já os isolados Ba03 e Ba24 se encontram no grupo 1, sendo o isolado Ba03 de produção mediana (9,03 $\mu\text{g/mL}$) e o isolado Ba24 de maior produção (15,73 $\mu\text{g/mL}$). A média dos três foi de 9,25 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 3. Produção de AIA ($\mu\text{g/mL}$) pelos isolados bacterianos.

Grupo 1		Grupo 2	
Isolados	AIA	Isolados	AIA ($\mu\text{g/mL}$)
Ba01	11,10a	Ba11	4,15b
Ba02	11,08a	Ba15	3,98b
Ba03	9,03a	Ba16	3,00b
Ba04	10,39a	Ba17	6,47b
Ba05	9,68a	Ba18	3,47b
Ba06	8,64a	Ba19	4,25b
Ba07	11,08a	Ba22	4,85b
Ba08	9,92a	Ba27	6,36b
Ba09	10,43a	Ba30	6,11b
Ba10	9,79a	Ba32	3,18b
Ba12	7,68a		3,34b
Ba13	10,80a		
Ba14	9,90a		
Ba21	9,67a		
Ba23	11,49a		
Ba24	15,73a		
Ba25	12,02a		
Ba26	8,42a		
Ba28	8,60a		
Ba29	14,51a		
Bac31	9,88a		
Média 1	10,47	Média 2	4,47
Média geral			8,41

Médias seguidas de letras diferentes indicam diferenças significativas pelo teste de Tukey ao nível de 5%. CV (%) = 31,72.

5.4 DISCUSSÃO

Os brotos de abacaxi inoculados com os isolados, 30 dias após a multiplicação tiveram tempo de sobrevivência mais longo, pois já estavam estabelecidos no meio MS. Além disto, observou-se que o tratamento com LB teve melhor desenvolvimento,

em comparação aos demais. Possivelmente, o desempenho das plantas estava relacionado à microbiota endofítica associada a elas. Resultado semelhante foi encontrado no trabalho de Quambush *et al.* (2018), em que observaram melhor desempenho *in vitro* dos diferentes genótipos de *Prunus avium*, quando foram inoculados com diferentes populações de bactérias endofíticas.

Em contraste, os isolados inoculados simultaneamente à multiplicação dos brotos ocasionaram maior taxa de mortalidade desses. Possivelmente, a mortalidade foi em decorrência da competição bacteriana por nutrientes no meio com as plantas, comprometendo seu desenvolvimento.

Os isolados apresentaram produção de AIA com ampla taxa de variação (de 3 a 15,73 $\mu\text{g/mL}$), dentre essa faixa encontrou-se o valor de 4,47 $\mu\text{g/mL}$, média obtida pelo grupo 2 nesse estudo (Tabela 03), sem adição de triptofano ao meio. De acordo com a literatura, a adição de triptofano ao meio de cultura promove a síntese do AIA (FLORENTINO *et al.*, 2017; MOHITE, 2013). No entanto, o aminoácido triptofano não é o principal precursor da rota de produção do composto, podendo ocorrer com ou sem sua adição. A produção de AIA sem adição de triptofano também foi observada próxima a esse valor, 5,08 $\mu\text{g/mL}$ de AIA, entre rizobactérias diazotróficas endofíticas de arroz (KUSS *et al.*, 2007).

A sobrevivência e o desenvolvimento do abacaxi foram atribuídos exclusivamente à produção bacteriana do AIA. Nesse intuito, outro valor que foi semelhante ao encontrado para o grupo 2 foi observado no estímulo ao desenvolvimento de alface, pela inoculação bacteriana sem adição de triptofano ao meio de cultura (FLORENTINO *et al.*, 2017). As bactérias introduzidas produziam, no mínimo, 3 $\mu\text{g/mL}$ de AIA.

Como apresentado no Cap. I, o isolado Ba03 foi identificado com a espécie *Serratia marcescens* que produziu 9,03 $\mu\text{g/mL}$ de AIA, sem adição de triptofano. Em um trabalho com isolado endofítico de *Serratia marcescens*, Selvakumar *et al.*, (2007) observaram produção de 11,1 $\mu\text{g/mL}$ de AIA, porém, com adição de triptofano. São valores que mostram a coerência das concentrações de AIA obtidas, pois sabe-se que o triptofano é um precursor do AIA, estimulando a produção nas bactérias.

O isolado Ba24 identificado como *Brevibacillus parabrevis* apresentou produção de AIA de 11,2 $\mu\text{g/mL}$. No trabalho desenvolvido por Akbar *et al.*, 2015, foi encontrada produção semelhante, de 15,75 $\mu\text{g/mL}$, para isolado de *B. parabrevis*.

Os resultados do presente trabalho indicam o potencial dos isolados bacterianos em promover o crescimento do abacaxi *in vitro*, especialmente, após o estabelecimento da cultura. O desenvolvimento adequado das culturas pode estar associado à inoculação tardia bacteriana, sugerindo uma diluição no número de células, para evitar a competição por nutrientes e assim, evidenciar os efeitos benéficos da inoculação na micropropagação das plantas, inclusive no bambu.

5.5 CONCLUSÃO

O meio de cultura MS suplementado com o meio LB aumentou o desenvolvimento de brotos de abacaxi, possivelmente pelo estímulo à microbiota endofítica.

