



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO – UEMA
CENTRO DE ESTUDOS SUPERIORES DE BALSAS - CESBA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E AMBIENTE -
PPGAA**

ILDEANE SILVA DE OLIVEIRA

**EFEITOS DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO NO
DESENVOLVIMENTO *in vitro* DE *Stryphnodendron adstringens* (MART.)
COVILLE**

Balsas - MA
2023

ILDEANE SILVA DE OLIVEIRA

**EFEITOS DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO NO
DESENVOLVIMENTO *in vitro* DE *Stryphnodendron adstringens* (MART.)
COVILLE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente – PPGAA/CESBA/UEMA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agricultura e Ambiente.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Thais Roseli Corrêa

Balsas - MA
2023

ILDEANE SILVA DE OLIVEIRA

**EFEITOS DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO NO
DESENVOLVIMENTO *in vitro* DE *Stryphnodendron adstringens* (MART.)
COVILLE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente – PPGAA/CESBA/UEMA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agricultura e Ambiente.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Thais Roseli Corrêa

Aprovada em 01/03/2023

BANCA EXAMINADOR



Documento assinado digitalmente

THAIS ROSELI CORREA

Data: 08/08/2023 18:26:12-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Thais Roseli Corrêa
Universidade Estadual do Maranhão
(Orientadora)



Documento assinado digitalmente

DIEGO SILVA BATISTA

Data: 08/08/2023 19:13:52-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Diego Silva Batista
Universidade Federal da Paraíba



Documento assinado digitalmente

RITA DE CASSIA MENDONÇA DE MIRANDA

Data: 08/08/2023 05:38:11-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Mendonça de Miranda
Universidade Ceuma

RESUMO

O barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] planta pertencente à família Fabaceae, possui ampla distribuição geográfica no Brasil, possuindo grande importância econômica e medicinal. No entanto, as sementes da espécie apresentam dormência tegumentar, o que têm dificultado sua propagação natural. Como alternativa para a propagação da espécie, temos as técnicas da cultura de tecidos vegetais, que possibilitam a produção de mudas com alta qualidade genética. Todavia, as plântulas propagadas são isentas de sua microbiota natural. Desta forma, temos a possibilidade de reintrodução de microrganismos benéficos capazes de auxiliar no desenvolvimento das plântulas em condições *in vitro*. Dentre os microrganismos benéficos, têm-se as bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCPs), que promovem a produção de fitohormônios, aumento da resistência às condições de estresse biótico e abiótico e mudanças nas propriedades fisiológicas, entre outros benefícios. Assim, esse trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de BPCPs na promoção de crescimento de plântulas de *S. adstringens in vitro* como alternativa para a adição de reguladores de crescimento aos meios de cultura. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos: T1: MS $\frac{1}{2}$ (aplicações de água destilada esterilizada, T2: aplicações de MS $\frac{1}{2}$ + *Bacillus methylotrophicus*, T3: aplicações de MS $\frac{1}{2}$ + *Serratia marcescens*, T4: aplicações de MS $\frac{1}{2}$ + *Bacillus* + *Serratia* e T5: MS $\frac{1}{2}$ +21,48 μ M ANA - ácido naftalenoacético (aplicações de água destilada esterilizada) e mantidas em sala de crescimento em condições controladas de cultivo *in vitro*. Foram utilizadas sementes de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*), e após 15 dias de cultivo *in vitro*, foram realizadas aplicações de BPCPs às plântulas. As cepas utilizadas foram diluídas a 10^{-8} (*Bacillus methylotrophicus* e *Serratia marcescens*) e aplicadas duas vezes nas plântulas, aos 15 e 30 dias. Aos 45 dias de cultivo *in vitro* foram avaliadas número de folhas, área foliar (cm²), altura das plantas (cm), matéria fresca da raiz (g), matéria fresca da parte aérea (g), matéria seca da raiz (g), matéria seca da parte aérea (g), porcentagem de sobrevivência (%), relação raiz parte aérea, rendimento quântico máximo do fotossistema II, índice fotossintético e a densidade de centros de reação ativos do fotossistema II por unidade de fótons absorvidos (RC/ABS). As plântulas inoculadas com as BPCPs apresentaram incremento em altura, porção radicular, número de folhas, massa fresca das folhas e raízes e massa seca das folhas e raízes, índice fotossintético, densidade de centros de reação ativos do fotossistema II por unidade de fótons absorvidos, rendimento quântico máximo do fotossistema II e aumento na taxa de sobrevivência das plântulas na aclimatização *ex vitro*. Foi possível observar que a bactéria *Serratia* proporcionou efeitos positivos nos parâmetros de crescimento e desenvolvimento *in vitro* das plântulas de barbatimão, e aumentou a taxa de sobrevivência das plântulas no ambiente *ex vitro*. Desta forma, o uso da bactéria *Serratia marcescens* é um método viável para a produção de mudas de *Stryphnodendron adstringens*.

Palavras-chave: Barbatimão, propagação *in vitro*, crescimento vegetal, aclimatização *ex vitro*.

ABSTRACT

The barbatimon [*Stryphnodendron astringens* (Mart.) Coville], a plant belonging to the Fabaceae family, has a wide geographical distribution in Brazil. This species has great economic and medicinal importance. However, the seeds of the species present tegumentary dormancy, which has hindered its natural propagation. As an alternative for the propagation of the species we have the techniques of plant tissue culture that allow the production of seedlings with high genetic quality. However, the propagated seedlings are free of its natural microbiota. Thus, we have the possibility of reintroducing beneficial microorganisms capable of helping the development of the seedlings under *in vitro* conditions. Among the beneficial microorganisms are the plant growth promoting bacteria (BPCPs), which promote the production of phytohormones, increased resistance to biotic and abiotic stress conditions, and changes in physiological properties, among other benefits. Thus, this work aimed to evaluate the effects of BPCPs in promoting the growth of *S. astringens* seedlings *in vitro* as an alternative to the addition of growth regulators to culture media. The experiment was conducted in an entirely randomized design, with five treatments: T1: MS $\frac{1}{2}$ (applications of autoclaved distilled water), T2: applications of MS $\frac{1}{2}$ + *Bacillus*, T3: applications of, MS $\frac{1}{2}$ + *Serratia*, T4: applications of MS $\frac{1}{2}$ + *Bacillus* + *Serratia* and T5: MS $\frac{1}{2}$ +21.48 μ M ANA - naphthaleneacetic acid (applications of autoclaved distilled water) and maintained in growth room under controlled *in vitro* culture conditions. Barbatimon (*Stryphnodendron astringens*) seeds were used, and after 15 days of *in vitro* cultivation, applications of BPCPs were made to the seedlings. The strains used were diluted to 10^{-8} (*Bacillus methylotrophicus* and *Serratia marcescens*) and applied twice to the seedlings, at 15 and 30 days. At 45 days of *in vitro* cultivation, leaf number, leaf area (cm²), plant height (cm), root fresh matter (g), aboveground fresh matter (g), root dry matter (g), aboveground dry matter (g), survival percentage (%), root to aboveground ratio, maximum quantum yield of photosystem II, photosynthetic index and the density of photosystem II active reaction centers per unit of absorbed photons (RC/ABS) were evaluated. The seedlings inoculated with BPCPs showed an increase in height, root portion, number of leaves, fresh mass of leaves and roots and dry mass of leaves and roots, photosynthetic index, density of photosystem II active reaction centers per unit of absorbed photons, maximum quantum yield of photosystem II and increase in the survival rate of seedlings in the *ex vitro* acclimatization. It was possible to observe that *Serratia* bacteria provided positive effects on the *in vitro* growth and development parameters of barbatimão seedlings and increased the rate of s

Keywords: Barbatimon, *in vitro* propagation, plant growth, *ex vitro* acclimatization.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tornar tudo possível.

A minha mãe Iolete, a minhas irmãs Fatinha e Iarqueane por todo amor, carinho, e confiança em mim. Por acreditarem em meus sonhos e me apoiarem incondicionalmente.

Ao meu namorado Leonardo por todo amor, carinho e companheirismo.

A Universidade Estadual do Maranhão – UEMA e ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e ambiente, pela oportunidade de participar de curso que aprimorou meu conhecimento e me abriu portas para novas descobertas e crescimento pessoal e profissional.

A CAPES pela concessão de bolsa de estudos. A minha orientadora, Prof. Thais Roseli Corrêa, por seus ensinamentos. Um agradecimento especial ao meu coorientador, Marcos Vinícius Marques Pinheiro, que acreditou na minha proposta de juntar cultura de tecidos com microbiologia. A você, meu muito obrigado por acreditar em mim.

A professora Antônia Alice Costa Rodrigues, por ter disponibilizados parte dos produtos e espaço no laboratório para execução do trabalho e por seus conselhos e orientação.

A professora Rita de Cássia Mendonça de Miranda por ceder um de seus isolados bacterianos utilizados no projeto.

Ao professor Fábio pela disponibilização dos equipamentos e ao seu bolsista, Patrick por toda a ajuda durante execução dos experimentos.

A pós-doutoranda Jailma por me ensinarem a manusear alguns equipamentos empregados na execução do projeto.

As minhas grandes amigas Izabela Gomes e Erlen Keila, que estiveram ao meu lado nos bons e maus momentos durante o mestrado, por toda paciência, apoio, atenção e conselhos.

Ao meu grande amigo Léo da Fito por todo apoio e ajuda durante a execução do meu trabalho.

Ao seu Neto, dona Amélia, Lú e Jade por todos os momentos de descontrações.

Aos colegas de Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT-UEMA) Marion, Mariana, Darlyara, Maria Cristina, Givago e Sérgio e a todos pelo apoio, atenção e contribuições na execução do projeto. Meu muito obrigado pela convivência e pelas experiências trocadas.

Por fim, a todos o que contribuíram de forma direta ou indireta para que este trabalho pudesse ser realizado.

LISTA DE SIGLAS

AIA - Ácido indolacético

ANA - Ácido naftalenoacético

BPCPs - Bactérias promotoras de crescimento em plantas

DIC - Delineamento inteiramente casualizado

IF - Índice fotossintético

LED - Diodos Emissores de Luz

MS - Murashige e Skoog

pH - Potencial hidrogeniônico

NPK - Nitrogênio, fósforo e potássio

CESTE - Consórcio Estreito Energia

Fv/Fm - Rendimento quântico máximo do fotossistema II

PTFE – Politetrafluoroetileno

RC/ABS - Densidade de centros de reação ativos do fotossistema II

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1** Mapa de localização da coleta de sementes de *S. adstringens* no município de Estreito, Estado do Maranhão - Brasil, na área do Viveiro Florestal do Consórcio Estreito Energia (CESTE), no ano de 2021..... 27
- Fig. 2** Esquema experimental da propagação *in vitro* de *S. adstringens* sob aplicações de bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCPs). Germinação e estabelecimento *in vitro* de *S. adstringens* (a); Experimento com 15 dias de germinação *in vitro* com a 1^o inoculação das BPCPs (*B. methylotrophicus* e *S. marcescens*) (b); Experimento com 30 dias de germinação *in vitro* com a 2^o inoculação das BPCPs (*B. methylotrophicus* e *S. marcescens*) (c); Aclimatização das plantas de *S. adstringens* *ex vitro* (d) 29
- Fig. 3** Produção de ácido indolacético (AIA, $\mu\text{g mL}^{-1}$) das BPCPs (*Bacillus methylotrophicus* e *Serratia marcescens*) 33
- Fig. 4** Plântulas de *S. adstringens* aos 45 dias de cultivo *in vitro*. T1: MS $\frac{1}{2}$ (a-e), T2: MS $\frac{1}{2}$ + *Bacillus* (b-f), T3: MS $\frac{1}{2}$ + *Serratia* (c-g), T4: MS $\frac{1}{2}$ + *Bacillus*+ *Serratia* (d-h) e T5: MS $\frac{1}{2}$ + ANA (e-i). Barras = 1cm 34
- Fig. 5** Avaliação biométrica aos 45 dias de cultivo *in vitro* de *Stryphnodendron adstringens* em função dos tratamentos (MS $\frac{1}{2}$, MS $\frac{1}{2}$ + *Bacillus*, MS + *Serratia marcescens*, MS $\frac{1}{2}$ + *Bacillus* + *Serratia* e MS $\frac{1}{2}$ + ANA) no comprimento de parte aérea (a), comprimento de raiz (b), número de folhas (c) e área foliar (d). *Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. 35
- Fig. 6** Avaliação biométrica aos 45 dias de cultivo *in vitro* de *S. adstringens* em função dos tratamentos (MS $\frac{1}{2}$, MS $\frac{1}{2}$ + *Bacillus*, MS + *Serratia marcescens*, MS $\frac{1}{2}$ + *Bacillus* + *Serratia* e MS $\frac{1}{2}$ + ANA) na massa fresca da parte aérea (a), massa fresca da raiz (b), massa seca da parte aérea (c) e massa seca da raiz (d). *Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. 36
- Fig. 7** Avaliação fisiológica aos 45 dias de cultivo *in vitro* de *Stryphnodendron adstringens* em função dos tratamentos (MS $\frac{1}{2}$, MS $\frac{1}{2}$ + *Bacillus*, MS + *Serratia marcescens*, MS $\frac{1}{2}$ + *Bacillus* + *Serratia* e MS $\frac{1}{2}$ + ANA). *Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. 37
- Fig. 8.** Porcentagem de sobrevivência de plântulas de *S. adstringens* nos tratamentos (MS $\frac{1}{2}$, MS $\frac{1}{2}$ + *Bacillus*, MS $\frac{1}{2}$ + *Serratia marcescens*, MS $\frac{1}{2}$ + *Bacillus* + *Serratia* e MS $\frac{1}{2}$ + ANA) na aclimatização *ex vitro* 37

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	9
1. CAPÍTULO 1:.....	11
REVISÃO DE LITERATURA.....	11
1.1 <i>Stryphnodendron adstringens</i> (MART.) COVILLE	11
1.2 PROPAGAÇÃO <i>in vitro</i> DE ESPÉCIES ARBÓREAS.....	12
1.3 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM PLANTAS (BPCPs)	13
1.4 ACLIMATIZAÇÃO <i>ex vitro</i>	15
REFERÊNCIAS	17
2. CAPÍTULO 2: Bactérias promotoras de crescimento em plantas melhoram o crescimento e desenvolvimento <i>in vitro</i> de <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville	23
2.1 INTRODUÇÃO	25
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	26
2.2.1 Coleta do material vegetal	26
2.2.2 Germinação e estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>S. adstringens</i>	27
2.2.3 Preparo de inóculos bacterianos	28
2.2.4 Avaliação da síntese de ácidoindolacético (AIA)	30
2.2.5 Delineamento experimental e condições de cultivo.....	28
2.2.6 Aclimatização <i>ex vitro</i>	31
2.2.7 Variáveis analisadas	31
2.2.8 Análise estatística.....	32
2.3 RESULTADOS	32
2.3.1 Produção de ácido indolacético (AIA)	32
2.3.2 Inoculação de bactérias no crescimento e desenvolvimento de plantas propagadas <i>in vitro</i>	33
2.4 DISCUSSÃO	38
2.5 AGRADECIMENTOS	41
2.6 REFERÊNCIAS	42

INTRODUÇÃO

O barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] é uma planta pertencente à família Fabaceae e subfamília Mimosoidae, possui ampla distribuição no Brasil e ocorrência, no Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul, e é especialmente frequente nos biomas Cerrado e Floresta Amazônica (LIMA et al., 2022). Essa espécie possui grande importância econômica, e apresenta potencial medicinal, a qual demonstra ser um valioso recurso biológico. A madeira do barbatimão pode ser empregada na construção civil, e ainda, pode ser empregada para a recuperação de áreas degradadas e (LORENZI, 1992). Contudo, sua exploração ainda é desenvolvida por meio do extrativismo (MEIRA, 2012), e tem como principal produto a casca do seu caule, muito utilizada na medicina tradicional (PING et al., 2012).

