



GRACIELLE VIDAL SILVA ANDRADE

**DIVERSIDADE E BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS
ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS À *Cattleya walkeriana* E
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DURANTE
ACLIAMATIZAÇÃO**

**LAVRAS – MG
2020**

GRACIELLE VIDAL SILVA ANDRADE

**DIVERSIDADE E BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS
ASSOCIADAS À *Cattleya walkeriana* E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DURANTE
ACLIMATIZAÇÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Dr. Moacir Pasqual
Orientador

Dra. Joyce Dória Rodrigues
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Andrade, Gracielle Vidal Silva.

Diversidade e bioprospecção de bactérias endofíticas associadas à *Cattleya walkeriana* e promoção de crescimento durante aclimatização / Gracielle Vidal Silva Andrade. - 2020.
49 p. : il.

Orientador(a): Moacir Pasqual.

Coorientadora: Joyce Dória Rodrigues.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Culturas de tecidos. 2. Diazotróficas. 3. Bactérias solubilizadoras de fosfato. I. Pasqual, Moacir. II. Rodrigues, Joyce Dória. III. Título.

GRACIELLE VIDAL SILVA ANDRADE

**DIVERSIDADE E BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS
ASSOCIADAS À *Cattleya walkeriana* E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DURANTE
ACLIMATIZAÇÃO**

**DIVERSITY AND BIOPROSPECTION OF ENDOPHYTIC BACTERIA
ASSOCIATED WITH *Cattleya walkeriana* AND PROMOTING GROWTH DURING
ACCLIMATIZATION**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 7 de fevereiro de 2020.

Dra. Ester Alice Ferreira EPAMIG

Dra. Angélica Cristina de Souza UFLA

Dr. Moacir Pasqual
Orientador

Dra. Joyce Dória Rodrigues
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2020**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, meu Senhor, pelo auxílio, orientação nas decisões difíceis, por atender meus sonhos e por fazer parte da minha vida.

Aos grandes amores da minha vida, meus pais, Walter e Rosangela, e à minha irmã Gizelle, pelo apoio e incentivo que sempre foi me proporcionado nos meus estudos, e por tudo que fizeram por mim durante toda minha vida, sempre me motivando, ajudando e estando ao meu lado.

Ao Matheus, pelo apoio, companheirismo, ajuda, paciência, e pelos ensinamentos durante todos os anos de convívio.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), que permitiu a concretização de um sonho e, que agora, marca o início de uma nova etapa em minha vida.

Ao meu orientador Moacir Pasqual, pela orientação, incentivo, e, principalmente, pela oportunidade e confiança depositada na realização do trabalho.

Aos laboratoristas e amigos, Vantuil e Filipe, pelos conselhos e colaboração durante todo o trabalho.

À Profa. Joyce Dória Rodrigues e ao Dr. Adalvan Daniel Martins, pelos ensinamentos e conselhos na realização desse trabalho.

Ao Gustavo Magno dos Reis Ferreira e a toda a equipe do Laboratório de Microbiologia Agrícola, pela ajuda na realização do isolamento bacteriano.

A todos os meus colegas que colaboraram nos experimentos, em especial à Carla e à Regiane, sempre atenciosas e prontas para ajudar no que for preciso.

À secretária Marli, por todo auxílio e pela amizade.