A inoculação tardia dos isolados, 30 dias após o estabelecimento dos brotos de abacaxi promoveu maior sobrevivência desses.

Isolados bacterianos inoculados em culturas *in vitro* de abacaxi, produziram em média 8,41µg/mL de AIA, valor que sugeriu seu potencial para promover o crescimento desses brotos.

Todos os isolados bacterianos obtidos de culturas *in vitro* dos bambus *Dendrocalamus asper* e *Bambusa oldhami* produziram AIA, sendo considerados promissores para o crescimento de plantas.

REFERÊNCIAS

- BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; OLIVARES, F. L.; VIANA, A. P.; BRESSAN-SMITH, R. (2010). Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. Revista Brasileira de Ciência do Solo, 34(2), 349-360. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-06832010000200008>.
- CUNHA, G. D.; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, L. D. S. (1999). O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia.

FLORENTINO, L. *et al.* (2017). Inoculação de bactérias produtoras de ácido 3-indol acético em plantas de alface (*Lactuca sativa* L.). *rev.colomb.cienc.hortic.*, Bogotá , v. 11, n. 1, p. 89-96, June . Available from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S201121732017000100089&lng=en&nrm=iso. access on 31 Jan. 2019. <http://dx.doi.org/10.17584/rcch.2017v11i1.5780>.

BERNARD R. GLICK, P. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, vol. 2012, Article ID 963401, 15 p. Disponível em: <https://doi.org/10.6064/2012/963401>.

GLICKMANN, E.; DESSAUX, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 61(2), 793-796.

MOHITE, B. (2013). Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, 13(3), 638-649, <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162013005000051>.

KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; Flôres, M. L. (2007). Nitrogen fixation and in vitro production of indolacetic acid by endophytic diazotrophic bacteria. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 42(10), 1459-1465.

LEONE, G. F.; ALMEIDA, C. V. D.; ABREU-TARAZI, M. F. D.; BATAGIN-PIOTTO, K. D.; ARTIOLI-COELHO, F. A.; ALMEIDA, M. D. (2016). Antibiotic therapy in Pineapple (*Ananas comosus*) microplants. **Ciência Rural**, 46(1), 89-94.

MURASHIGE, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. **Annual Review of Plant Physiology**, vol. 25, p.135-66, <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.25.060174.001031>.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, 15,473–497
<https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. (2002). Role of pseudomonas putida indoleacetic acid in development of the host plant root system. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 8, p. 3795-3801, doi: 10.1128/AEM.68.8.3795-3801.2002.

QUAMBUSCH, M.; PIRTTILÄ, A. M.; TEJESVI, M. V.; WINKELMANN, T.; BARTSCH, M. (2014). Endophytic bacteria in plant tissue culture: differences between easy-and difficult-to-propagate *Prunus avium* genotypes. **Tree physiology**, 34(5), 524-533.

SELVAKUMAR, G. *et al.* (2008). Cold tolerance and plant growth promotion potential of *Serratia marcescens* strain SRM (MTCC 8708) isolated from flowers of summer squash (*Cucurbitapepo*). *Letters in applied microbiology*, v. 46, n. 2, p. 171-175.

SCHERER, R.F.; GARCIA, A.C.; FRAGA, H.P.F.; DAL VESCO, L.L.; STEINMACHER, D.A.; GUERRA, M.P. (2013). Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*). **Scientia Horticulturae**, v. 151, p. 38-45, <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.11.027>.

ZHU, Y. SHE, X. (2018). Evaluation of the plant-growth-promoting abilities of endophytic bacteria from the psammophyte *Ammodendron bifolium*. *Can. J. Microbiol.* v. 64, p. 1-12, <https://doi.org/10.1139/cjm-2017-0529>.

6 CAPÍTULO III - EFEITOS DA INOCULAÇÃO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE AIA EM CULTURAS *in vitro* DE *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & P. M. Peterson

RESUMO

Guadua chacoensis (Poaceae) é um bambu lenhoso nativo encontrado na Mata Atlântica. O avanço do uso desta espécie no setor socioeconômico e aliado à sua importância ecológica estimula o desenvolvimento de métodos rápidos e eficazes para sua propagação, visando à disponibilização de mudas de qualidade. Ferramentas biotecnológicas baseadas em cultura de tecidos podem ser usadas para propagar genótipos específicos em massa. Dentre os métodos, inclui o desenvolvimento de protocolos de micropropagação. Um fator limitante para o sucesso da micropropagação é a elevada taxa de contaminação por microrganismos. Estudos preliminares sugerem que alguns microrganismos contaminantes podem ser endofíticos e promover o crescimento vegetativo. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial dos isolados bacterianos de *Serratia marcescens* (Ba03), de *Bacillus subtilis* (Ba16), e de *Brevibacillus parabrevis* (Ba24), obtidos de *Dendrocalamus asper* e *Bambusa oldhamii* na promoção do crescimento de *Guadua chacoensis* por meio da inoculação. Ao décimo quinto dia de subcultivo de *Guadua chacoensis in vitro* foi inoculado 0,1 mL de cada suspensão dos isolados bacterianos na região basal das touceiras. Após trinta dias da inoculação, foram avaliados morfológicamente, o número e a altura dos brotos e o número e o comprimento das raízes. O isolado Ba16 *B. subtilis*, não diferiu em número de raízes em relação aos demais isolados, porém, apresentou aumento no comprimento das raízes e na altura dos colmos. O isolado Ba03 não diferiu em nenhum aspecto e no Ba24 observou-se uma alta produção de gás no meio de cultivo. Esse foi o primeiro estudo em que se avaliou o uso potencial de bactérias endofíticas na promoção de crescimento em bambu *in vitro*.