As pesquisas científicas sobre a produção de mudas dessa espécie têm utilização limitada, devido à dormência tegumentar das sementes, o que têm dificultado sua propagação sexual, surgindo a necessidade de estudos voltados para a sua conservação, e produção de espécies arbóreas nativas do bioma Cerrado (MARCUSO; ARAUJO; GASPARIN, 2014). Portanto, as técnicas de cultura de tecidos vegetais podem contribuir diretamente na propagação de espécies florestais nativas do Brasil (OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013).

Dentre as técnicas da cultura de tecidos vegetais, destaca-se a propagação *in vitro*, que possibilita a produção de elevada taxa de mudas, em curto espaço de tempo e com alta qualidade genética (ALMEIDA et al., 2017). No entanto, na propagação *in vitro*, as plântulas propagadas são isentas de sua microbiota natural, o que as torna mais susceptíveis aos estresses ambientais e ataques de fitopatógenos (MARIANO et al., 2013), quando as mesmas são submetidas as condições *ex vitro*. Todavia, a possibilidade de reintrodução de microrganismos benéficos pode auxiliar no desenvolvimento e fisiologia das plantas em condições *in vitro*, e pode ainda proporcionar a proteção contra doenças, facilitando seu crescimento (CHAPARRO; BADRI; VIVANCO, 2014; TRINH et al., 2018; ANDRADE et al., 2023), tornando a técnica uma estratégia promissora na produção de plantas, desenvolvimento e aclimatização *ex vitro* (MARIANO et al., 2013; PACE et al., 2020; FERREIRA et al., 2021).

A introdução de microrganismos benéficos no cultivo *in vitro* de plantas tem sido uma realidade nos últimos anos, pois diversos pesquisadores têm buscado alternativas de inoculação destes, com o intuito de melhorar o crescimento e desenvolvimento das plantas (JUNIOR et al., 2020; PACE et al., 2020; LEITE et al., 2021; BELINCANTA et al., 2022), e ainda, contribuir em uma melhora na aclimatização, pois é uma etapa delicada, em que as plantas podem apresentar grande taxa de mortalidade. Dentre os microrganismos com elevado potencial para

melhorar o desempenho das plantas cultivadas *in vitro*, têm-se as bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCPs), que têm demonstrado benefícios em diferentes culturas, tais como a melhoria do sistema de defesa vegetal, aumento da resistência às condições de estresse biótico e abiótico, mudanças nas propriedades fisiológicas, e ainda, pode beneficiar a disponibilidade de água e nutrientes às plantas (AMBROSINI; PASSAGLIA, 2015; PEREIRA et al., 2019; SOUZA).

Algumas bactérias dos gêneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Serratia*, dentre outros (PAGNANI et al., 2018; SOUZA et al., 2019) conseguem fornecer hormônios vegetais (auxinas, giberelinas e citocininas), capazes de estimular o crescimento vegetal, com o aumento da altura, comprimento de parte aérea e radicular, peso seco da parte aérea e da raiz, entre outros (PICAZEVICZ et al., 2019; ZAREI et al., 2019; MACHADO et al., 2020).

Dentre as espécies de *Bacillus* temos as cepas de *Bacillus methylotrophicus* com grande potencial na promoção de crescimento, devido sua interação benéfica com as plantas, auxiliando o seu crescimento (MONNERAT et al., 2020) e produzindo bacteriocinas, substâncias com capacidade de agir no controle de doenças fitopatológicas (TUMBARSKI et al., 2016). Outra espécie de bactéria com potencial promotor de crescimento é a *Serratia marcescens*, com efeito positivo na produção de ACC desaminase, solubilização de fosfato, produção de sideróforo, produção de ácido indolacético, fixação de nitrogênio e produção de amônia (SING et al., 2016).

Diante do exposto, esse trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de BPCPs no crescimento de plântulas de *S. adstringens in vitro* como alternativa para à adição de reguladores químicos aos meios de cultura.

1. CAPÍTULO 1: REVISÃO DE LITERATURA

1.1 *Stryphnodendron adstringens* (MART.) COVILLE

O barbatimão, *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, tem como nome científico *Stryphnodendron barbadetiman* (Vell.) Mart. O gênero *Stryphnodendron* foi descrito pela primeira vez em 1837 por Von Martius (1837). O nome *Stryphnodendron* vem de *stryphnos* - (adstringente) e *dendron* - (árvore) e é uma referência às propriedades adstringentes e sua casca rica em taninos (LIMA et al., 2022).

A espécie recebe diversos nomes populares conforme a região em que ocorre, como barbatimão, barba-de-timão, borãozinho-roxo, casca-da-virgindade, casca-da-mocidade, faveiro, entre outros (LIMA et al., 2016), é encontrada em campo rupestre e cerrado (LIMA et al., 2022). O barbatimão é uma espécie arbórea e endêmica do Brasil, pertencente à família Fabaceae, tem vasta distribuição no Brasil, e principal ocorrência, no Norte (Tocantins), Nordeste (Bahia e Maranhão), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso), Sudeste (Minas Gerais, São Paulo) e Sul (Paraná). Ocorre em diversos tipos de vegetação, especialmente em biomas como Cerrado e Floresta Amazônica (LIMA et al., 2022).

Botanicamente, o barbatimão é considerado uma espécie perene que mantém as folhas durante todo o ano, com folhas bipinadas, e com presença de folíolos, pode ter altura de dois a oito metros, de tronco curto e tortuoso de 20 a 30 cm de diâmetro, coberto com casca rugosa com parte interna de coloração avermelhada (FELFILI et al., 1999; SOARES et al., 2008). O florescimento das árvores ocorre entre os meses de setembro a novembro, e o processo de frutificação ocorre nos meses de novembro a junho. A maturação dos frutos ocorre no final da estação seca, entre agosto e setembro e dá-se em formato de vagem com textura grossa, de aproximadamente 9 cm de comprimento, a obtenção das sementes é feita diretamente da árvore quando iniciam a queda espontânea (LORENZI; DE ABREU MATOS, 2002).

A espécie *Stryphnodendron adstringens* possui importância econômica e apresenta grande potencial medicinal, o que a torna um valioso recurso biológico. Contudo, sua exploração é desenvolvida por meio do extrativismo (MEIRA, 2012), onde são utilizadas na medicina tradicional, como matéria-prima, a casca do caule, pois apresenta uma variedade compostos como: alcaloides, terpenos, flavonoides e taninos, este último um dos componentes mais dominantes desta espécie (PING et al., 2012; SARTORI et al., 2018).

Na medicina tradicional, a infusão das cascas do caule do barbatimão é bastante empregada para diversas finalidades medicinais (SANTANA; VOEKS; FUNCH, 2016), e podem ser utilizadas para infecções fúngicas, diabetes, problemas de próstata, inflamação, gastrite, doenças do fígado, úlcera, corrimento, dor de barriga, tumores, adstringente, inflamação do útero e ovário (ALBUQUERQUE et al., 2007; SOUZA; FERNANDES; PASA, 2011; FERRÃO et al., 2014; LOPES, 2010; PEREIRA et al., 2019).

A espécie *Stryphnodendron adstringens* é indicada também para a recuperação de áreas degradadas, pois apresenta boa capacidade de adaptação, e alta taxa de sobrevivência em programas de revegetação (LINS et al., 2002; PARRON et al., 2000). Além disso, possui a capacidade de fixação biológica de nitrogênio, que pode proporcionar mecanismos de sucessão vegetal e renovação do solo, tornando-se uma alternativa sustentável na economia do uso de fertilizantes (RESENDE; KONDO, 2001). A madeira costuma ser utilizada na construção civil, na indústria para fabricação de tintas (GOULART et al., 2012) e para trabalhos de marcenaria, por ser considerada uma madeira resistente com cerne bem lignificado (LORENZI, 2016).

A propagação da espécie ocorre de maneira bastante irregular, em consequência da dormência tegumentar que as sementes possuem, dificultando sua propagação natural, além disso, as mudas a campo possuem o desenvolvimento lento, e sofrem ataques de pragas, este tipo de propagação geram plantas de baixa qualidade fitossanitárias (LORENZI, 1992). Dentre as estratégias de propagação da espécie, a cultura de tecidos vegetais, surge como uma ferramenta poderosa capaz de contribuir para a obtenção de plantas com alta qualidade fitossanitária desta espécie, e fornecer material vegetal para uso econômico e medicinal.

Apesar da vasta aplicação científica, existem poucos estudos recentes relatando o desenvolvimento de protocolos de propagação *in vitro* da espécie, os existentes enfatizam a germinação de sementes *in vitro* (FRANÇA et al., 1995; CASTRO et al., 2007), proliferação de brotos *in vitro* (PASQUAL e BARROS, 1992), indução de brotações (NICIOLI et al., 2008), calogênese e teores de fenóis e taninos totais (CASTRO et al., 2009), produção de fenóis totais e produção de biomassa em calos *in vitro* (PORTO et al., 2014) da espécie, aplicando as técnicas de culturas de tecidos.

1.2 PROPAGAÇÃO *in vitro* DE ESPÉCIES ARBÓREAS

Nos últimos anos, a cultura de tecidos vegetais em espécies florestais vem ganhado grande impulso, se mostrando uma alternativa promissora para a produção de mudas com alto padrão de qualidade (OLIVEIRA; DIAS; BRONDANI, 2013). A cultura de tecidos é utilizada

como uma ferramenta para propagar, conservar células, tecidos, e órgãos vegetais em condições assépticas e ambiente controlado (GUPTA et al., 2020). Dentre as técnicas de cultura de tecidos vegetais, destaca-se a propagação *in vitro*, técnica eficiente e viável para produção de plantas em larga escala, curto espaço de tempo e com alta qualidade fitossanitária (PACHECO; RODRIGUES, 2021; PEREIRA et al., 2021). Além disso, têm sido empregada para a propagação de espécies que apresentam difícil manejo, especialmente aquelas cujas sementes possuem elevado índice de dormência, dificultando sua propagação (WENDLING; FERREIRA; GROSSI, 2006).

No cultivo *in vitro* existem alguns fatores limitantes envolvidos, tais como: assepsia do material, escolha do genótipo ideal, fonte de explante, condições de cultivo, interferência de contaminantes, oxidação dos explantes (principalmente por compostos fenólicos), baixa multiplicação, baixo crescimento das plântulas, sensibilidade às trocas gasosas e acúmulo de etileno nos frascos de cultivo (FIGUEIREDO, 2019; RODRIGUES et al., 2012). De modo a melhorar o desempenho das culturas *in vitro*, nos últimos anos, diversos pesquisadores têm buscado alternativas de inoculação de microrganismos *in vitro* e *ex vitro*, para acelerar o crescimento e desenvolvimento das plantas (BURYGIN et al., 2019; PACE et al., 2020; CANTABELLA et al., 2021a; BELINCANTA et al., 2022).

1.3 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM PLANTAS (BPCPs)

Diversos pesquisadores têm buscado alternativas para melhorar a produção de mudas *in vitro* e *ex vitro*, para isso, algumas espécies de microrganismos estão sendo amplamente estudados com o objetivo de auxiliar o desempenho vegetal, e melhorar a nutrição das plantas, contribuindo como controle biológico de patógenos ou produção de fitohormônios que promovem o crescimento e desenvolvimento das plantas (PACE et al., 2020; FARIA et al., 2021; FERREIRA et al., 2021; LEITE et al., 2021; PACE et al., 2020; BELINCANTA et al., 2022). Dentre os fitohormônios produzidos por microrganismos, destaca-se o ácido indolacético (AIA), principal hormônio de crescimento vegetal, sendo que o fornecimento desses hormônios pelas BPCPs estimula o crescimento vegetal (WANI, KHAN E ZAIDI, 2008; BIANCO E DEFEZ, 2009).

Associadas a produção de AIA, as BPCPs apresentam-se como um grupo com alto potencial para crescimento vegetal, vários benefícios podem ser observados em plantas propagadas *in vitro* e *in vivo*, como aumento de área foliar, altura da planta, diâmetro do caule, número de folhas, redução do tempo de aclimatização, maior sobrevivência e crescimento das

mudas após o transplante (RODRIGUES et al., 2012). Alguns gêneros dessas BPCPs já são conhecidos por contribuírem para o crescimento vegetal, e estimular a produção do AIA, como cepas do gênero *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Serratia*, dentre outros ainda desconhecidos (PAGNANI et al., 2018; SOUZA et al., 2019).

As bactérias do gênero *Bacillus* são gram-positivas, aeróbicas e normalmente encontradas na raiz, empregadas na agricultura para promoção de crescimento e controle biológico em plantas (MONNERAT et al., 2020). A espécie *Bacillus methylotrophicus* destaca-se devido sua interação benéfica com as plantas, auxiliando o seu crescimento, ademais, produz bacteriocinas, com capacidade de agir no controle de doenças (TUMBARSKI et al., 2016).

Pérez-Flores et al. (2017), caracterizaram os efeitos de voláteis de *B. methylotrophicus* isolados de rizomas de milho (*Zea mays*) no desenvolvimento de raízes e partes aéreas e na homeostase de auxinas na cultura *Arabidopsis thaliana*, e constataram aumento no acúmulo de biomassa da parte aérea e radicular, além de induzir o surgimento de novas folhas e raízes laterais, sem comprometer o crescimento da raiz primária.

Outra espécie que auxilia no crescimento vegetal é a *Serratia marcescens*, bactéria em forma de bastonete, Gram-negativa, anaeróbica facultativa, presente na água, no solo e nas superfícies das plantas (GONZÁLEZ-JUARBE et al., 2015). Em experimento com inoculação de *S. marcescens* na cultura do trigo (*Triticum aestivum* L.) sob estresse salino, Sing et al., (2016), observaram que houve aumento no crescimento das plantas, minimização dos danos oxidativos, supressão de patógenos fúngicos e consequente aumento da resistência sistêmica induzida para lidar com as respostas bióticas ao estresse, além demonstrar efeito positivo para produção de ACC desaminase, solubilização de fosfato, produção de sideróforo, produção de ácido indolacético, fixação de nitrogênio e produção de amônia.