A todos os meus colegas e amigos, em especial à Michele e ao Ronilson, pelo apoio e amizade criada nesses anos de trabalho.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a execução desse trabalho.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Plântulas micropropagadas da orquídea *Cattleya walkeriana* necessitam de um longo período de aclimatização. Estudos da interação entre endofítico-orquídea capazes de fixar nitrogênio atmosférico, sintetizar indol, solubilizar fosfatos inorgânicos e produzirem atividade proteolítica podem ser úteis durante esse processo *ex vitro*. O objetivo deste estudo foi avaliar o número e a diversidade da composição de bactérias endofíticas associadas aos distintos ambientes de crescimento de *Cattleya walkeriana* do habitat natural, cultivo agrícola (casa de vegetação), e de condições assimiótica *in vitro*, bem como, posteriormente, avaliar os diferentes mecanismos para promoção de crescimento vegetal. Para isso, bactérias endofíticas de folhas e raízes de *Cattleya walkeriana* foram isoladas e identificadas dos três ambientes de cultivo. Encontrou-se maior número de isolados endofíticos da orquídea na natureza, com cerca de 42% quando comparado aos outros ambientes de cultivo, com cerca de 33% em ambiente agrícola e 25% *in vitro*. A diversidade de bactérias endofíticas foi identificada pertencente aos gêneros: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus* e *Enterobacter*. O potencial para promoção de crescimento vegetal foi avaliado em 33 bactérias endofíticas associadas à *Cattleya walkeriana* sendo todas diazotróficas e, comparativamente, 90% foram capazes de produzir ácido indol acético, 78,8% e 30,3% solubilizaram fosfato de cálcio e óxido de zinco respectivamente *in vitro* e 54,5% apresentaram capacidade de atividade proteolítica. Os resultados obtidos podem oferecer uma contribuição para melhor compreensão da interação dos microrganismos associadas à *Cattleya walkeriana* e as características benéficas promotoras de crescimento para o manejo mais efetivo.

Palavras-chave: Cultura de tecidos. Diazotróficas. Bactérias solubilizadoras de fosfato. Auxina. Protease.

ABSTRACT

Micropropagated seedlings of the *Cattleya walkeriana* orchid require a long acclimatization period. Studies of the interaction between endophytic-orchid that is capable of fixing atmospheric nitrogen, synthesizing indole, solubilizing inorganic phosphates and producing proteolytic activity can be useful during this *ex vitro* process. The goal of this study was to evaluate the number and diversity of the composition of endophytic bacteria associated with the different places of cultivation of *Cattleya walkeriana* in nature, in agricultural cultivation (greenhouse), and *in vitro* asymbiotic conditions, as well as, to evaluate the different mechanisms for promoting plant growth. In this regard, endophytic bacteria from *Cattleya walkeriana* leaves and roots were isolated and identified from three cultivation environments. A greater number of isolated endophytic of the orchid was found in nature, around 42% when compared to other cultivation environments, about 33% in agricultural environment and 25% *in vitro*. The diversity of endophytic bacteria was identified, and it belongs to the genres: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus* and *Enterobacter*. The potential for promoting plant growth was evaluated in 33 endophytic bacteria associated with *Cattleya walkeriana*, all of which are diazotrophic bacteria and, comparatively, 90% were able to produce indoleacetic acid, 78.8% and 30.3% solubilized calcium phosphate and oxide zinc *in vitro*, respectively, and 54.5% showed the capacity for proteolytic activity. The results obtained may offer a contribution to a better understanding of the interaction of microorganisms associated with *Cattleya walkeriana* and the beneficial growth-promoting characteristics for more effective management.

Keywords: Tissue culture. Diazotrophic bacteria. Phosphate-solubilizing bacteria. Auxin. Protease.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos tratamentos utilizados.....	31
Tabela 2 - Números de bactérias endofíticas isoladas de <i>Cattleya walkeriana</i>	32
Tabela 3 - Índices de diversidade de bactérias endofíticas de três locais de cultivo de <i>Cattleya walkerian</i>	33
Tabela 4 - Características promotoras de crescimento vegetal dos isolados endofíticos obtidos dos tecidos vegetais folhas e raízes selecionados do habitat natural, do ambiente agrícola e de propagação seminífera <i>in vitro</i> de <i>Cattleya walkeriana</i>	35
Tabela 5 - Crescimento das plântulas micropropagadas de <i>Cattleya walkeriana</i> em resposta a inoculação de bactérias endofíticas após aclimatização em casa de vegetação durante 120 dias.....	37