Palavras-chave: Micropropagação; bambu; co-cultivo.

ABSTRACT

Guadua chacoensis (Poaceae) is a native woody bamboo found in the Atlantic Forest. The advance of its use in the socioeconomic sector, associated to its ecological importance, stimulates the development of fast and efficient methods for its propagation, aiming at the propagation of quality seedlings. Biotechnological tools based on tissue culture may be used to propagate specific genotypes in bulk. These methods include the development of micropropagation protocols. A limiting factor for the success of micropropagation is the high rate of contamination by microorganisms. Preliminary studies suggest some contaminating microorganisms may be endophytic and beneficial, promoting vegetative growth when handled correctly. The aim of this study was to identify and evaluate the potential of the bacterial isolates *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis* and *Brevibacillus parabrevis* obtained from *Dendrocalamus asper* and *Bambusa oldhamii* in the growth promotion of *Guadua chacoensis*. On the fifteenth day of subcultivation of *Guadua chacoensis in vitro*, 0.1 ml of each bacterial isolate was inoculated in the basal region of the clumps. After thirty days of inoculation, there were morphological evaluations concerning the number and height of shoots and, number and length of roots. Forty-five days after inoculation, the stem oxidation rate per clump was observed. The bacterial isolate of *B. subtilis* did not differ in number of roots compared to the other isolates (*B. parabrevis* and *S. marcescens*). However, it was superior in root length and stem height. The Ba03 isolate did not differ in any aspect. In Ba24, a high gas production in the culture medium was observed. This was the first study to evaluate the potential use of endophytic bacteria in promoting *in vitro* bamboo growth.

Keyword: Micropropagation; Bamboo; Co-cultivation.

6.1 INTRODUÇÃO

Considerando a importância ambiental, social e econômica de *G. chacoensis*, estudos que visem aperfeiçoar a produção de mudas em larga escala são prioritários para o desenvolvimento da cadeia produtiva no mundo. Um dos principais gargalos da atual cadeia produtiva é a baixa oferta de mudas de bambus de boa qualidade genética e fitossanitária, pois, os métodos convencionais de propagação não atendem a crescente demanda (RAO *et al.*, 1998).

Entre os métodos existentes de propagação vegetativa de bambus, destacam-se o seccionamento do rizoma e o uso de porções de colmos com uma ou mais gemas. Indicados para espécies de bambus alastrantes e para bambus entouceirantes. Em ambos os casos, as taxas de estabelecimento são variáveis em função da sazonalidade, estado nutricional e reguladores fisiológicos da espécie propagada (SINGH *et al.*, 2004; NETO *et al.*, 2009).

Métodos convencionais de propagação por meio de brotações basais de colmo, segmentos nodais de ramos laterais e divisão de touceiras jovens já são conhecidos e utilizados na produção de mudas em larga escala de algumas espécies de *Guaduas*. Esses são comumente relatados na literatura americana e são conhecidos, respectivamente, por chusquines, riendas e macroproliferação (CRUZRIOS, 2009; ORNELLAS, 2017). Outro método é a propagação por sementes. Porém, essas estão disponíveis em intervalos em torno de 30 anos para as espécies do gênero *Guadua*.

Com a baixa eficiência propagativa dos métodos convencionais, torna-se necessário o desenvolvimento de métodos alternativos de propagação (PEETERS *et al.*, 2001; ARAUJO *et al.*, 2015). A propagação vegetativa se apresenta como uma alternativa importante, especialmente, por possibilitar a reprodução de clones de alta produtividade, ou seja, germoplasmas elite, com garantia de qualidade genética e fitossanitária (GUERRA *et al.*, 1999; ORNELLAS, 2017).

Dentre as diversas técnicas de propagação vegetativa, a micropropagação apresenta potencial para bambus, em especial para as espécies de bambus lignificados, sendo uma importante alternativa para produção de mudas em larga escala e em curtos períodos de tempo (MUDOI *et al.*, 2013;). Além disso, o cultivo *in*

vitro possibilita a conservação *ex situ* de recursos genéticos, complementando métodos de conservação *in situ* a médio e longo prazo, isolando o germoplasma de fatores bióticos e abióticos do meio ambiente (ENGELMANN, 2011; SINGH *et al.*, 2013).

A contaminação por microrganismos na introdução de espécies de bambus *in vitro* é um dos principais gargalos para a micropropagação, devido à elevada taxa de desenvolvimento desses microrganismos associados às plantas matrizes, especialmente quando essas se encontram em condições de campo (RAMANAYAKE *et al.*, 2006). Porém, a rizosfera apresenta a ocorrência de grande diversidade de bactérias que são predominantemente benéficas para as plantas (HALLMANN, *et al.*, 1997; AZEVEDO *et al.*, 2000). Assim, muitos microrganismos considerados contaminantes são caracterizados como endofíticos, ou seja, têm a capacidade de colonizar tecidos vegetais e serem benéficos.