Diversos estudos buscam avaliar o crescimento de plantas na fase do cultivo *in vitro* sob a inoculação de bactérias promotoras de crescimento, como o trabalho realizado por Baldotto et al. (2010), que observaram melhoria no crescimento de abacaxizeiro cv. Vitória *in vitro*, e superior adaptação ao ambiente *ex vitro*. Almaghrabi et al. (2014) verificaram que as plântulas de sementes de milho (*Zea mays*) pré-tratadas com *Serratia marcescens* apresentaram melhores resultados de crescimento e desenvolvimento, como maior altura das plântulas e massa seca da parte aérea, aumento do teor de clorofila, maior comprimento e peso da raiz. Outro estudo com o bambuzeiro (*Bambusa oldhamii*) realizado por Belincanta et al. (2022), foi relatado que ao utilizar *Brevibacillus parabrevis* (isolado Ba24) houve estímulo no crescimento do sistema radicular induzindo maior número de raízes.

1.4 ACLIMATIZAÇÃO *ex vitro*

A aclimatização *ex vitro* é considerada a etapa mais crítica da propagação, visto que é neste processo as plantas sofrem o impacto da mudança do ambiente *in vitro* para o *ex vitro*, todavia, diversas alternativas têm sido estudadas para superar esse entrave, dentre essas, temos o uso de bactérias promotoras de crescimento.

Na etapa de aclimatização, as plantas são retiradas da condição estabelecida *in vitro* para o ambiente *ex vitro*, normalmente para condição de casa de vegetação, para ocorrer adaptação climática ao novo ambiente fornecido, essa etapa do transplântio é considerada importante da propagação *in vitro* (ROZALI; RASHID, 2015), pois, na maioria dos casos, há perdas no cultivo *in vitro* de muitas espécies (COUTO; ARAUJO, 2018).

A etapa de mudança do ambiente *in vitro* para o *ex vitro* é um passo importante na formação de plantas de qualidade, pois o material transita da condição fotomixotrófica para a autotrófica (XIAO et al., 2011; ROZALI; RASHID, 2015). No método de cultivo *in vitro* convencional, a sacarose é fornecida como fonte de carbono para o crescimento e desenvolvimento das plantas, pois a concentração de CO₂ nos frascos de cultivo diminui, o que limita a desenvolvimento das plantas (XIAO et al., 2011).

Além disso, devido às condições de cultivo, as plantas podem apresentar alterações anatômicas e metabólicas, e essas alterações podem impedir que a maquinaria fotossintética funcione normalmente no cultivo *in vitro* (XIAO e KOZAI, 2004; FUENTES et al., 2007). No método de cultivo fotomixotrófico *in vitro*, ocorre a diminuição do carboidrato no meio de cultivo, baseado no aumento das trocas gasosas entre os frascos de cultivo e o ambiente externo, o que estimula a capacidade fotossintética das plantas na condição *in vitro*, e desta forma produzir plântulas mais resistentes e com melhor adaptação e aumento da taxa de sobrevivência das plântulas às condições *ex vitro* (XIAO et al., 2011; BATISTA et al., 2017; WALTER, 2019).

No trabalho de Maciel et al. (2020), na aclimatização de amoreira preta (*Rubus* spp.) com rizogênese *in vitro* e *ex vitro* sob inoculação de microrganismos promotores do crescimento, observaram melhorias na eficiência fotossintética favorecidas pelas inoculações. Essa melhoria no aparato fotossintético pode ser explicada pelo aumento da absorção de nutrientes, maior exigência e captação de carbono em razão da colonização das raízes, e entre outros fatores (ZHU et al., 2012; TAIZ et al., 2017).

Outro fator importante no cultivo *in vitro* é a formação de raízes durante a condição *in vitro*, segundo Díaz-Pérez et al. (1995), as raízes formadas durante o cultivo *in vitro* podem ser

importantes na aclimatização de plantas micropropagadas, visto que influenciam no suprimento de água para a planta, e desenvolvem mecanismos para controlar a transpiração e condutância estomática. Além disso, ativam mecanismos para controlar a perda de água pela célula vegetal e aumentam a taxa de fotossíntese em ambiente rico em CO₂ (SUTTER, 1988; VANTELGEN et al., 1992). A perda de vigor e morte das plântulas são os principais desafios enfrentado durante a aclimatização (BANDEIRA et al., 2007).

O sucesso da aclimatização está ligado à capacidade da planta de passar da condição *in vitro* para *ex vitro*, na maioria das vezes dependente de fatores abióticos como: a umidade relativa, a temperatura, a radiação fotossintética ativa, a qualidade do substrato, e de fatores bióticos como: pragas e doenças; e da presença das raízes, bem como a capacidade das mudas de produzirem novas raízes (HAZARIKA, 2006). A etapa de enraizamento *in vitro* pode ser substituído pelo enraizamento *ex vitro* quando os explantes são inoculados com *Rhizoglosum clarum*, esta simbiose produz plantas com boa morfologia e boa sobrevivência (HAZARIKA, 2006).

No estudo de Dantas (2019), foram utilizadas mudas micropropagadas de bananeira (*Musa* spp.) inoculadas com *Bacillus* spp e mudas adubadas com adubo de liberação lenta NPK (Osmocote[®]), os dois tipos de mudas apresentaram resultados semelhantes, possibilitando o uso de bactérias promotoras de crescimento com uma alternativa na fase de aclimatização *ex vitro* de mudas micropropagadas. Em estudo semelhante, Baldotto et al. (2010), observaram que o abacaxizeiro cv. Vitoria inoculados com bactérias promotoras de crescimento *in vitro* melhorou o crescimento e adaptação das plântulas ao ambiente *ex vitro*, o que reduziu o período de aclimatização.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 1, p. 76–91. 2007.
- ALMAGHRABI, O. et al. Enhancement of Maize Growth Using Some Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) Under Laboratory Conditions. **Life Science Journal**, v. 11, p. 764–772. 2014.
- ALMEIDA, L. V. DA S. et al. As plantas medicinais e a micropropagação como ferramenta para sua expansão e utilização. **Textura**, v. 9, n. 16, p. 01–15, 15. 2017.
- BALDOTTO, L. E. B. et al. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 2, p. 349–360. 2010.
- BANDEIRA, F. S.; XAVIER, A.; OTONI, W. C.; LANI, E. R. G. Aclimação *ex vitro* de plantas propagadas pela enxertia *in vitro* de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*. **Revista Árvore**, v. 3, n. 5, p. 773 – 781. 2007.
- BATISTA, D. S. et al. Flask sealing on *in vitro* seed germination and morphogenesis of two types of ornamental pepper explants. **Ciência Rural**, v. 47, n. 3. 2017.
- BELINCANTA, C. et al. Characterization of the endophytic bacteria from *in vitro* cultures of *Dendrocalamus asper* and *Bambusa oldhamii* and assessment of their potential effects in *in vitro* co-cultivated plants of *Guadua chacoensis* (*Bambusoideae*, Poaceae). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 58, n. 1, p. 122–132, 15. 2022.
- BURYGIN, G. L. et al. *Ochrobactrum cytisi* IPA7.2 promotes growth of potato microplants and is resistant to abiotic stress. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 4, p. 55, 21. 2019.
- CANTABELLA, D. et al. Rhizosphere microorganisms enhance *in vitro* root and plantlet development of *Pyrus* and *Prunus* rootstocks. **Planta**, v. 253, n. 4, p. 78. 2021.
- CASTRO, A. H. F. et al. Calogênese e teores de fenóis e taninos totais em barbatimão [*stryphnodendron adstringens* (mart.) coville]. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 2, p. 385–390. 2009.
- CHAPARRO, J. M.; BADRI, D. V; VIVANCO, J. M. Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. **The ISME Journal**, v. 8, n. 4, p. 790–803, 7. 2014.
- COUTO, T. R. DO; ARAUJO, J. S. DE P. Aclimatização de mudas micropropagadas de genótipos de gérbera. **Revista Agraria Academica**, v. 1, n. 4, p. 52–63, 1. 2018.
- DANTAS, N. S. **Termografia para detecção de estresse térmico na aclimatização de mudas micropropagadas de bananeira, suplementadas com bactérias promotoras de crescimento em diferentes ambientes**. Monografia (Graduação) - Agronomia, Universidade Federal do Ceará, Ceará, p.102. 2019.

DIAS DE SOUZA, M, FERNANDES, R. R, PASA², M. C. **Estudo etnobotânico de plantas medicinais na comunidade são gonçalo beira rio, Cuiabá, MT** *Revista Biodiversidade* v. [s.l: s.n.].

DÍAZ-PÉREZ, J. C.; SHACKEL, K. A.; SUTTER, E. G. Effects of *In Vitro*-formed Roots and Acclimatization on Water Status and Gas Exchange of Tissue-cultured Apple Shoots. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 120, n. 3, p. 435–440, maio 1995.

FARIA, P. S. A. et al. Multifunctional potential of endophytic bacteria from *Anacardium othonianum* Rizzini in promoting *in vitro* and *ex vitro* plant growth. **Microbiological Research**, v. 242, p. 126600. 2021.

FELFILI, J. M. et al. Estudo fenológico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville no cerrado sensu stricto da Fazenda Água Limpa no Distrito Federal, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 1, p. 83–90. 1999.

FERREIRA, S. DA C. et al. Isolation and characterization of cassava root endophytic bacteria with the ability to promote plant growth and control the *in vitro* and *in vivo* growth of *Phytophthium* sp. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 116, p. 101709. 2021

FERRÃO, B. H. et al. Importância do conhecimento tradicional no uso de plantas medicinais em Buritis, MG, Brasil. **Ciência e Natura**, v. 36, n. 3, 31. 2014.

FIGUEIREDO, J. M. T. **Sistemas de propagação in vitro e análise de compostos da *Salicornia* spp. utilizando técnicas cromatográficas**. Dissertação—[s.l.] Universidade da beira interior. 2019.

FRANÇA, S. C. et al. Micropropagation of *Stryphnodendron polyphythum* (Barbatimão). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 42, n. 3, p. 291–293. 1995.

FUENTES, G. et al. Low exogenous sucrose improves *ex vitro* growth and photosynthesis in coconut *in vitro* plantlets if grown *in vitro* under high light. **Acta Horticulturae**, n. 748, p. 151–155. 2007.

GONZÁLEZ-JUARBE, N. et al. Requirement for *Serratia marcescens* Cytolysin in a Murine Model of Hemorrhagic Pneumonia. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 2, p. 614–624, fev. 2015.

GOULART, S. L. et al. Análises químicas e densidade básica da madeira de raiz, fuste e galho de barbatimão [(*Stryphnodendron adstringens*) Coville] de bioma cerrado. **Cerne**, v. 18, n. 1, p. 59–66. 2012.

GUPTA, N. et al. A Review on Micropropagation Culture Method. **Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development**, v. 8, n. 1, p. 86–93, 14. 2020.

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, v. 108, n. 2, p. 105–120. 2006.

JUNIOR PEREIRA SIMAS, L. C. et al. The plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville as a neutralizing source against some toxic activities of *Bothrops jararacussu* snake venom. **Toxicon**, v. 186, p. 182–190. 2020.

LEITE, M. S. et al. Acclimatization of *Pouteria gardeneriana* Radlk micropropagated plantlets: Role of *in vitro* rooting and plant growth-promoting bacteria. **Current Plant Biology**, v. 27, p. 100209. 2021.

LIMA, A. G. et al. New segregates from the Neotropical genus *Stryphnodendron* (Leguminosae, Caesalpinioideae, mimosoid clade). **PhytoKeys**, v. 205, p. 203–237, 22. 2022.

LIMA, T. C. D. DE et al. Breve revisão etnobotânica, fitoquímica e farmacologia de *Stryphnodendron adstringens* utilizada na Amazônia. **Revista Fitos**, v. 10, n. 3. 2016.

LINS, V. S.; ANTON, C. S.; MISSIO, R. F.; BALERONI, C. R. S.; SILVA, A. M.; CAMBUIM, J.; MORAES, M. L. T. Recomposição de *Stryphnodendron adstringens* e diversidade de espécies vegetais em área degradada, Selvíria, MS. In: **Simpósio Nacional Sobre Recuperação de Áreas Degradadas**, 5., 2002, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Recuperação de Áreas Degradadas, 2002. p. 108 - 110.

LOPES, C. V. G. **O conhecimento etnobotânico da comunidade quilombola do Varzeão, Dr. Ulysses (PR): no contexto do desenvolvimento rural sustentável**. Tese (Doutorado) – Produção Vegetal, Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, p. 30. 2010.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. v 1. 7ª ed. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, 2016. 384p.

LORENZI, H.; DE ABREU MATOS, F. J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. [s.l.] Instituto Plantarum de Estudos da Flora. 2002.

LORENZI, H. **Arvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. [s.l.] Editora Plantarum. 1992.

MACHADO, R, CALVI, V, PACCOLA, E, SCHMDIT FILHO, E, & GASPAROTTO, F. Inoculação foliar de plantas de milho com *Bacillus subtilis* e *Azospirillum brasilense*. **Enciclopédia Biosfera**, v. 17. n. 34. 2020b.

MACIEL, K. J. A. **Aclimatização de amoreira preta-preta cv tupy com rizogênese *in vitro* e *ex vitro* sob inoculação de microorganismos promotores do crescimento**. Dissertação (Mestrado) – Agronomia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, p.43. 2020.

MARCUZZO, S.; ARAUJO, M.; GASPARIN, E. Plantio de espécies nativas para restauração de áreas em unidades de conservação: um estudo de caso no sul do Brasil. **FLORESTA**, v. 45, p. 129. 2014.

MARIANO, R. DE L. R. et al. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v. 1, p. 89–111. 2013.

MEIRA, M. R. **Viabilidade técnica e econômica de planos de manejo sustentável para o barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* Mart. Coville) no norte de Minas Gerais.** Universidade Federal de Minas Gerais, p.12. 2012.

MONNERAT, R. et al. Manual de produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de bactérias do gênero *Bacillus* para uso na agricultura. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Documentos (INFOTECA-E)**. 2020. 46p. (Documentos, n. 369).

NICIOLI, P. M. et al. Ajuste do processo de micropropagação de barbatimão. **Ciência Rural**, v. 38, n. 3, p. 685–689. 2008.

OLIVEIRA, L. S. DE; DIAS, P. C.; BRONDANI, G. E. Micropropagação de espécies florestais brasileiras. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 33, n. 76, p. 439–453. 2013.

PACE, L. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria for *in vitro* and *ex vitro* performance enhancement of *Apennines' Genepi* (*Artemisia umbelliformis* subsp. *eriantha*), an endangered phytotherapeutic plant. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 56, n. 1, p. 134–142, 9. 2020.

PACHECO, L. B.; RODRIGUES, M. S. **Controle de bactérias visando à propagação *in vitro* de pimenteira-do-reino.** [s.l.] Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Campus Belém, PA, 2021.

PAGNANI, G. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in *Cannabis sativa* 'Finola' cultivation: An alternative fertilization strategy to improve plant growth and quality characteristics. **Industrial Crops and Products**, v. 123, p. 75–83. 2018.

PARRON, L. M.; RIBEIRO, J. F.; MARTINEZ, L. L. Revegetação de uma área degradada no córrego Sarandi. **Boletim do Herbário Ezequias Paulo Heringer**, Brasília, v. 5, p. 88-102, 2000.

PASQUAL, M., & DE BARROS, I. Efeitos do ácido naftaleno acético e 6-benzilaminopurina sobre a proliferação de brotos *In vitro* em barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 27(7), 1017–1019. 1992.