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL.....	10
1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
2.1	A Família Orchidaceae	11
2.2	Bactérias promotoras de crescimento.....	12
2.2.1	Fixação biológica de nitrogênio atmosférico.....	13
2.2.2	Solubilização de fosfato.....	14
2.2.3	Solubilização de zinco	15
2.2.4	Síntese de compostos indólicos	15
2.2.5	Atividade proteolítica.....	16
	REFERÊNCIAS	17
1	OBJETIVOS	23
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
2.1	Origem do material vegetal e local de coleta	24
2.1.1	Isolamento de bactérias endofíticas	25
2.1.2	Identificação dos isolados bacterianos por MALDI-TOF MS	25
2.1.3	Análise da biodiversidade	26
2.2	Avaliação da promoção de crescimento vegetal por bactérias endofíticas	27
2.2.1	Produção de inóculo	27
2.2.2	Avaliação de bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico	27
2.2.3	Avaliação do potencial de solubilização de fosfato de cálcio	28
2.2.4	Avaliação do potencial de solubilização de óxido de zinco	28
2.2.5	Identificação de bactérias produtoras de ácido Indol-Acético (AIA).....	29
2.2.6	Atividade de enzima proteolítica.....	29
2.3	Avaliação da inoculação de bactérias endofíticas no crescimento de <i>Cattleya Walkeriana</i>.....	30
2.4	Triagem das plantas aclimatizadas.....	31
2.5	Análises de crescimento	31
2.6	Análise estatística	31
3	RESULTADOS.....	32
3.1	Isolamento bacteriano endofítico	32
3.2	Avaliação da ocorrência de bactérias endofíticas em <i>Cattleya walkeriana</i>.....	32

3.3	Relação entre os diferentes processos promotores de crescimento vegetal dos..	33
3.4	Avaliação da promoção de crescimento em plântulas de <i>Cattleya walkeriana</i> aclimatizadas.....	36
4	DISCUSSÃO	38
5	CONCLUSÕES	41
	REFERÊNCIAS	42
	ANEXOS	47

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta alta diversidade da família Orchidaceae, abrangendo cerca de 220 gêneros e 2497 espécies de orquídeas sendo 64% delas endêmicas. Tais flores apresentam inflorescências com diferentes formas, tamanhos e cores (Vettorazzi, Carvalho et al. 2019). Essa rica diversidade, confere capacidade adaptativa especializada a diferentes ambientes, o que, conseqüentemente, favorece a germinação assimbiótica *in vitro* para a propagação comercial representando grande potencial de produção *ex vitro* (Roy, Patel et al. 2011).

A importância da família Orchidaceae se dá não apenas por ser uma atividade econômica promissora, mas exerce importante função social, cultural e ambiental pela melhoria na qualidade de vida decorrente de seus produtos (Da Silva, Zeng et al. 2014).

A orquidicultura, porém, limita-se pela alta taxa de mortalidade em condições *ex vitro* e pelo lento crescimento das plântulas. No entanto, as plantas têm desenvolvido, evolutivamente, mecanismos adaptativos complexos, muitos desses somente possíveis a interações benéficas com microrganismos (dos Santos, do Sacramento et al. 2014).

Bactérias que promovem o crescimento de plantas são capazes de estabelecer populações endofíticas nos diferentes tecidos e órgãos das plantas associando simbioticamente com a planta hospedeira; sem que cause algum malefício; acelerando o crescimento e o desenvolvimento das plantas (Zaidi, Khan et al. 2009).