As bactérias endofíticas estão presentes na maioria das plantas, de forma latente ou ativa nos tecidos vegetais e têm potencial no crescimento de plantas, estimulando a produção de fitohormônios, solubilização de fosfato e fixação de nitrogênio (CHEN *et al.*, 2006, SELVAKUMAR *et al.*, 2008).

Uma técnica inovadora e que vem se mostrando promissora é a aplicação desses microrganismos na micropropagação, denominada *biopriming in vitro* (BERNAL, *et al.*, 2008). Em estudos de inoculação de microrganismos endofíticos em cultivo *in vitro*, antes da aclimatização, mostrou evidências de maior taxa de sobrevivência das plantas *ex vitro*. Foi observada a contribuição no enraizamento, na brotação e no aumento da taxa fotossintética em cana-de-açúcar, aumentando o rendimento na propagação (NOWAK; PRUSKI, 2004).

Dentre os gêneros bacterianos empregados nessas técnicas estão *Gluconacetobacter* spp, *Acinetobacter* spp, *Actinomyces* spp, *Agrobacterium* spp, *Azospirillum* spp, *Bacillus* spp, *Burkholderia* spp, *Curtobacterium* spp, *Pantoea* spp, *Pseudomonas* spp e *Xanthomonas* spp que podem promover o crescimento vegetal por meio da produção de AIA- ácido indol acético (PATTEN; GLICK, 1996; KHAN *et al.*, 2016, YU *et al.*, 2016).

Com base nessas informações, no presente trabalho, o objetivo foi avaliar os efeitos da inoculação dos isolados de *S. marcescens* (Ba03), de *B. subtilis* (Ba16) e

de *B. parabrevis* (Ba24) na promoção do crescimento de culturas *in vitro* de bambu lignificado *G. chacoensis*.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Material vegetal

Touceiras cultivadas *in vitro* de *G. chacoensis* em tufo de 3-6 colmos foram subcultivados no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento Genéticas Vegetais (LFDGV), no departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), em frascos tipo conserva (340 mL) com 30 mL do meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962), geleificado isento fitorreguladores. As culturas permaneceram, durante 40 dias, a fim de evitar a influência de efeitos residuais dos fitorreguladores utilizados durante a fase de multiplicação. Após este período, os brotos foram divididos e subcultivados em tubos de ensaio contendo 20 mL do meio de cultura basal MS.

Ao meio de cultura básico MS foi adicionado de 2 mL/L de vitaminas de Morel (MOREL; WETMORE, 1951), 30 g/L de sacarose, 2 g/L de Phytigel[®], como agente geleificante. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem (121 °C e 1,3 atm) por 15 minutos. A incubação das culturas foi em sala de crescimento em condições controladas de temperatura (24 °C ± 2 °C) e fotoperíodo (16h de luz).

6.2.2 Isolamento e preparo do inóculo

Os isolados bacterianos utilizados foram obtidos de culturas *in vitro* de *Dendrocalamus asper* e *Bambusa oldhamii*, durante o processo de indução e estabelecimento *in vitro*. As bactérias foram isoladas e armazenadas de acordo com o procedimento citado no Cap. I.

De acordo com a análise de produção de AIA (Cap. II) foram selecionados os isolados de *B. parabrevis* (Ba24), de *B. subtilis* (Ba16) e *S. marcescens* (Ba03), que produziram, respectivamente, 15,73 µg/mL 9,03 µg/mL e 3,00 µg/mL de AIA (Tabela 3 do Cap. II).

Para o preparo do inóculo, os isolados foram cultivados em erlenmeyer com 300 mL de meio Luria Bertain (LB) líquido e mantidos em 28 °C por 24h.

Cada inóculo foi dividido em três partes, para inoculação das plantas em três dias consecutivos. O primeiro terço foi separado das outras partes, diluído e inoculado no bloco (repetição), após as 24h de crescimento das culturas bacterianas. Os outros terços de cada inóculo foram centrifugados, separadamente, por 20 min a 3000 rpm. Os sobrenadantes foram descartados e cada inóculo foi acondicionado em freezer a -20 °C. Para a inoculação nos dias seguintes, cada inóculo foi ressuspenso em 100 mL de LB líquido esterilizado, posteriormente foi procedida a diluição. O mesmo procedimento foi feito com meio LB sem inoculação de bactérias, que foi um dos tratamentos controle.

6.2.3 Efeito dos isolados bacterianos em *G. chacoensis*

Brotações de bambu com 15 dias de cultivo, foram inoculadas com 100 µL de cada uma das diluições (10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8}) das suspensões de cada isolado bacteriano. A inoculação foi feita na região basal das touceiras *in vitro*.

O delineamento experimental utilizado foi bifatorial (4x3) com uma testemunha adicional. O primeiro fator foi composto por: três isolados bacterianos e um controle com adição de 100 µL de meio LB ao meio MS. O segundo fator foi composto por três diluições de cada inóculo bacteriano e do controle com LB (10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8}). A testemunha adicional foram amostras com MS.

Cada unidade experimental consistiu em tubos contendo 20 mL do meio de cultura básico MS geleificado, com uma touceira de 3-6 colmos. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, com três repetições por tratamento.