PEREIRA, C. D. et al. Germinação e propagação *in vitro* de mogno brasileiro (*Swietenia macrophylla* King). **Nativa**, v. 9, n. 5, p. 595–599, 28. 2021.

PEREIRA, M. M. A. et al. Humic Substances and Efficient Microorganisms: Elicitation of Medicinal Plants—A Review. **Journal of Agricultural Science**, v. 11, n. 7, p. 268, 31. 2019.

PÉREZ-FLORES, P. et al. *Bacillus methylotrophicus* M4-96 isolated from maize (*Zea mays*) rhizoplane increases growth and auxin content in *Arabidopsis thaliana* via emission of volatiles. **Protoplasma**, v. 254, n. 6, p. 2201–2213, 12. 2017.

PICAZEVICZ, A. A. C, KUSDRA, J. F, MORENO, A. DE L. Crescimento do milho em resposta à rizobactérias, molibdênio e nitrogênio. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 10, n. 4, p. 167–174. 2019.

PING, L. et al. Condensed tannins from grape pomace: Characterization by FTIR and MALDI TOF and production of environment friendly wood adhesive. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 13–20. 2012.

RESENDE, A. V, KONDO, M. K. **Leguminosas e recuperação de áreas degradadas**. Informe Agropecuário, v.22, p. 46-56. 2001.

PORTO, J. M. P. et al. Induction and determination of total phenols of callus of barbatimão. Australian. **Journal of Basic and Applied Sciences**, [S.l.], v. 8, n. 13, p. 709-713. 2014.

RODRIGUES, A. C. et al. Resposta da co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento em plantas e *Bradyrhizobium* sp. em caupi. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, p. 196–202, 30. 2012.

ROZALI, S.; RASHID, K. Evaluation of efficient method for acclimatization of an important ornamental rhizomatic plant, *Calathea crotalifera*. v. 44, p. 17–24. 2015.

SANTANA, B. F.; VOEKS, R. A.; FUNCH, L. S. Ethnomedicinal survey of a maroon community in Brazil's Atlantic tropical forest. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 181, p. 37–49. 2016.

SARTORI, C. et al. Tannin Extraction and Characterization of Polar Extracts from the Barks of Two *Eucalyptus urophylla* Hybrids. **Bioresources**, v. 13, p. 4820–4831. 2018.

SINGH, R. P.; JHA, P. N. The Multifarious PGPR *Serratia marcescens* CDP-13 Augments Induced Systemic Resistance and Enhanced Salinity Tolerance of Wheat (*Triticum aestivum* L.). **PLoS ONE**, v. 11, n. 6. 2016.

SOARES, S. P. et al. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcolico bruto de *Stryphnodendron adstringens* sobre microrganismos da cárie dental. **Revista Odonto Ciência**, v. 23, p. 141–144. 2008.

SOUZA, E. M. DE et al. Does the nitrogen application associated with *Azospirillum brasilense* inoculation influence corn nutrition and yield. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 23, n. 1, p. 53–59. 2019.

SOUZA, R. DE; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**, v. 38, n. 4, p. 401–419, 3. 2015.

SUTTER, E. Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry and sweetgum plants after removal from *in vitro* culture. **Journal of American Society for Horticultural Science**, Washington, v.113, n. 2, p. 234-238. 1988.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 888. 2017.

TRINH, C. S. et al. Evaluation of the plant growth-promoting activity of *Pseudomonas nitroreducens* in *Arabidopsis thaliana* and *Lactuca sativa*. **Plant Cell Reports**, v. 37, n. 6, p. 873–885, 14 jun. 2018.

TUMBARSKI, Y. et al. Biopreservation of Fresh Strawberries by Carboxymethyl Cellulose Edible Coatings Enriched with a Bacteriocin from *Bacillus methylotrophicus* BM47. **Food technology and biotechnology**, v. 57, n. 2, p. 230–237, 2019.

VANTELGEN, H.J.; VANMIL, A.; KUNNEMAN, B. Effect of propagation and rooting condition on acclimatization of micropropagated plants. **Acta Botanica Neerlandica**, Amsterdam, v. 41, n. 4, p. 453-459. 1992.

VON MARTIUS, C. F. P. **Herbarium florae Brasiliensis**. [s.l: s.n.].

WALTER, R. **Aplicação Da Cultura De Tecidos No Melhoramento De Capsicum Annuum: Superação De Barreiras Pós-Zigóticas, Produção De Genótipos Em Larga Escala E Protocolo Para Obtenção De Haplóides**. Tese (Doutorado) - Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Estadual Do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, p.42. 2019.

WANI, P. A.; KHAN, MD. S.; ZAIDI, A. Effect of Metal-Tolerant Plant Growth-Promoting *Rhizobium* on the Performance of Pea Grown in Metal-Amended Soil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 55, n. 1, p. 33–42, 1. 2008.

WENDLING, I.; FERREIRA, L.; GROSSI, D. F. **Produção de Mudas de Espécies Lenhosas**. 1. ed, p. 30-33. 2006.

XIAO, Y.; NIU, G.; KOZAI, T. Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 105, n. 2, p. 149–158, 23. 2011.

ZAREI, T, MORADI, A, KAZEMEINI, S. A, FARAJEE, H., & YADAVI, A. Improving sweet corn (*Zea mays* L. var *saccharata*) growth and yield using *Pseudomonas fluorescens* inoculation under varied watering regimes. **Agricultural Water Management**, 226. 2018.

ZHU, X. C.; SONG, F. B.; LIU, S. Q.; LIU, T. D.; ZHOU, X. Arbuscular mycorrhizae improves photosynthesis and water status of *Zea mays* L. under drought stress. **Plant, Soil and Environment**, v. 58, n. 4, p. 186-191. 2012.

2. CAPÍTULO 2

Bactérias promotoras de crescimento melhoram o crescimento *in vitro* e a sobrevivência na aclimatização *ex vitro* de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville

Growth-promoting bacteria enhance *in vitro* growth and *ex vitro* acclimatization survival of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville plants

Ildéane Silva de Oliveira ¹ (ildeane1212@gmail.com), Marcos Vinícius Marques Pinheiro ¹, Givago Lopes Alves ¹, Antônia Alice Costa Rodrigues ², Erlen Keila Candido e Silva ², Rita de Cássia Mendonça de Miranda ³, Thais Roseli Corrêa¹

¹Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente,
Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, Maranhão-Brasil

²Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente,
Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, Maranhão-Brasil

³Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente,
Universidade Ceuma, São Luís, Maranhão-Brasil

Resumo

As bactérias promotoras de crescimento em plantas é uma alternativa para auxiliar no desenvolvimento vegetal *in vitro* e garantir maior sobrevivência ao ambiente externo. Assim esse trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de BPCPs na promoção de crescimento de plântulas de barbatimão (*S. adstringens*) *in vitro* como alternativa para à adição de reguladores de crescimento aos meios de cultura. Para isso, foram utilizadas plântulas previamente germinadas e com 15 dias de cultivo *in vitro*, com aplicações de diluições de BPCPs a 10⁻⁸ (*Bacillus methylotrophicus* e *Serratia marcescens*) e aplicadas duas vezes, aos 15 e 30 dias. O experimento foi conduzido em delineamento casualizado, com cinco tratamentos, seis repetições e 30 unidades experimentais (T1: MS^{1/2} (aplicações de água destilada autoclavada), T2: aplicações de MS^{1/2} + *Bacillus methylotrophicus*, T3: aplicações de, MS^{1/2}+ *Serratia marcescens*, T4: aplicações de MS^{1/2} + *Bacillus* + *Serratia* e T5: MS^{1/2} +21,48 µM ANA - ácido naftalenoacético (aplicações de água destilada autoclavada) e mantidas em sala de crescimento em condições controladas de cultivo *in vitro*. Aos 45 dias de cultivo *in vitro* foram avaliados os parâmetros de crescimento e fisiológicos. Para avaliar a taxa de sobrevivência cinco plântulas de cada tratamento foram transplantadas para tubetes de polietileno de 10 cm de altura e diâmetro de 5 cm, preenchidos 250g de substrato comercial autoclavado Carolina Soil® e mantidos por 20 dias em casa de vegetação. A utilização da bactéria *Serratia marcescens* associada às plântulas de barbatimão, resultou em maior altura de planta, massa radicular, número de folhas, massa fresca e seca das folhas e raízes, índice fotossintético, densidade de centros de reação do fotossistema II, rendimento quântico máximo do fotossistema II, e maior taxa de sobrevivência das plântulas na aclimatização *ex vitro*. Portanto, a bactéria *Serratia*

marcescens beneficiou o crescimento e desenvolvimento das plântulas de barbatimão cultivadas *in vitro*.

Palavras-chave: Propagação *in vitro*, análises fisiológicas, índice fotossintético, aclimatização *ex vitro*.

Abstract

The growth promoting bacteria in plants is an alternative to help plant development *in vitro* and ensure greater survival to external environment. Thus, this work aimed to evaluate the effects of BPCPs on growth promotion of barbatimão (*S. astringens*) seedlings *in vitro* as an alternative to the addition of growth regulators to culture media. For this, seedlings previously germinated and with 15 days of *in vitro* culture were used, with applications of dilutions of BPCPs to 10^{-8} (*Bacillus methylotrophicus* and *Serratia marcescens*) and applied twice, at 15 and 30 days. The experiment was conducted in a randomized design with five treatments, six repetitions and 30 experimental units (T1: MS $\frac{1}{2}$ (applications of autoclaved distilled water), T2: applications of MS $\frac{1}{2}$ + *Bacillus methylotrophicus*, T3: applications of, MS $\frac{1}{2}$ + *Serratia marcescens*, T4: applications of MS $\frac{1}{2}$ + *Bacillus* + *Serratia* and T5: MS $\frac{1}{2}$ + 21.48 μ M ANA - naphthaleneacetic acid (autoclaved distilled water applications) and kept in a growth room under controlled *in vitro* culture conditions. At 45 days of *in vitro* cultivation, growth and physiological parameters were evaluated. To evaluate the survival rate five seedlings from each treatment were transplanted into polyethylene tubs of 10 cm height and 5 cm diameter, filled with 250g of commercial autoclaved Carolina Soil® substrate and kept for 20 days in the greenhouse. The use of *Serratia marcescens* bacteria associated with barbatimão seedlings resulted in greater plant height, root mass, number of leaves, fresh and dry mass of leaves and roots, photosynthetic index, density of photosystem II reaction centers, maximum quantum yield of photosystem II, and higher survival rate of seedlings in *ex vitro* acclimatization. Therefore, *Serratia marcescens* bacteria benefited the growth and development of barbatimon seedlings grown *in vitro*.

Keywords: *In vitro* propagation, physiological analysis, photosynthetic index, *ex vitro* acclimatization.

Introdução

O *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) é uma planta arbórea e nativa do cerrado brasileiro com ampla distribuição geográfica no Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sul (Lima et al., 2022). Tem se mostrado uma cultura com alto valor econômico de interesse mundial devido à sua ampla gama de propriedades medicinais, como antibacterianas, anti-inflamatória, antioxidante e cicatrizantes (Junior et al., 2020).

A propagação do *S. adstringens* é realizada de forma sexuada, e ocorre por meio de sementes, as quais apresentam irregularidades na germinação, devido à dormência tegumentar que limitam a produção de mudas. Deste modo, um dos métodos para produção de mudas é a propagação *in vitro* surge como uma estratégia para maximizar a taxa de germinação, e obtenção de plântulas com maior qualidade genética e fitossanitária adequadas (Silva, Vieira e Panobianco, 2014; Araújo et al., 2020). No entanto, as plântulas são isentas de sua microbiota natural, tornando-as mais suscetíveis aos estresses ambientais, como o ataques de fitopatógenos no ambiente externo (Mariano et al., 2013). Contudo, o sucesso da propagação *in vitro* depende de estratégias de aclimatização *ex vitro* eficazes, que garantam a sobrevivência das mudas durante a transferência das condições *in vitro* para *ex vitro*.

Como alternativas promissoras para o melhor desenvolvimenro de plantas, as bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs) têm sido relatadas com resultados positivos no crescimento dos explantes, e desenvolvimento vegetal *in vitro*, aumentando o crescimento vegetal, e garantindo melhor sobrevivência ao ambiente externo (Trinh et al., 2018), e ainda, podem auxiliar na produção de fitohormônios que contribuem para o crescimento da planta. Os benefícios conferidos ao desenvolvimento das culturas vegetais por estes microrganismos, estão relacionados a produção direta desses fitohormônios, como auxinas, bem como a solubilização e assimilação de nutrientes e indireta por meio da produção de metabólitos secundários (Dutta e Thahur, 2017; Khan et al., 2016; Oteino et al., 2015).

A produção direta de fitohormônios, como o ácido indolacético (AIA), uma auxina capaz promover o crescimento vegetal, atua estimulando o comprimento e o número de pelos radiculares para possibilitar a absorção radicular (Park et al., 2017). A solubilização e assimilação de nutrientes, relacionam-se aos principais nutrientes importantes para as plantas, como o fósforo, ocorre por meio da secreção de ácidos orgânicos, que dissolve o fósforo e o libera para a planta e por meio da síntese de enzimas fosfatases (Oteino et al., 2015; Brader et al., 2014; Behera et al., 2014).

Nos últimos anos, numerosos estudos têm empregado BPCPs para potencializar o crescimento e desenvolvimento vegetal de diferentes culturas, essas por sua vez, apresentam

potenciais efeitos de promoção de crescimento radicular e caulinar em plântulas *in vitro* como *Pyrus* e *Prunus* (Cantabella et al., 2021a), *Prunus avium* L. (Quambusch et al., 2014) e *Arabidopsis thaliana* (Asari et al., 2017). Dentre os principais gêneros bacteriano relatados com potencial promotor de crescimento, destacam-se *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Rhizobium*, *Serratia*, entre outros (Lyngwi et al., 2016; Rohini et al., 2018).

Entre as espécies de BPCPs com grande potencial temos *Bacillus methylotrophicus* e *Serratia marcescens*. *B. methylotrophicus* além de auxiliar o crescimento de plantas, produz bactericidas, substância com capacidade de agir no controle de doenças (Tumbariski et al., 2016). Enquanto *S. marcescens* possui efeito positivo na produção de ACC desaminase, solubilização de fosfato, produção de sideróforo, produção de ácido indolacético, como o AIA, fixação de nitrogênio e produção de amônia (Sing et al., 2016).

De forma geral, a produção de mudas micropropagadas aliada à inoculação pode constituir uma ferramenta biotecnológica de interesse para o cultivo de espécies medicinais, além de servir de modelo para estudos básicos relacionados ao crescimento e desenvolvimento *in vitro* de espécies vegetais,

Assim, o objetivo do estudo foi avaliar o uso das BPCPs (*Bacillus methylotrophicus* e *Serratia marcescens*) no crescimento e desenvolvimento de plântulas de *S. adstringens* propagadas *in vitro*, como alternativa para à adição de reguladores de crescimento aos meios de cultura.

Material e métodos

Coleta do material vegetal

As sementes de *S. adstringens* foram coletadas no município de Estreito, no Estado do Maranhão (MA), na área do Viveiro Florestal do Consórcio Estreito Energia (CESTE), no ano de 2021, localizado nas coordenadas geográficas, latitude -5,78333 e longitude -43,25, 5° 46' 60" Sul, 43° 15' 0" Oeste (Fig. 1), sendo mantidas em embalagens de papel, e então foram enviadas para o Laboratório de Cultura de Tecidos, da Universidade Estadual do Maranhão, localizado em São Luís.