Essa promoção de crescimento de plantas se deve aos diferentes estímulos proporcionados por esses microrganismos, alterando o metabolismo vegetal. A capacidade de produzir *in vitro* esses estímulos para promoção de crescimento de plantas, pode ser de maneira direta e se deve não apenas à fixação biológica de nitrogênio (Kuklinsky-Sobral, Araújo et al. 2004), como também a outros fatores, tais como solubilização de fosfatos (Di Simone, Sayer et al. 1998); (Verma, Ladha et al. 2001); (Baldotto, Baldotto et al. 2010), biossíntese de auxinas (Loaces, Ferrando et al. 2011), influência na atividade enzimática da 1-aminociclopropano 1-carboxilato (ACC) desaminase (Rao, Tanksale et al. 1998), e também a estímulos indiretos como aumento na absorção pelas raízes de água e nutrientes (Mendes and dos REIS JUNIOR 2003)) e indução de resistência sistêmica a patógenos na planta hospedeira (Kloepper, Lifshitz et al. 1989).

Por suas aplicações práticas, as bactérias promotoras de crescimento são frequentemente aplicadas em diferentes culturas como arroz (Verma, Ladha et al. 2001), soja

(Cattelan, Hartel et al. 1999), milho (GOMES, PAIVA et al. 2011), cana-de-açúcar (Boddey, Urquiaga et al. 2003)), abacaxi (Baldotto, Baldotto et al. 2010) e tomate (Barretti, Souza et al. 2008). Bactérias endofíticas já foram abordadas em orquídeas com produção de fitôrmônio da classe das auxinas (Wilkinson, Dixon et al. 1989, Wilkinson, Sivasithamparam et al. 1994), promoção de crescimento e importância benéfica da microbiota da orquídea *Cymbidium* sp. (Gontijo, Andrade et al. 2018).

A riqueza de espécies da família Orchidaceae e os distintos ambientes de crescimento podem resultar na seleção e diversidade de endofíticos que desempenham papel no crescimento e desenvolvimento, o que, conseqüentemente, favorece a importância desses microrganismos para espécie. No entanto, pouco se sabe sobre os microrganismos associados à orquídea *Cattleya walkerina*.

O uso de ferramentas como cultura de tecidos vegetais tem impulsionado expansões do setor ornamental com produção clonal de orquídeas para abastecimento em larga escala. No entanto, o período de aclimatização com alta taxa de mortalidade e lento crescimento apresentam desafios à sua comercialização (Chugh, Guha et al. 2009).

Para melhor compreensão das interações planta-microrganismo e sua associação benéfica capaz de favorecer o aumento da biomassa e adaptabilidade às condições adversas, são necessários estudos prévios de isolamento, seleção e inoculação de inóculos promissores e testes de eficiência. Portanto, a possibilidade de otimizar a produção de plântulas micropropagadas de orquídeas ao inoculá-los com estirpes selecionadas, supostamente dotará o setor de floricultura e plantas ornamentais de maior competitividade na produção e comercialização de seus produtos agrícolas em sistemas de manejos sustentáveis (Sala, Freitas et al. 2005).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A Família Orchidaceae

As orquídeas pertencem à classe Liliopsida, à ordem Asparagales e à família Orchidaceae, abrangendo uma das maiores famílias de monocotiledôneas. Embora ainda não se conheça o número exato de orquídeas, estima-se que existam aproximadamente cerca de 25.000 espécies distribuídas em 850 gêneros e mais de 100.000 híbridos (LONE et al., 2008; ROBERTS; DIXON, 2008).

As orquídeas são apreciadas pela delicadeza de suas formas, variedades de cores, tamanhos de suas flores e inflorescências. Devido sua exuberância e exotismo, apresentam não só potencial ornamental como também cosmético, alimentício e medicinal. E estão entre as plantas ornamentais mais exploradas comercialmente, sob esse enfoque ornamental são mencionados pelo menos cinco vertentes para a utilização das orquídeas: a) flores de corte; b) plantas para a comercialização em vasos; c) plantas com flores selecionadas destinadas à exposição e constituição de matrizes; d) plantas destinadas à colecionadores e; e) paisagismo, principalmente na decoração de jardins, enfatizando seu significativo valor econômico (BARBIERI; STUMPF, 2008; FARIA et al., 2010).