Para a quantificação do número de células inoculadas, uma alíquota de 100 µL de cada uma das diluições foi plaqueada em meio LB sólido, em triplicata. Após 24 h, foram contabilizadas as unidades formadoras de colônias (UFC).

Após a inoculação, as culturas de *G. chacoensis* foram observadas até completarem 30 dias da inoculação, totalizando um ciclo de 45 dias para as plantas. As avaliações morfológicas das plantas consistiram na quantificação do número e altura de brotos e número e comprimento das raízes. A taxa de multiplicação das plantas, aos 45 dias de cultivo foi determinada pela razão entre o número de colmos

por touceira aos 45 dias e o número inicial de colmos por touceira subcultivada (dia 0). Observou-se, ainda, a taxa de oxidação de colmos por touceira aos 45 dias de cultivo das plantas de *G. chacoensis*.



Figura 10. Inoculação dos isolados bacterianos na base das culturas in vitro de *Guadua chacoensis*.

6.2.4 Análises estatísticas

Dados originais e quantitativos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste SNK (5%) de separação de médias, de acordo com as recomendações de Compton (1994). As análises foram realizadas na plataforma R e utilizando-se a biblioteca Agricolae (R CORE TEAM, 2018; MENDIBURU, 2017).

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Quantificação de UFC nos isolados selecionados

O isolado de *S. marcescens* (Ba03) apresentou maior crescimento médio, entre três diluições e uma faixa de crescimento médio, de 30 a 300 UFC. O isolado *B. parabrevis* (Ba24) obteve uma faixa de crescimento médio de até 30 UFC em 24h de incubação. O isolado *B. subtilis* (Bac16) não foi possível quantificar.

6.3.1 Efeito da inoculação *in vitro* de plantas de *Guadua chacoensis*

O início do crescimento bacteriano, na rizosfera dos bambus e superfície do meio de cultura, para os três tratamentos com inóculos bacterianos, foi observado após três dias da inoculação (Figura 11a, b e c). Após 30 dias, observou-se que o isolado de *B. parabrevis* (Ba24) apresentou a formação de bolhas de ar no meio de cultura (Figura 11).

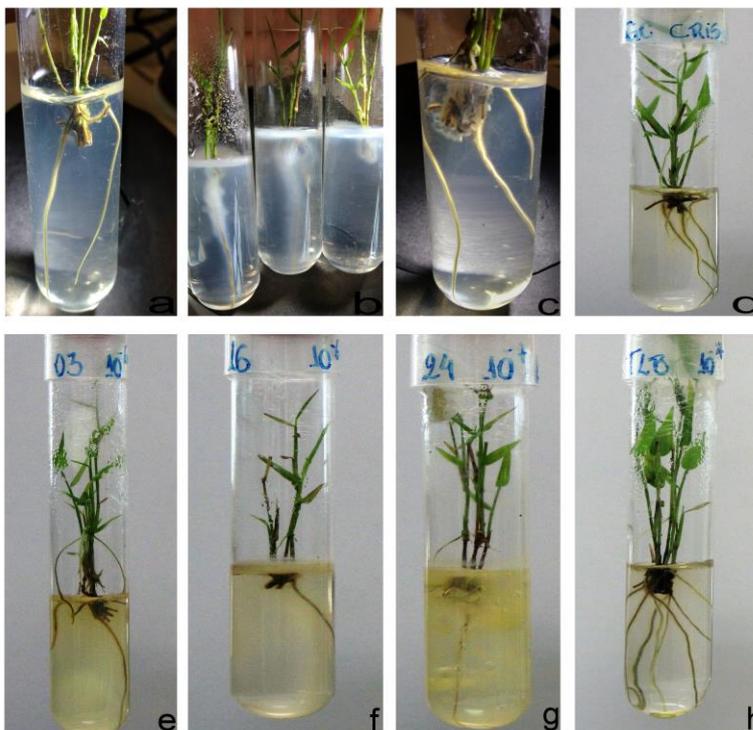


Figura 11. Desenvolvimento de colmos de *Guadua chacoensis* *in vitro* após inoculação dos isolados. a, b e c) Isolados Ba03, Ba16 e Ba24, após três dias da inoculação em meio de cultura MS. e, f e g) Bambus *Guadua chacoensis* após 30 dias da inoculação dos isolados bacterianos. d, h) Testemunhas. d) Tratamento com Luria Bertani (LB) h) Tratamento com LB após 30 da inoculação.

Após os dados serem submetidos à análise estatística, foi observado que nenhum dos parâmetros analisados entre os tratamentos, quando comparados com a testemunha adicional (MS), foram significativos.

Ao analisar a altura (H) dos brotos (Figura 12), os tamanhos dos colmos tiveram valores de comprimento próximos. Observou-se que quanto mais diluída foi a concentração do inóculo, maior foram as alturas dos bambus, e, que o isolado Ba03 foi o que menos induziu o crescimento. Porém, não foi significativo ($p=0,1853$).