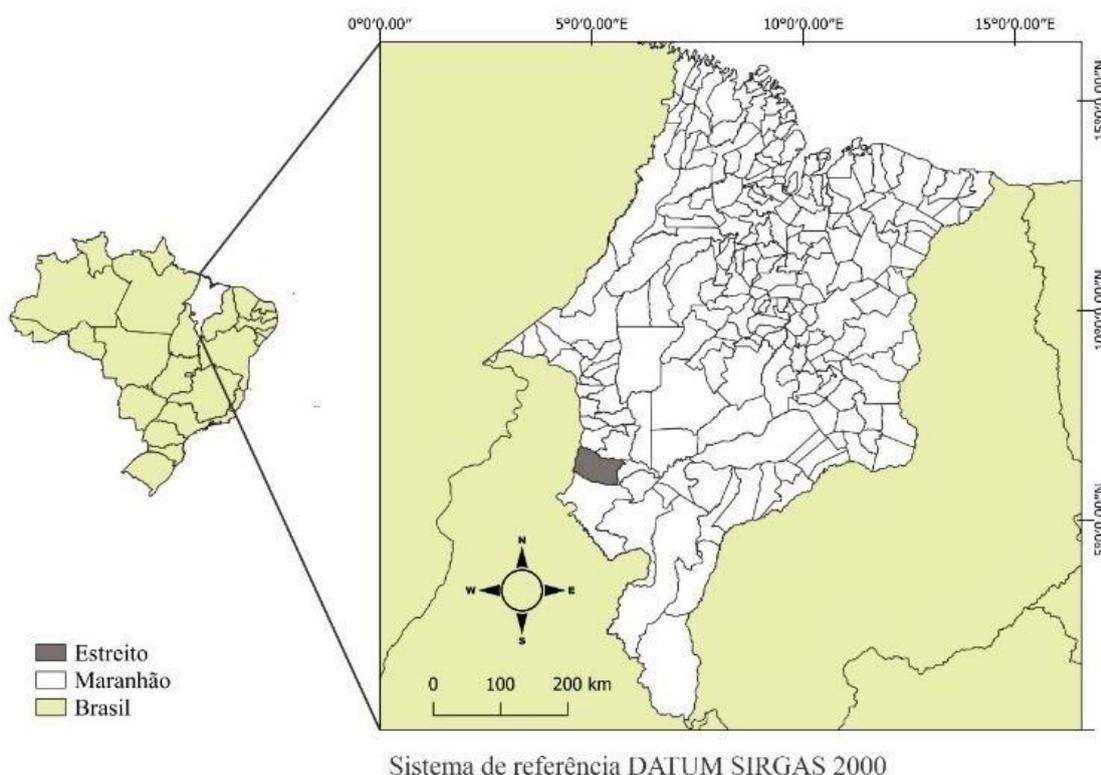


Fig. 1 Mapa de localização da coleta de sementes de *S. adstringens* no município de Estreito, Estado do Maranhão - Brasil, na área do Viveiro Florestal do Consórcio Estreito Energia (CESTE), no ano de 2021.

Germinação e estabelecimento *in vitro* de *S. adstringens*

O estudo foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Estadual do Maranhão (LCT/UEMA), localizado em São Luís (MA). As sementes foram previamente germinadas e estabelecidas *in vitro*, e com auxílio de alicate, foi realizado um pequeno corte no tegumento das sementes de *S. adstringens* ao lado oposto do hilo, para acelerar o processo germinativo (Soares et al., 2022).

Em câmara de fluxo laminar, as sementes foram desinfestadas, e permaneceram por 1 min em álcool 70% (v/v), seguida a uma imersão em solução de hipoclorito de sódio comercial (YPE[®] Ltda, Química Amparo Ltda, Passos, Minas Gerais, Brasil) a 2,5% de cloro ativo, com adição de duas gotas de Tween (Isifar[®] Ltda, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil) a cada 100 mL, mantidos sob agitação por 15 minutos, seguido de três lavagens em água destilada autoclavada por três minutos, cada. Após este procedimento, as sementes foram inoculadas em tubos de ensaio de vidro (25x150mm) contendo 10 mL de metade dos macro e micronutrientes de meio MS (Murashige e Skoog, 1962) (Sigma-Aldrich[®] Ltda, St.

Louis, Missouri, USA), suplementado com 15 g L⁻¹ de sacarose (Isofar[®]), 100 mgL⁻¹ de mio-inositol (Sigma-Aldrich[®]), solidificado com 3,25 g L⁻¹ de ágar (Agargel[®] Ltda, São Paulo, SP, Brasil), pH ajustado para 5,7 ± 0,1 e previamente autoclavados a 121 °C e 108 kPa por 15 minutos (Soares et al., 2022).

Os tubos foram mantidos durante 15 dias em sala de crescimento com condições controladas de temperatura a 25 ± 2°C, nos primeiros 7 dias mantidas no escuro, e após esse período as sementes foram mantidas em fotoperíodo de 16 horas e irradiância de luminosa 40 μmol m⁻²s⁻¹ provenientes de duas lâmpadas de diodos emissores de luz (LED tubular T8 Led, 10w, Avant, Brasil).

Preparo de inóculos bacterianos

Foram utilizadas bactérias promotoras de crescimento *Bacillus methylotrophicus*, cedidas da coleção da Micoteca pelo Professor Dr. Gilson Soares da Silva, da UEMA, e bactéria *Serratia marcescens*, cedida pelo Laboratório de Microbiologia (LACAM) da Universidade Ceuma (UNICEUMA). As culturas bacterianas foram cultivadas em placas de Petri (90x15 mm) (Firstlab, São José dos Pinhais – PR) descartáveis com 20 mL de meio de cultura TSA (10%) - Tryptic Soy Agar (Sigma-Aldrich[®]) e mantidas em incubadora BOD (Demanda Bioquímica do Oxigênio- SPlabor, São Paulo, SP, Brasil), a 30°C por 24 h. Após ensaios prévios com as espécies em estudo, nós adotamos culturas bacterianas com a diluição 10⁻⁸ em solução salina (0,85%).

Delineamento experimental e condições de cultivo

Aos 15 dias de germinação *in vitro* as plântulas com cerca de 2 cm foram transferidas para frascos de vidro transparentes com capacidade de 350 mL, contendo 70 mL de meio de cultura líquido MS (½), com metade dos macro e micronutrientes, suplementado com 15 gL⁻¹ de sacarose (Isofar[®]), 100 mgL⁻¹ de mio-inositol (Sigma-Aldrich[®]) (Fig. 2b), foi utilizado como agente de suporte a vermiculita 70:100 (v/v) (Cantabella et al., 2021b). Os frascos foram vedados com tampas transparentes de polipropileno, com dois orifícios de 10 mm de diâmetro cada, os quais foram cobertos por uma membrana composta por duas camadas de fita microporosa (Missner[®] Ltda, Blumenau, Santa Catarina, Brasil) e um PTFE (politetrafluoroetileno) (Poly[®] Ltda, São Paulo, São Paulo, Brasil) de 0,05 ± 0,01 mm de espessura (Saldanha et al., 2012) e vedados com papel filme PVC (AlpaFilm[®] Ltda, São Paulo, São Paulo, Brasil).

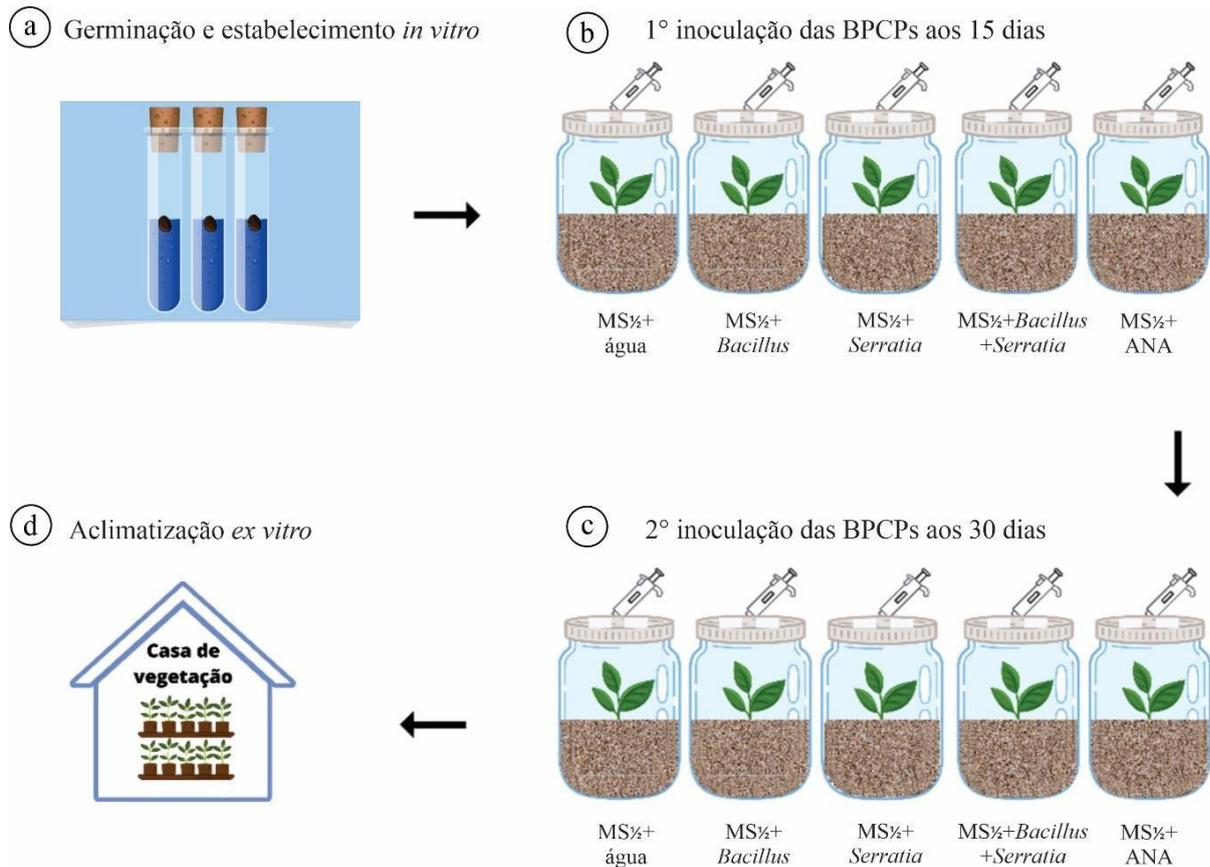


Fig. 2 Esquema experimental da propagação *in vitro* de *S. adstringens* sob aplicações de bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCPs). Germinação e estabelecimento *in vitro* de *S. adstringens* (a); Experimento com 15 dias de germinação *in vitro* com a 1º inoculação das BPCPs (*B. methylotrophicus* e *S. marcescens*) (b); Experimento com 30 dias de germinação *in vitro* com a 2º inoculação das BPCPs (*B. methylotrophicus* e *S. marcescens*) (c); Aclimatização das plantas de *S. adstringens* *ex vitro* (d).

Após 15 dias nestas condições, foram realizadas aplicações, com auxílio de pipeta automática, 50 μL da diluição de BPCPs (10^{-8}) na parte basal e 50 μL na região do sistema radicular das plântulas aos 15 e 30 dias de cultivo (Tabela 1, Figura 2b, 2c). A inoculação seguiu a metodologia adaptada de Belincanta et al. (2022). A fim de comparação com os tratamentos com BPCPs, foram utilizados dois controles, o MS½, no qual houve aplicações de 50 μL de água destilada autoclavada na parte basal, e 50 μL na região do sistema radicular das plântulas (aos 15 e 30 dias de cultivo, o mesmo realizado para o controle MS½ ANA, no qual foram aplicados 21,48 μM de ácido naftalenoacético (ANA) divididos em duas aplicações nas mesmas regiões das plântulas (aos 15 e 30 dias) (Tabela 1, Fig. 2b, 2c). Para a concentração de ANA, seguiu-se a metodologia de (Nicioli et al., 2008). Assim, a primeira inoculação foi realizada aos

15 dias (Fig. 2b), e a segunda aplicação foi realizada aos 30 dias de cultivo *in vitro* (Fig. 2c) ambas seguindo a mesma metodologia relatada anteriormente.

Tabela 1. Tratamentos para promoção do crescimento de plântulas de *S. adstringens in vitro*.

Cod.	Tratamentos
MS^{1/2}	Duas aplicações (15 e 30 dias de cultivo) de água destilada autoclavada (100 µL, controle)
MS^{1/2}+ <i>Bacillus</i>	Duas aplicações (15 e 30 dias de cultivo) de <i>Bacillus methylotrophicus</i> 100 µL da diluição de 10 ⁻⁸
MS^{1/2}+ <i>Serratia</i>	Duas aplicações (15 e 30 dias de cultivo) de <i>Serratia marcescens</i> 100 µL da diluição de 10 ⁻⁸
MS^{1/2} + <i>Bacillus</i> + <i>Serratia</i>	Duas aplicações (15 e 30 dias de cultivo) de <i>Bacillus methylotrophicus</i> + <i>Serratia marcescens</i> (50 µL da diluição de 10 ⁻⁸ , de cada bactéria)
MS^{1/2} + ANA	Duas aplicações (15 e 30 dias de cultivo) de 21,48 µM de ácido naftalenoacético (ANA, 100 µL, controle)

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com seis tratamentos, sendo: MS^{1/2}, MS^{1/2}+ *Bacillus*, MS^{1/2}+ *Serratia*, MS^{1/2} + *Bacillus* + *Serratia* e MS^{1/2} + ANA (Tabela1), com seis repetições cada, e a unidade experimental composta por uma planta por frasco de cultivo.

Os frascos foram mantidos em sala de crescimento por 45 dias, com condições controladas de temperatura a 25 ± 2°C e fotoperíodo de 16 horas e irradiância luminosa de 40 µmol m⁻²s⁻¹ provenientes de duas lâmpadas LEDs de cor branca.

Avaliação da síntese de ácido indolacético (AIA)

A síntese de AIA foi avaliada pelo método colorimétrico descrito por Gordon e Weber (1951) com modificações. Em câmara de fluxo laminar, os isolados bacterianos foram incubados tubos de ensaio de vidro (25 x 150mm) contendo 10 mL de meio de cultura TSA (10%) enriquecido com triptofano (Sigma-Aldrich®), por 48 h a 28 °C sob agitação constante de 175 rpm, em agitador rotativo (Laborglas, LGI-SK- O330, São Paulo, SP). Após esse período, as culturas foram transferidas para novos tubos de ensaios centrifugados por 10 minutos a velocidade de 10.000 rpm.

Em triplicata, na proporção de 2:1 (v/v) do sobrenadante de cada isolado, foram transferidas para tubos de ensaio e adicionados a solução Salkowski (0,45% FeCl₃ (p/v) em 10,2 M H₂SO₄ (Sigma-Aldrich®) e mantidas no escuro por 30 minutos à temperatura ambiente (25 ± 2°C). Qualitativamente, a produção de AIA foi verificada pela intensidade colorimétrica da mistura (coloração rosa – produção positiva de AIA).