Na natureza, as orquídeas não estão somente ameaçadas por fitopatógenos e pragas, mas devido a distintas utilidades, grande variabilidade genética e, por motivos econômicos, essas plantas vêm sofrendo perturbação antrópica, com extrativismo predatório e a superexploração comercial com a retirada desordenada de orquídeas do ambiente natural (BAPTISTA; LONGHI-WAGNER, 1998) e algumas dessas orquídeas são espécies ameaçadas de extinção (MENDONÇA; LINS, 2000).

Embora a conservação *in situ* por meio da criação de reservas ambientais serem a mais indicada para preservação da biodiversidade, nem sempre é possível ser realizada. A propagação seminífera *in vitro* pode ser considerada uma ferramenta que abrange não somente a exploração comercial, para abastecimento massal, como também preservação da família Orchidaceae auxiliando no estabelecimento de bancos de germoplasma, na preservação da biodiversidade e bem como uma futura reintrodução dessas espécies em ambiente *ex vitro* (UNEMOTO et al., 2007; FARIA et al., 2012).

2.2 Bactérias promotoras de crescimento

As orquídeas são singulares entre as plantas em seu modo de nutrição e crescimento e, muitas vezes estabelecem associações obrigatórias com microrganismos como as micorrizas para propagação natural (Boldrini, Santos et al. 2010).

Bactérias promotoras de crescimento, contudo, são microrganismos capazes de viver tanto epifiticamente, colonizando à superfície vegetal (BALDOTTO; OLIVARES, 2008), quanto endofiticamente vivendo no interior dos tecidos vegetais (HALMANN et al., 1997), e podem interagir com a planta hospedeira de maneira direta ou indireta.

Os mecanismos de ação direta incluem a fixação biológica de nitrogênio, produção de fitormônios e solubilização de fosfatos, entre outros. Já os mecanismos de ação indireta

incluem a indução de resistência sistêmica nos vegetais, produção de sideróforos, controle biológico, diminuição de fatores de estresse como o etileno endógeno, produção de antibióticos e antagonismo a fitopatógenos, dentre outros fatores (OLIVEIRA et al., 2003).

Existe um interesse crescente no papel de bactérias que podem favorecer o crescimento das plantas. Alguns gêneros de bactérias associativas são *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Azoarcus*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Enterobacter* e *Pantoea* (MOREIRA et al., 2010).

2.2.1 Fixação biológica de nitrogênio atmosférico

Um dos mecanismos mais estudado de promoção de crescimento de plantas por bactérias é a fixação biológica de nitrogênio (FBN), processo essencial para transformar o N_2 , uma molécula estável e abundante na atmosfera, que não pode ser utilizada pela maioria das plantas e microrganismos, na forma inorgânica combinada NH_3 , e, a partir daí, em formas reativas orgânicas e inorgânicas vitais em sistemas biológicos. A reação de redução do N_2 a NH_3 é realizada por microrganismos que contêm a enzima nitrogenase, conhecidos como diazotróficos ou fixadores biológicos de nitrogênio (OLIVEIRA et al., 2003; CANTARELLA, 2007).

O Nitrogênio é um macronutriente limitante para produtividade das culturas, sendo primordial para produção de aminoácidos e ácidos nucleicos nas plantas, e está entre os mais altos custos para o agricultor. A maioria dos genótipos de planta utilizados comercialmente foi selecionada para obtenção de alta produtividade em condições de baixo nível de nitrogênio no solo, favorecendo, mesmo que indiretamente, a seleção de variedades que são capazes de suprir parte das suas necessidades de nitrogênio pela associação com bactérias diazotróficas (DÖBEREINER, 1997).