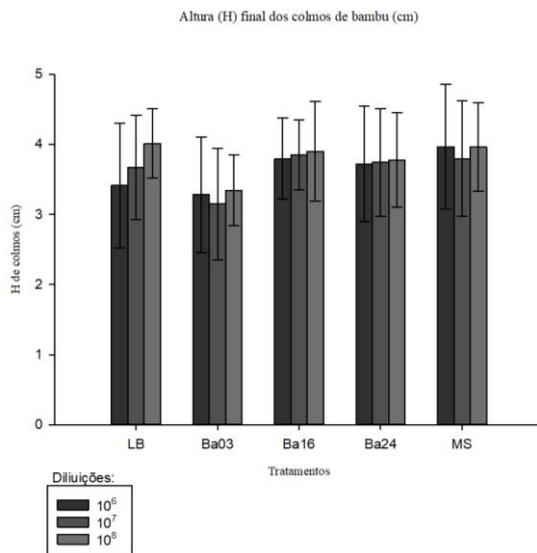


Figura 12. Avaliação das alturas dos colmos entre fatorial e testemunha (MS).

Analisando o número (N) de raízes (Figura 13), também não houve diferença significativa ($p=0,4203$). Observou-se que todos os comprimentos de raízes, entre os diferentes fatores, tiveram valores próximos aos da testemunha, com exceção do isolado Ba24 na diluição 10^{-8} que apresentou o maior comprimento, comparado aos demais.

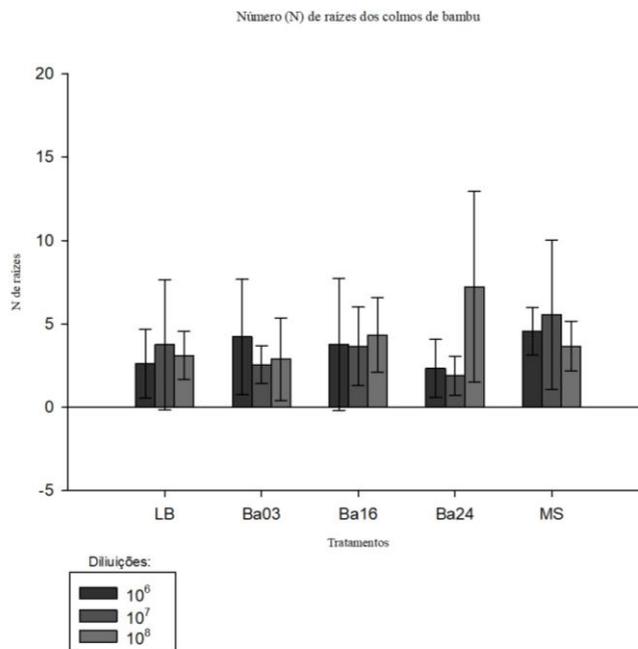


Figura 13. Avaliação do número de raízes entre fatorial e testemunha (MS).

Ao analisar o comprimento (L) de raízes (Figura 14), também não significativo ($p=0,3326$). Observou-se que os valores mais expressivos e próximos da testemunha foram os fatores com LB e o isolado Ba16.

Quanto à taxa de ocorrência de colmos oxidados, observou-se o aumento na oxidação com a inoculação das bactérias, majoritariamente com a inoculação do Ba24.

A diluição dos isolados influenciou apenas no parâmetro do número de raízes por touceira. Na inoculação de meio LB, com a concentração mais diluída (10^{-8}), reduziu o número de raízes produzidas por cada planta. Efeito semelhante foi observado com as maiores diluições (10^{-7} e 10^{-8}) do inóculo bacteriano com Ba03. Já no isolado Ba24, a menor concentração do inóculo (10^{-8}) estimulou o aumento na rizogênese nas plantas *in vitro* de *G. chacoensis*.

Nos tratamentos controles, com LB e sem LB, as plantas tiveram um crescimento semelhante, em todos os parâmetros.

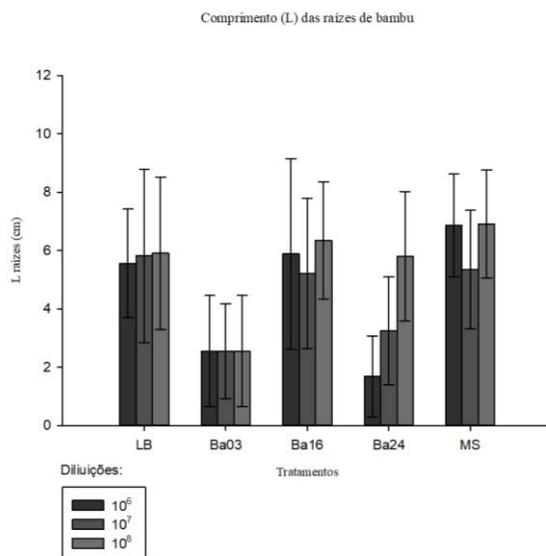


Figura 14. Avaliação do comprimento de raízes entre fatorial e testemunha (MS).

6.4 DISCUSSÃO

6.4.1 Efeitos da inoculação *in vitro* de plantas de *G. chacoensis*

No conceito de clássico de micropropagação, as culturas *in vitro* são consideradas axênicas, ou seja, as plantas são cultivadas na ausência de

microrganismos. Essa perspectiva tem mudado, por meio de diversos trabalhos que evidenciam a ocorrência desses microrganismos de forma latente, sob condições endofíticas em cultivos *in vitro* (ALMEIDA *et al.*, 2009). Análises moleculares de metagenômica mostram que pode ocorrer grande diversidade de microrganismo em culturas de plantas *in vitro*, visualmente consideradas assépticas. Essa mudança de paradigma alavancou os estudos acerca de desinfestação e controle de contaminantes em culturas *in vitro* de plantas.