Para a quantificação de AIA, realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro digital (Biospectro, SP220, São Paulo), no comprimento de onda de 540 nm. A concentração dos compostos indólicos verificou-se pela curva padrão estimada de AIA, previamente obtida, com valores conhecidos, seguindo metodologia de Radwan, Mohamed e Reis (2005). Para ajuste da curva, realizou-se alterações nas concentrações de AIA sintético (Sigma-Aldrich®) na construção da curva, aumentando o número de pontos em um intervalo menor de valores, com as concentrações: 10; 20; 40; 80; 100 µg mL⁻¹ de AIA.

Aclimatização *ex vitro*

Ao final dos 45 dias de cultivo *in vitro*, cinco plântulas de cada tratamento foram aclimatizadas em casa de vegetação (Fig. 2d). As plântulas provenientes dos diferentes tratamentos foram retiradas dos frascos, e lavadas em água corrente para a remoção dos resíduos de meio de cultura e transplantadas para tubetes de polietileno de 10 cm de altura e diâmetro de 5 cm, preenchidos 250g de substrato comercial autoclavado Carolina Soil® Ltda (Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil), contendo turfa, vermiculita, calcário, gesso agrícola e fertilizante NPK.

Em condições de casa de vegetação e temperatura ambiente, as plântulas foram submetidas ao sistema de irrigação por microaspersão, acionado a cada 4 horas com duração de 5 minutos, das 6:00 às 18:00 horas. Aos 20 dias de aclimatização *ex vitro*, foi avaliada a taxa de sobrevivência das plântulas.

Variáveis analisadas

Aos 45 dias de cultivo *in vitro*, foram avaliadas área foliar (cm²), comprimento das plantas (cm), medida pela distância compreendida entre o colo da planta e o ápice foliar, número de folhas, comprimento da parte aérea (cm), comprimento da raiz (cm), massa fresca da parte aérea (mg), massa fresca da raiz (g), massa seca da raiz (g), massa seca da parte aérea (g), massa seca total (g), rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m), o índice fotossintético (IF), e densidade de centros de reação ativos do fotossistema II (RC/ABS).

Para a obtenção da área foliar (cm^2), foi utilizado o *software* Image J[®] e para a obtenção da massa foliar específica (mg cm^{-2}), foi utilizada a razão entre a massa seca da parte aérea e a área foliar. Para as variáveis de massa seca, o material vegetal permaneceu em estufa de circulação forçada de ar à 70 °C por 48 horas. Posteriormente, o material foi pesado em balança de precisão para obtenção dos valores de massa seca da parte aérea (g) e massa seca da raiz (g) (Couto and Araujo, 2018).

Análises fotossintéticas

Para obtenção da eficiência fotoquímica foram avaliados rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m), índice fotossintético (IF) e densidade de centros de reação ativos do fotossistema II por unidade de fótons absorvidos (RC/ABS). As variáveis foram determinadas na folha mais expandida, em que foi utilizado o fluorômetro não-modulado modelo Pocket PEA (*Plant Efficiency Analyser, Hansatech, UK*). Antes das avaliações da emissão da fluorescência da clorofila *a*, foi posicionada uma pinça nas folhas para a adaptação ao escuro por 30 minutos. Essa adaptação foi realizada para que os centros de reações estivessem completamente abertos com uma perda mínima de calor. Procedido à adaptação, um pulso de luz saturante de $3500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi aplicado por meio de três diodos emissores de luz de comprimento de onda de 650 nm (Gonçalves et al., 2010)

Análises estatísticas

As variáveis coletadas foram analisadas quanto a normalidade pelo teste Shapiro - Wilk e as médias dos tratamentos foram submetidas a análise de variância e a média comparada utilizando o teste de Skott-Knott ($P \pm 0,05$), utilizando o programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2011).

Resultados

Produção de ácido indolacético (AIA)

Após a avaliação da síntese de AIA pelo método colorimétrico, as duas cepas de BPCPs demonstraram conseguir produzir AIA no meio de cultivo TSA (10%), quando avaliadas pelo método de espectrofotômetro baseado no reagente de Salkowski, e apresentaram variação na concentração de $175,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *B. methylotrophicus* e $118,81 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *S. marcescens* (Fig. 3b).

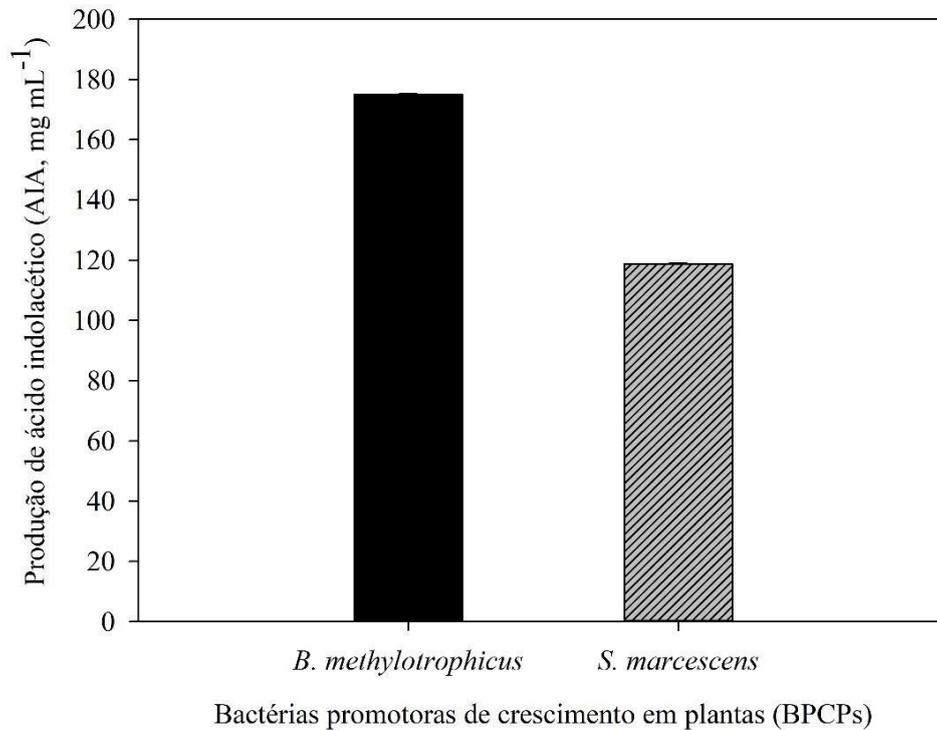


Fig. 3 Produção de ácido indolacético (AIA, $\mu\text{g mL}^{-1}$) das BPCPs (*Bacillus methylotrophicus* e *Serratia marcescens*).

Inoculação de bactérias no crescimento e desenvolvimento de plantas propagadas *in vitro*

Todas plantas mantidas nos tratamentos enraizaram aos 45 dias de cultivo *in vitro*, mesmo em meio de cultura sem a adição de reguladores de crescimento. As plântulas cultivadas em meio de cultura com a inoculação de BPCPs ($\text{MS}^{1/2} + \textit{Bacillus}$, $\text{MS}^{1/2} + \textit{Serratia}$ e $\text{MS}^{1/2} + \textit{Bacillus} + \textit{Serratia}$), ou sem inoculação das BPCPs ($\text{MS}^{1/2}$ e $\text{MS}^{1/2} + \text{ANA}$) tiveram crescimento e desenvolvimento adequados (Tabela 1). As variáveis comprimento da parte aérea, comprimento de raiz, área foliar e número de folhas apresentaram diferenças significativas ($P \leq 0,05$). Para as plântulas cultivadas com a inoculação de BPCPs ($\text{MS}^{1/2} + \textit{Bacillus}$ e $\text{MS}^{1/2} + \textit{Serratia}$) apresentaram maior comprimento de parte aérea com (6,50 e 7,21 cm, respectivamente) (Fig. 4f; 4g; Fig. 5a).

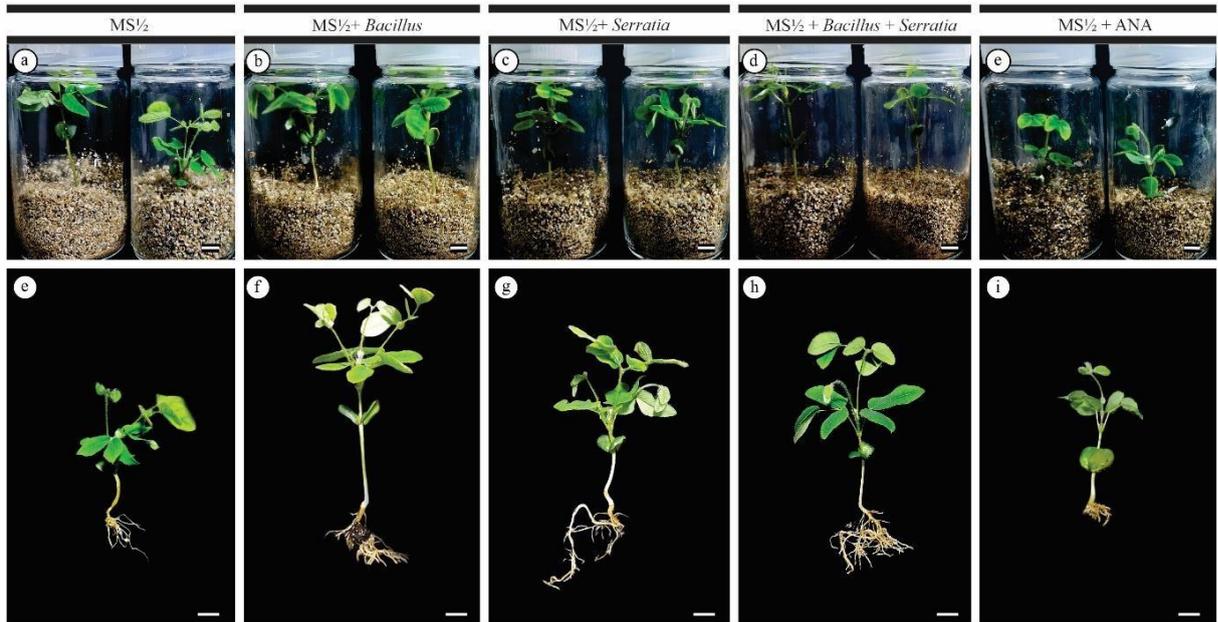


Fig. 4 Plântulas de *S. adstringens* aos 45 dias de cultivo *in vitro*. T1: MS^{1/2} (a-e), T2: MS^{1/2} + *Bacillus* (b-f), T3: MS^{1/2} + *Serratia* (c-g), T4: MS^{1/2} + *Bacillus* + *Serratia* (d-h) e T5: MS^{1/2} + ANA (e-i). Barras = 1cm

O comprimento da raiz apresentou maior incremento com a inoculação das bactérias (MS^{1/2} + *Bacillus*, MS^{1/2} + *Serratia* e MS^{1/2} + *Bacillus* + *Serratia*) (7,28; 6,01; 6,86 cm, respectivamente) (Fig. 4f; 4g, Fig. 5b). Entretanto, as plântulas que não receberam os inóculos MS^{1/2}; MS^{1/2} + *Bacillus*; MS^{1/2} + *Serratia* e MS^{1/2} + *Bacillus* + *Serratia* apresentaram maior número de folhas (6,50; 6,66; 5,0 e 6,16 cm, respectivamente) (Fig. 4e, f, g, h; Fig. 5c). Enquanto, as plântulas submetidas ao tratamento MS^{1/2} + *Bacillus* apresentaram maior área foliar (35 cm²) (Fig. 5d).

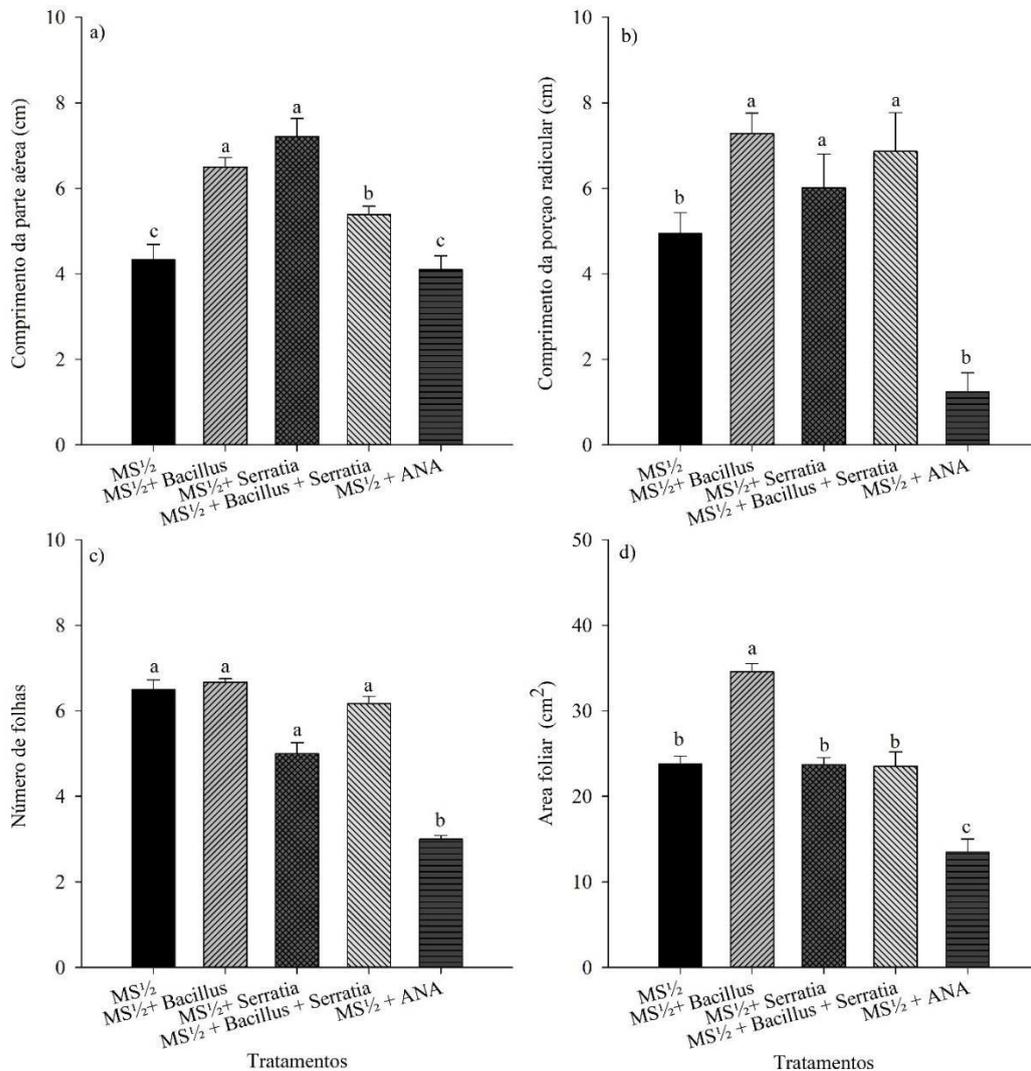


Fig. 5 Avaliação biométrica aos 45 dias de cultivo *in vitro* de *Stryphnodendron adstringens* em função dos tratamentos (MS^{1/2}, MS^{1/2} + *Bacillus*, MS + *Serratia marcescens*, MS^{1/2} + *Bacillus* + *Serratia* e MS^{1/2} + ANA) no comprimento de parte aérea (a), comprimento da raiz (b), número de folhas (c) e área foliar (d). *Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

As variáveis de massa fresca da parte aérea/raiz e massa seca da parte aérea/raiz apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) (Fig. 6). As plântulas mantidas no tratamento MS^{1/2} + *Bacillus*, apresentaram maior quantidade de massa fresca da parte aérea (0,39 g) (Fig. 6a). Para massa fresca da raiz foram afetadas positivamente pela inoculação das bactérias dos tratamentos MS^{1/2} + *Bacillus* e MS^{1/2} + *Serratia* (0,73 e 0,75 g, respectivamente) (Fig. 6b).