Por outro lado, o entendimento que os microrganismos podem colaborar com o desenvolvimento das plantas *in vitro*, assim como na condição *in vivo*, permitiu estudos de inoculação e co-cultivo desses microrganismos sob condições controladas, como o *biopriming*.

No presente estudo, avaliou-se o potencial de promoção de crescimento de plantas *in vitro* de *G. chacoensis* por meio da inoculação com três bactérias potencialmente promotoras de crescimento, devido a produção de AIA. Esta auxina natural atua de forma importante no metabolismo dos vegetais. Seus efeitos estão envolvidos em várias vias do crescimento, mas especialmente nas relacionadas ao enraizamento.

De maneira geral, os isolados selecionados e inoculados não interferiram negativamente no desenvolvimento de culturas de *G. chacoensis*. Porém, uma possível promoção no desenvolvimento durante um ciclo antes da aclimatização, não foi detectado para a maioria dos parâmetros avaliados. Entretanto, o isolado Ba24 apresentou um incremento no número de raízes induzidas, na aplicação mais diluída do inóculo (10^{-8}). Esse isolado apresentou a maior produção de AIA. Este efeito foi observado no inóculo mais diluído, sugerindo que a ação da produção da auxina foi mais efetiva quando a população bacteriana era menor. O número menor de indivíduos, possivelmente, reduziu a competição por nutrientes no meio, favorecendo a observação do efeito positivo. Esse isolado identificado como *Brevibacillus parabrevis* é uma espécie pouca relatada na literatura. Entretanto, seu gênero é amplamente estudado e utilizado para diversas finalidades biotecnológicas, como por exemplo, a produção de enzimas, agente de controle biológico e na biodegradação (PANDA *et al.*, 2014). Contudo, essa bactéria também apresentou as maiores taxas de oxidação de colmos.

O isolado Ba03, identificado como *Serratia marcescens*, resultou em redução na altura de brotos e comprimento das raízes formadas, além de uma considerável taxa de oxidação de colmos. Semelhantemente, Shi *et al.* (2010) observaram a redução do alongamento de raízes primárias e estímulo às raízes secundárias em sementes de *Arabidopsis thaliana* inoculada com um isolado de *S. marcescens*. Os autores sugeriram relação deste fenômeno com metabólitos excretados por essa bactéria, o que pode explicar, também, a redução notada nas plantas inoculadas com o isolado, neste trabalho.

O isolado Ba16, identificado como *Bacillus subtilis*, é uma espécie reconhecida como promotora de crescimento em plantas. Beneduzi *et al.* (2008) verificaram incrementos na produção de brotos e raízes em plantas de *Oriza sativa* inoculadas com essa espécie bacteriana e cultivadas em casa de vegetação. Entretanto, no presente trabalho, o isolado, quando inoculado em culturas *in vitro* de *G. chacoensis*, não apresentou diferenças para os parâmetros morfológicos avaliados nas plantas, comparando-se ao tratamento controle. Apesar de não ter induzido o desenvolvimento das plantas, sua presença não inibiu o desenvolvimento vegetal. Embora a bactéria não tenha promovido crescimento diferencial, o uso deste em culturas *in vitro* de plantas evidencia a possibilidade de co-cultivo sob condições controladas, indicando também o potencial do isolado, na competição com outros microrganismos contaminantes no meio de cultura. Além disso, seus efeitos durante a aclimatização devem ser avaliados.

Para a continuidade desses estudos, serão aprofundados os trabalhos com cultivos *in vitro* e os efeitos do co-cultivo durante a fase de aclimatização, como a aplicação do *biopriming*. Esta técnica evita o vácuo biológico durante a fase de mudança do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*, reduzindo problemas com microrganismos patogênicos e preparando a planta, sob o efeito do *biopriming*, aos estresses na nova condição ambiental da planta.

6.5 CONCLUSÃO

O isolado Ba24 (*Brevibacillus parabrevis*) induziu o número de raízes, na maior diluição do inóculo.

O isolado Ba03 (*Serratia marcescens*) reduziu a altura e o comprimento de raízes.

O isolado Ba16 (*Bacillus subtilis*) não alterou os parâmetros avaliados.

Os efeitos da inoculação variaram com as espécies inoculadas, assim como, com a concentração dos inóculos testados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Recomenda-se que:

Trabalhos futuros avaliem a potencialidade desses isolados do ponto de vista da fisiologia do desenvolvimento, gerando subsídios para melhoria no protocolo de micropropagação, visando o uso e conservação do *G. chacoensis*, como também, a promoção da cadeia produtiva do bambu no Brasil.

Novos estudos devem ser realizados com os isolados em questão, em prol de avaliar: outros mecanismos promotores de crescimento; combinações com diferentes concentrações do meio de cultivo, para compatibilizar o crescimento das plantas com os isolados; e avaliar o potencial de mitigação destes nas contaminações das culturas *in vitro*.

REFERÊNCIAS

DE ALMEIDA, C. V. *et al.* (2009). Bacteriosomes in axenic plants: endophytes as stable endosymbionts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 10, p. 1757-1764.

ABNT. NBR 6023 – Informação e documentação – Referências - Elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2002, 24p.

AZEVEDO, João Lúcio *et al.* (2000). Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 15-16.

DEVI, K. A., PANDEY, P., SHARMA, G. D. (2016). Plant Growth-Promoting Endophyte *Serratia marcescens* AL2-16 Enhances the Growth of *Achyranthes*

aspera L., a Medicinal Plant. **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 23, n. 4, p. 173-180.

BENEDUZI, A. *et al.* (2008). Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 39, n. 3, p. 311-320.

BERNAL, A. *et al.* (20058). Priming and biopriming integrated into the sugarcane micropropagation technology by Temporary Immersion Bioreactors (TIBS). **Sugar Tech**, v. 10, n. 1, p. 42-47.

CHEN, Y. P. *et al.* (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Applied soil ecology**, v. 34, n. 1, p. 33-41.

COMPTON, M. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.37, p.217–242, 1994.

CRUZ-RÍOS, H. **Bambú–Guadua** (*Guadua angustifolia* Kunth): Bosques naturales en Colombia y plantaciones comerciales en México. Colômbia: Colmex. 691p. 2009.

DE MENDIBURU, F. (2017). Package „agricolae“. Statistical procedures for agricultural reserarch. R package version, v. 1, n. 1.

ENGELMANN, F. (2011). Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 47, n. 1, p. 5-16.

GUERRA, M.P.,TORRES, A.C., TEIXEIRA, J.B. Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas. 1999. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. (eds.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**, v. 2, Embrapa, Brasília, p.533-568. 1999.

- HALLMANN J., QUADT-HALLMANN A., MAHAFFEE W.F., KLOEPPER J.W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, 43:895-914.
- KHAN-LATIF , A. *et al.* (2016). Indole acetic acid and ACC deaminase from endophytic bacteria improves the growth of *Solanum lycopersicum*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 58-64.
- LEMOS, E. E. P. *et al.*, (2011). **Inovações Tecnológicas para a Propagação de Espécies de Bambu**. In: I Seminário Nacional do Bambu. **Anais....** 2. ed. Brasília: CPAB, Universidade de Brasília, 196p.
- MOREL, G.; WETMORE, R. H. (1951). Tissue culture of monocotyledons. **American Journal of Botany**, p. 138-140.
- MUDOI, K. M.; SIDDHARTHA, P. S.; ADRITA, G.; ANIMESH, G.; DEBASHISHA, B.; MINA, B., (2013). Micropropagation of important bamboos: a review, *African Journal of Biotechnology*, v. 12, p. 2770– 2785.
- NETO, M. C. L.; DE SANTANA R., J.; NETO, BEZERRA. (2009). Enraizamento de estacas de bambu com o uso de auxinas. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, v. 7, n. 2, p. 175-179, 2009.
- NOWAK, J.; PRUSKI, K. (2004). Priming tissue cultured propagules. **Low cost options for tissue culture technology in developing countries**, p. 69.
- ORNELLAS, T. S. *et al.* (2017). Micropropagação do bambu americano *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & PM Peterson.
- PANDA, A. K., *et al.* (2014). *Brevibacillus* as a biological tool: a short review. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 105, n. 4, p. 623-639.
- PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian journal of microbiology**, v. 42, n. 3, p. 207-220.

PEETERS, H. *et al.* (2001). Tissue culture strategies for genetic improvement of bamboo. In: **XX International Eucarpia Symposium, Section Ornamentals, Strategies for New Ornamentals-Part I 552**. p. 195-204.

RAMANAYAKE, S. M. S. D.; MEEMADUMA, V. N.; WEERAWARDENE, T. E. (2006). *In vitro* shoot proliferation and enhancement of rooting for the large-scale propagation of yellow bamboo (*Bambusa vulgaris* 'Striata'). **Scientia Horticulturae**, v. 110, n. 1, p. 109-113.

RAO, A. N., RAO, V. R., WILLIAMS, J. T. (1998). **Priority species of bamboo and rattan.**

SHI, Chun-Lin *et al.* (2010). Inhibition of primary roots and stimulation of lateral root development in *Arabidopsis thaliana* by the rhizobacterium *Serratia marcescens* 90–166 is through both auxin-dependent and-independent signaling pathways. **Molecules and cells**, v. 29, n. 3, p. 251-258.

SINGH, S.; KUMAR, P.; ANSARI, S. A. (2004). A simple method for large-scale propagation of *Dendrocalamus asper*. **Scientia horticulturae**, v. 100, n. 1-4, p. 251-255.

SELVAKUMAR, G. *et al.* (2008). Cold tolerance and plant growth promotion potential of *Serratia marcescens* strain SRM (MTCC 8708) isolated from flowers of summer squash (*Cucurbitapepo*). *Letters in applied microbiology*, v. 46, n. 2, p. 171-175.

TEAM, R. Core. (2018). R: A language and environment for statistical computing; 2015.

YU, J. *et al.* Isolation and characterization of indole acetic acid producing root endophytic bacteria and their potential for promoting crop growth. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 18, n. 5, p. 1381-1391, 2016.