Para a variável massa seca da parte aérea as plântulas apresentaram melhor desempenho inoculadas com MS^{1/2} + *Bacillus* e MS^{1/2} + *Serratia* (0,11 e 0,10 g, respectivamente) (Fig. 6c).

Enquanto, as plântulas inoculadas com $MS\frac{1}{2}$ + *Bacillus* apresentaram maior peso de massa seca da raiz (0,46 g) (Fig. 6d) diferindo estatisticamente dos demais tratamentos.

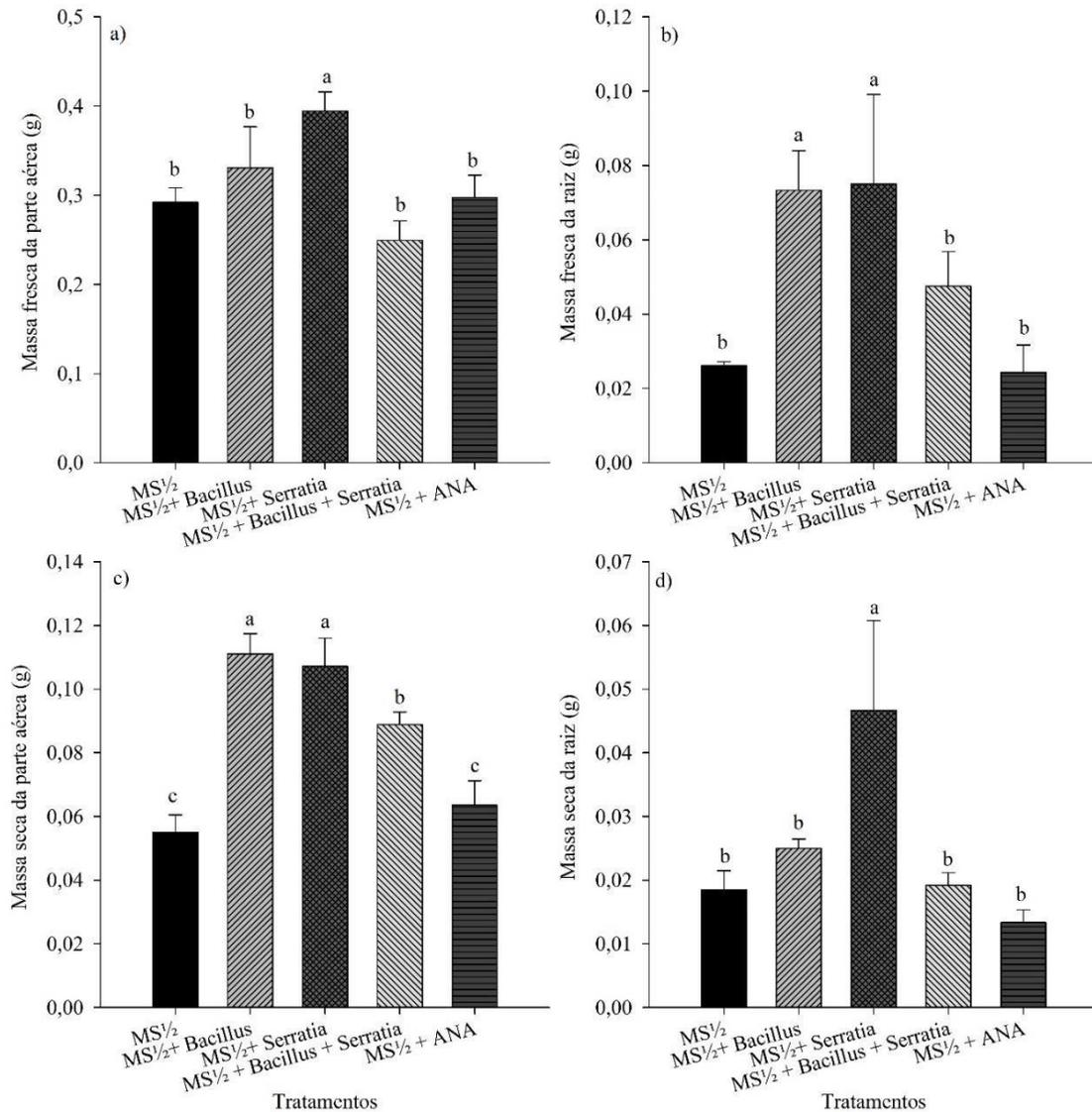


Fig. 6 Avaliação biométrica aos 45 dias de cultivo *in vitro* de *S. adstringens* em função dos tratamentos ($MS\frac{1}{2}$, $MS\frac{1}{2}$ + *Bacillus*, $MS\frac{1}{2}$ + *Serratia marcescens*, $MS\frac{1}{2}$ + *Bacillus* + *Serratia* e $MS\frac{1}{2}$ + ANA) na massa fresca da parte aérea (a), massa fresca da raiz (b), massa seca da parte aérea (c) e massa seca da raiz (d). *Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

As variáveis Fv/Fm, PI, RC/ABS apresentaram diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os tratamentos com e sem adição das bactérias, as plântulas que receberam as inoculações com as bactérias de forma isolada ou em combinação. Para a relação Fv/Fm foram obtidos valores na faixa ideal em plântulas inoculadas com $MS\frac{1}{2}$ + *Bacillus*, $MS\frac{1}{2}$ + *Serratia* e $MS\frac{1}{2}$ + *Bacillus*

+ *Serratia* (0,78, 0,85 e 0,77, respectivamente) (Fig.7a). O índice fotossintético foi maior nas plântulas inoculadas com $MS^{1/2}$ + *Serratia* e $MS^{1/2}$ + ANA (Fig. 7b). Quanto a RC/ABS as plântulas com uso de BPCPs $MS^{1/2}$ + *Bacillus*, $MS^{1/2}$ + *Serratia* e $MS^{1/2}$ + ANA (0,8; 0,9 e 1,1, respectivamente) tiveram melhor desempenhos (Fig.7c).

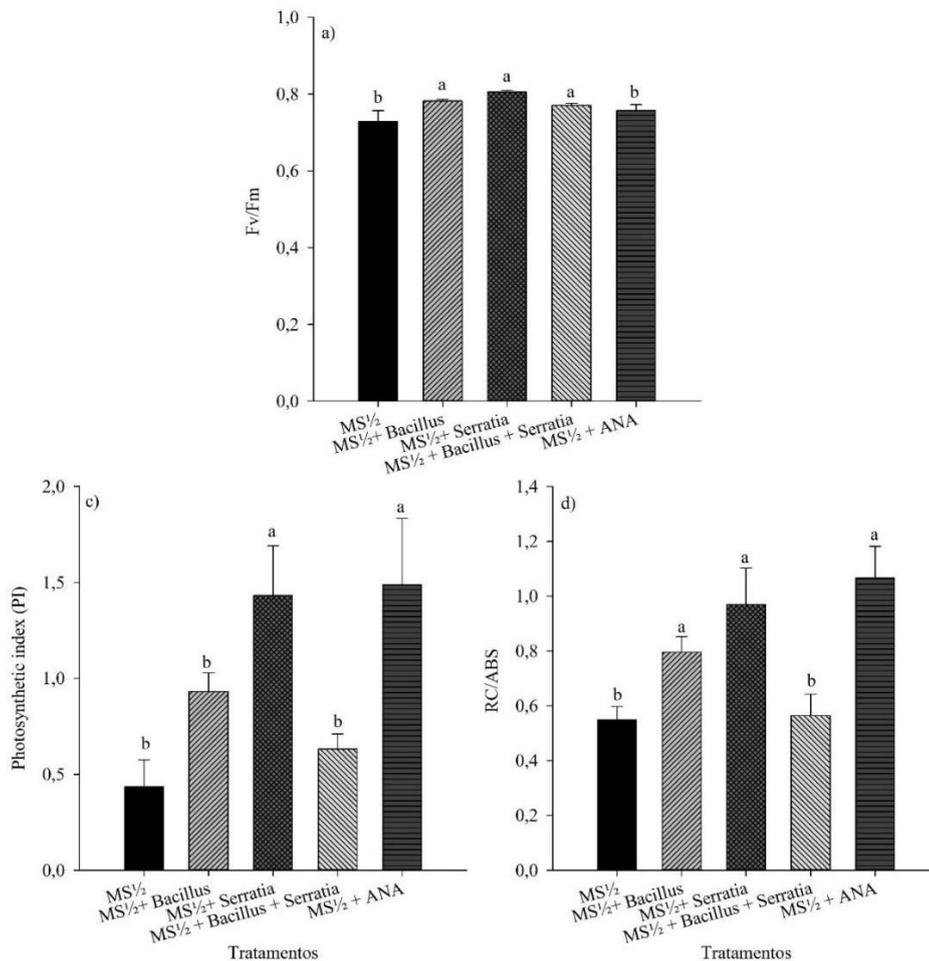


Fig. 7 Avaliação fisiológica aos 45 dias de cultivo *in vitro* de *Stryphnodendron adstringens* em função dos tratamentos ($MS^{1/2}$, $MS^{1/2}$ + *Bacillus*, MS + *Serratia marcescens*, $MS^{1/2}$ + *Bacillus* + *Serratia* e $MS^{1/2}$ + ANA). *Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Plântulas de *S. adstringens* oriundas do cultivo *in vitro* apresentaram melhores taxas de sobrevivência quando foram inoculados com as BPCPs, sendo os tratamentos: $MS^{1/2}$ + *Bacillus* (100%), $MS^{1/2}$ + *Serratia* (100%), $MS^{1/2}$ + *Bacillus* + *Serratia* (100%). As menores taxas de sobrevivência foram obtidas nos tratamentos, $MS^{1/2}$ (60%) e $MS^{1/2}$ + ANA (60%).

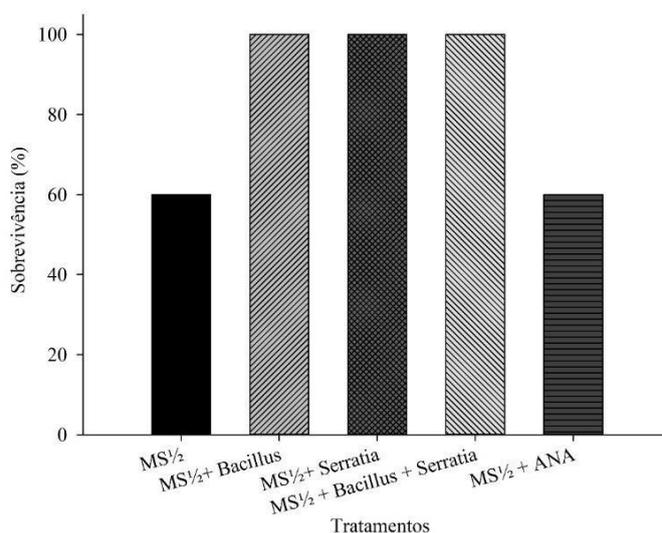


Fig. 8 Porcentagem de sobrevivência de plântulas de *S. adstringens* nos tratamentos (MS^{1/2}, MS^{1/2} + *Bacillus*, MS^{1/2} + *Serratia marcescens*, MS^{1/2} + *Bacillus* + *Serratia* e MS^{1/2} + ANA) na aclimatização *ex vitro*.

Discussão

As BPCPs das espécies *B. methylotrophicus* e *S. marcescens* foram relatadas anteriormente com potencial promotor de crescimento de plantas de *Solanum lycopersicum* L. (Campos Neto et al., 2018) e *Glycine max* L. (Asaf et al., 2017), com efeito potencial no desenvolvimento das plantas, pela capacidade de produzir AIA. De maneira semelhante, as BPCPs também proporcionaram o aumento dessa auxina nas plantas *S. adstringens*, com destaque para as aplicações de *B. methylotrophicus* e *S. marcescens*, que aumentaram e beneficiaram os atributos de crescimento das mesmas, em comparação aquelas submetidas aos tratamentos controle. Além disso, o comportamento diretamente proporcional entre a inoculação de BPCPs e o crescimento de porção radicular, acúmulo de biomassa, área foliar, avaliados no presente estudo, também podem estar relacionados a capacidade dessas bactérias em produzirem AIA, hormônio que influencia diretamente nessas variáveis.

Para Sobral (2003), o nível de AIA sintetizado pela planta é importante para determinar se o AIA bacteriano estimula ou suprime o crescimento da planta. Nas raízes das plantas, o AIA endógeno pode ser benéfico para o crescimento, e o AIA adicional retirado das BPCPs pode resultar na promoção ou inibição do crescimento da planta, respectivamente (Pilet e Saugy, 1987). Ainda, as BPCPs têm potencial para proporcionar as plantas a superação ao estresse

abiótico, pois o fornecimento de AIA para a planta estimula diretamente o crescimento, mesmo na presença de compostos inibitórios (Wani, Khan e Zaidi, 2008; Bianco e Defez, 2009). Dessa forma, os resultados que encontramos sugerem que a produção de AIA pode ter influenciado o incremento de comprimento de parte aérea, comprimento de raiz e área foliar de plântulas de *S. adstringens*.

Também são importantes que, além de avaliações dos efeitos das BPCPs nas variáveis relacionadas a comprimento de parte aérea e raiz, também sejam estudadas outras variáveis relacionadas a fisiologia das plantas produzidas *in vitro*, pois a diminuição ou eliminação da sacarose no meio de cultivo e uso de membranas permeáveis, facilita as trocas gasosas entre os frascos de cultivo e o ambiente externo, além disso, podem estimular a capacidade fotossintética das plantas na condição *in vitro*, e desta forma produzir plântulas mais resistentes e com melhor adaptação e aumento da taxa de sobrevivência das plântulas às condições *ex vitro* (Xiao et al., 2011; Batista et al., 2017; Walter, 2019).

No trabalho de Maciel et al. (2020), ao estudar a aclimatização de amoreira preta (*Rubus* spp.) com rizogênese *in vitro* e *ex vitro*, sob inoculação de microrganismos promotores do crescimento, observaram melhorias na eficiência fotossintética favorecidas pelas inoculações. Contudo, respostas semelhantes foram obtidas neste presente trabalho com o barbatimão, com melhoria do aparato fotossintético com uso das BPCPs. Essas melhorias no aparato fotossintético podem ser explicadas pelo aumento da absorção de nutrientes, maior exigência e captação de carbono em razão da colonização das raízes, e entre outros fatores (Zhu et al., 2012).

Na literatura existem poucos trabalhos que avaliam os efeitos de BPCPs na fluorescência da clorofila no cultivo *in vitro*. Dentre estes, no trabalho de Zhang et al. (2008), os autores testaram a inoculação de *Bacillus subtilis* em *Arabidopsis*, e verificaram que plantas com aumento na eficiência do PSII, traduzidos pelo maior valor da relação F_v/F_m em plântulas obtiveram valor $0,76 \pm 0,01$ em relação às plantas sem a adição de bactérias. Resultados semelhantes foram obtidos no nosso estudo, com maiores valores em plântulas inoculadas *Bacillus*, *Serratia* e combinação de *Bacillus* + *Serratia* (0,78, 0,85 e 0,77) (Fig.7a), porém os valores foram menores nos tratamentos $MS\frac{1}{2}$ e $MS\frac{1}{2}$ + ANA (0,72 e 0,72) (Fig.7a), característica esta que pode estar atrelada a ausência da inoculação com as BPCPs. O uso de BPCPs são excelentes sistemas modelo que podem fornecer novas ferramentas da biotecnologia, com novos constituintes genéticos e bioativos com diversos usos na agricultura sustentável, proporcionando controle de doenças que não podem ou são parcialmente gerenciados por outras estratégias de controle (Glick, 2012).

No trabalho de Couto et al. (2014), com abacaxizeiro *Ananas comosus* (L.) com dois genótipos, o “Vítoria” apresentou valores de Fv/Fm superiores a “IAC Fantástico”, valores entre 0,75 - 0,76, portanto, esses valores estão dentro da faixa considerada ótima Fv/Fm de $0,80 \pm 0,5$ por Bolhàr-Nordenkampf et al. (1989). Desta maneira, os resultados obtidos no nosso estudo evidenciam que, as inoculações com as BPCPs podem ter influenciado os valores que estão dentro da faixa considerada ótima. Conforme os valores obtidos na relação Fv/Fm das plântulas de barbatimão, houve alta eficiência na maquinaria fotossintética provocada pela a inoculação com as BPCPs.

Para a aclimatização *ex vitro*, Kumar et al., (2021), testaram a bactéria *Serratia quinivorans* em plântulas de *Picrorhiza kurroa*, em casa de vegetação, observaram aumento na taxa de sobrevivência das plântulas ao ambiente externo. No trabalho de Rosier et al., (2018), com bactérias do gênero *Paenibacillus* isoladas de tecido de *Cymbidium eburneum* conseguiram aumentar a taxa de sobrevivência e promover o crescimento de mudas de *Cattleya* sp. durante o processo de aclimatização. Resultados semelhantes foram obtidos nessa pesquisa, pois houve aumento na taxa de sobrevivência das plântulas inoculadas com *Bacillus*, *Serratia* e combinação de *Bacillus* + *Serratia*. O efeito positivo na aclimatização *ex vitro* pode estar relacionado com a capacidade das bactérias produzirem ácido indolacético - AIA, hormônio vegetal no qual desempenha um papel importante no desenvolvimento de raízes laterais e alongamento do caule em plantas.

Assim, nós concluímos que todas as plântulas de *S. adstringens* apresentaram efeitos positivos no crescimento e desenvolvimento *in vitro* quando inoculadas com *B. methylotrophicus* e *S. marcescens* com inoculação ao longo do tempo (15 e 30 dias), tiveram rápido desenvolvimento vegetativo, superior ao controle, e em alguns casos superior ao tratamento combinado das duas bactérias. Porém, as plântulas de barbatimão inoculadas com a bactéria *Serratia* apresentaram melhor desempenho quando avaliados os parâmetro de crescimento e fisiológicos. As BPCPs já estão sendo usadas com sucesso por outros pesquisadores, destacando-se como importante tecnologia sustentável capaz de possibilitar maior crescimento, desenvolvimento e maior taxa de sobrevivência das plântulas quando expostas ao ambiente externo, com destaque à agricultura orgânica, sem a adoção de substâncias químicas. No entanto, mais estudos são necessários para investigar os mecanismos de sinalização hormonal desencadeados por estas bactérias.

Agradecimentos

Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro concedido. A Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e ambiente, aos Laboratório de Cultura de Tecidos (LCT-UEMA) e Laboratório de Fitopatologia (UEMA) pelo apoio logístico, técnico e científico.

Referências

- Almeida LV da S, Jesus V dos S de O, Cecilia CB de J, Antonio WB de A (2017) As plantas medicinais e a micropropagação como ferramenta para sua expansão e utilização. *Textura* 9:01–15
- Araújo P da S, Oliveira SS de J de Vicenzott BN, et al (2020) Superação de dormência e qualidade da luz na germinação de sementes de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. *Research, Society and Development* 9: e2829108450. <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i10.8450>
- Asaf S, Khan MA, Khan AL, et al (2017) Bacterial endophytes from arid land plants regulate endogenous hormone content and promote growth in crop plants: an example of *Sphingomonas* sp. and *Serratia marcescens*. *J Plant Interact* 12:31–38. <https://doi.org/10.1080/17429145.2016.1274060>
- Asari S, Tarkowská D, Rolčík J, et al (2017) Analysis of plant growth-promoting properties of *Bacillus amyloliquefaciens* UCMB5113 using *Arabidopsis thaliana* as host plant. *Planta* 245:15–30. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2580-9>
- Batista DS, Dias LLC, do Rêgo MM, et al (2017a) Tipo de vedação na germinação e na morfogênese in vitro de dois tipos de explante de pimenteira ornamental. *Ciencia Rural* 47:. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20150245>
- Behera BC, Yadav H, Singh SK, et al (2017) Phosphate solubilization and acid phosphatase activity of *Serratia* sp. isolated from mangrove soil of Mahanadi River delta, Odisha, India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 15:169–178. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.01.003>
- Belincanta C, Botelho G, Ornellas TS, et al (2022) Characterization of the endophytic bacteria from *in vitro* cultures of *Dendrocalamus asper* and *Bambusa oldhamii* and assessment of their potential effects in *in vitro* co-cultivated plants of *Guadua chacoensis* (*Bambusoideae*, *Poaceae*). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 58:122–132. <https://doi.org/10.1007/s11627-021-10204-1>

- Bianco C, Defez R (2009) *Medicago truncatula* improves salt tolerance when nodulated by an indole-3-acetic acid-overproducing *Sinorhizobium meliloti* strain. *J Exp Bot* 60:3097–3107. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp140>
- Bolhar-Nordenkamp HR, Longt SP, Bakert NR, et al (1989) Chlorophyll Fluorescence as a Probe of the Photosynthetic Competence of Leaves in the Field: A Review of Current Instrumentation. <https://doi.org/10.2307/2389624>
- Brader G, Compant S, Mitter B, et al (2014) Metabolic potential of endophytic bacteria. *Curr Opin Biotechnol* 27:30–37. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.09.012>
- Campos Neto JRM, Chaves RR, Sardinha DHS, et al (2018) Bacterial Formulations in Induction of Resistance and Growth Promotion of Tomato Plants. *Journal of Agricultural Science* 10:493. <https://doi.org/10.5539/jas.v10n10p493>
- Cantabella D, Teixidó N, Segarra G, et al (2021a) Rhizosphere microorganisms enhance *in vitro* root and plantlet development of *Pyrus* and *Prunus* rootstocks. *Planta* 253:78. <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03595-3>
- Cantabella D, Teixidó N, Segarra G, et al (2021b) Rhizosphere microorganisms enhance *in vitro* root and plantlet development of *Pyrus* and *Prunus* rootstocks. *Planta* 253:78. <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03595-3>
- Couto TR do Araujo JS de P (2018) Aclimatização de mudas micropropagadas de genótipos de gérbera. *Rev Agrar Acad* 1:52–63. <https://doi.org/10.32406/v1n42018/52-63/agrariacad>
- Dutta J, Thakur D (2017) Evaluation of multifarious plant growth promoting traits, antagonistic potential and phylogenetic affiliation of rhizobacteria associated with commercial tea plants grown in Darjeeling, India. *PLoS One* 12: e0182302. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182302>
- Ferreira DF (2011) Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia* 35:1039–1042. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542011000600001>

- Fuentes G, Talavera C, Desjardins Y, Santamaría JM (2007) Low exogenous sucrose improves *ex vitro* growth and photosynthesis in coconut *in vitro* plantlets if grown *in vitro* under high light. *Acta Hort* 748:151–155. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.748.18>
- Glick BR (2012) Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica (Cairo)* 2012:1–15. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>
- Gonçalves JF de C, Silva CE, Guimarães DG, Bernardes RS (2010) Análise dos transientes da fluorescência da clorofila a de plantas jovens de *Carapa guianensis* e de *Dipteryx odorata* submetidas a dois ambientes de luz. *Acta Amazon* 40:89–98. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672010000100012>
- Gordon SA, Weber RP (1951) Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiol* 26:192–195. <https://doi.org/10.1104/pp.26.1.192>
- Khan AL, Halo BA, Elyassi A, et al (2016) Indole acetic acid and ACC deaminase from endophytic bacteria improves the growth of *Solanum lycopersicum*. *Electronic Journal of Biotechnology* 21:58–64. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.02.001>
- Kumar, R, Borker, SS, Thakur, A, et al (2021). Physiological and genomic evidence supports the role of *Serratia quinivorans* PKL: 12 as a biopriming agent for the biohardening of micropropagated *Picrorhiza kurroa* plantlets in cold regions. *Genomics*, 113(3), 1448–1457. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.03.019>
- Lima AG, Paula-Souza J, Ringelberg JJ, et al (2022) New segregates from the Neotropical genus *Stryphnodendron* (Leguminosae, Caesalpinioideae, mimosoid clade). *PhytoKeys* 205:203–237. <https://doi.org/10.3897/phytokeys.205.82220>
- Lyngwi NA, Nongkhlaw M, Kalita D, Joshi SR (2016) Bioprospecting of Plant Growth Promoting *Bacilli* and Related Genera Prevalent in Soils of Pristine Sacred Groves: Biochemical and Molecular Approach. *PLoS One* 11: e0152951. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152951>
- Marcos Filho J (2015) Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Abrates

- Maciel KJA (2020) Aclimatização de amoreira preta-preta cv. Tupy com rizogênese *in vitro* e *ex vitro* sob inoculação de microrganismos promotores do crescimento. Dissertação, Universidade Estadual de Ponta Grossa.
- Mariano R de LR, Silveira EB da, Assis SMP de et al (2013) Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica 1:89–111
- Meira MR (2012) Viabilidade técnica e econômica de planos de manejo sustentável para o barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* Mart. Coville) no norte de Minas Gerais. Universidade Federal de Minas Gerais
- Nicoli PM, Paiva R, Nogueira RC, et al (2008) Ajuste do processo de micropropagação de barbatimão. Ciência Rural 38:685–689. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000300014>
- Oteino N, Lally RD, Kiwanuka S, et al (2015) Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. Front Microbiol 6:. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00745>
- Park Y-G, Mun B-G, Kang S-M, et al (2017) *Bacillus aryabhattai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones. PLoS One 12: e0173203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173203>
- Pilet P-E, Saugy M (1987) Effect on Root Growth of Endogenous and Applied IAA and ABA. Plant Physiol 83:33–38. <https://doi.org/10.1104/pp.83.1.33>
- Quambusch M, Pirttila AM, Tejesvi M v, et al (2014) Endophytic bacteria in plant tissue culture: differences between easy- and difficult-to-propagate *Prunus avium* genotypes. Tree Physiol 34:524–533. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpu027>
- Radwan TE-SE-D, Mohamed ZK, Reis VM (2005) Aeração e adição de sais na produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas. Pesqui Agropecu Bras 40:997–1004. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2005001000008>

- Rohini S, Aswani R, Kannan M, et al (2018) Culturable Endophytic Bacteria of Ginger Rhizome and their Remarkable Multi-trait Plant Growth-Promoting Features. *Curr Microbiol* 75:505–511. <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1410-z>
- Rosier A, Medeiros FHV, Bais HP (2018) Defining plant growth promoting rhizobacteria molecular and biochemical networks in beneficial plant-microbe interactions. *Plant Soil* 428:35–55 <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3679-5>
- Saldanha CW, Otoni CG, de Azevedo JLF, et al (2012) A low-cost alternative membrane system that promotes growth in nodal cultures of Brazilian ginseng [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 110:413–422. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0162-5>
- Silva RC da, Vieira ESN, Panobianco M (2014) Técnicas para superação da dormência de sementes de guanandi. *Pesqui Agropecu Bras* 49:719–727. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2014000900008>
- Junior Pereira Simas LC, Coriolano de Oliveira E, Valle Rorig TD, et al (2020) The plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville as a neutralizing source against some toxic activities of *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon* 186:182–190. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.08.011>
- Singh RP, Jha PN (2016) The Multifarious PGPR *Serratia marcescens* CDP-13 Augments Induced Systemic Resistance and Enhanced Salinity Tolerance of Wheat (*Triticum aestivum* L.). *PLoS One* 11: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155026>
- Soares MNB et al (2022) Germinação e Calogênese *In Vitro* de Barbatimão (*Stryphnodendron Adstringens*): Uma Estratégia para Produção de Metabólitos Secundários. *Anais do Congresso Brasileiro Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia Anais Diamantina (MG) Online*
- Sobral JK (2004) A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endófitos-planta. Universidade de São Paulo.

- Trinh CS, Lee H, Lee WJ, et al (2018) Evaluation of the plant growth-promoting activity of *Pseudomonas nitroreducens* in *Arabidopsis thaliana* and *Lactuca sativa*. *Plant Cell Rep* 37:873–885. <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2275-8>
- Tumbariski, Yulian et al (2016) Biopreservation of fresh strawberries by carboxymethyl cellulose edible coatings enriched with a bacteriocin from *Bacillus methylotrophicus* BM47. *Food technology and biotechnology*, 57(2), 230–237. <https://doi.org/10.17113/ftb.57.02.19.6128>
- Walter R (2019) Aplicação da cultura de tecidos no melhoramento de *Capsicum Annuum*: Superação de barreiras pós-zigóticas, produção de genótipos em larga escala e protocolo para obtenção de haploides. Tese, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- Wani PA, Khan MdS, Zaidi A (2008) Effect of Metal-Tolerant Plant Growth-Promoting *Rhizobium* on the Performance of Pea Grown in Metal-Amended Soil. *Arch Environ Contam Toxicol* 55:33–42. <https://doi.org/10.1007/s00244-007-9097-y>
- Xiao, Y.; Kozai, T (2004) Commercial application of a photoautotrophic micropropagation system using large vessels with forced ventilation: plantlet growth and production cost. *HortScience* 39:1387-1391. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9863-9>
- Zhang H, Xie X, Kim M-S, et al (2008) Soil bacteria augment *Arabidopsis* photosynthesis by decreasing glucose sensing and abscisic acid levels *in planta*. *The Plant Journal* 56:264–273. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03593.x>
- Zhu XC, Song FB, Liu SQ, Liu TD e Zhou X (2012) Arbuscular mycorrhizae improves photosynthesis and water status of *Zea mays* L. under drought stress. *Plant, Soil and Environment* 58 (4): 186–191.