A agricultura nos países de clima tropical é fortemente dependente do emprego de fertilizantes nitrogenados, pois devido à grande quantidade de chuvas e a rápida decomposição da matéria orgânica, grande parte do nitrogênio é perdida via lixiviação, desnitrificação e pela imobilização microbiana. Portanto, é de extrema importância a nutrição equilibrada aliada a práticas culturais que visem um sistema de controle integrado, minimizando os gastos com adubação, tornando a agricultura economicamente viável e mais competitiva capaz de reduzir perdas (SALA et al., 2007).

A fixação biológica de nitrogênio desempenha um papel importante no aporte de nitrogênio nos sistemas de cultivo agrícolas. Estima-se que no mundo, a fixação biológica de nitrogênio em áreas cultiváveis contribuem com 32 Tg ano^{-1} de N, que corresponde a 30% do N produzido na forma de fertilizantes. Porém, no Brasil, a fixação biológica de nitrogênio de origem antropogênica tem um peso relativo maior cerca de $7,3 \text{ Tg ano}^{-1}$ quase três vezes a quantidade de nitrogênio de origem industrial ($2,5 \text{ Tg ano}^{-1}$) (CANTARELLA et al., 2007).

2.2.2 Solubilização de fosfato

Em solos tropicais brasileiros, predominantemente latossolos, apresentarem elevados teores de fósforo (400 a 1200 mg kg^{-1} de solo), a concentração de fósforo disponível para assimilação pelas raízes das plantas é muito baixa, normalmente 1 mg kg^{-1} ou menos, uma vez que facilmente forma complexos insolúveis (RAGHOTHAMA, 1999; OLIVEIRA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2011).

O fósforo é crucial no metabolismo das plantas, desempenhando importante papel na transferência de energia da célula, na respiração e na fotossíntese. É também componente estrutural dos ácidos nucleicos, assim como de muitas coenzimas, fosfoproteínas e fosfolípidos. De acordo com Malavolta (1997), o fósforo juntamente com o nitrogênio é o elemento mais prontamente redistribuído na planta.

As limitações na disponibilidade de fósforo no início do ciclo vegetativo podem resultar em restrições no desenvolvimento, das quais a planta não se recupera posteriormente, mesmo aumentando o suprimento de fósforo a níveis adequados. O suprimento adequado de fósforo é essencial desde os estádios iniciais de crescimento da planta (GRANT et al., 2001). Entretanto, mesmo que abundante no solo, o fósforo se encontra pouco disponível para as plantas, uma vez que facilmente forma complexos insolúveis. Estudos relacionados à solubilização de fosfato de rocha por bactérias são cada vez mais exigidos (VASSILEV; VASSILEVA, 2003). Bactérias endofíticas dos gêneros *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Azotobacter* e *Erwinia* solubilizam fosfatos minerais (BALDOTTO, 2009).

2.2.3 Solubilização de zinco

O zinco é um micronutriente de grande importância para as plantas, participando como componente de um grande número de enzimas e tendo suas funções básicas relacionadas ao metabolismo de proteínas, carboidratos, fosfatos e formação da estrutura de ribossomos, RNA e auxinas. Os sintomas de deficiência de zinco estão associados em grande parte a distúrbios no metabolismo de auxinas, fitormônio responsável pelo crescimento das plantas (ROMUALDO, 2008).

O teor de zinco na crosta terrestre é de aproximadamente 70 mg kg^{-1} , atingindo na litosfera, teor médio de 8 mg kg^{-1} (DECHEN; NACHTIGALL, 2007). A presença de altas concentrações de fósforo nos solos ou nos substratos compromete o aproveitamento do zinco pelas plantas, uma vez que o zinco, assim como o fósforo, é adsorvido pelo solo e fica indisponível para as plantas (MANARIN, 2005).

Bactérias endofíticas como *Gluconacetobacter diazotrophicus* possuem a capacidade de solubilizar óxidos de zinco sendo almejados para compor a formulação de inoculantes e/ou biofertilizantes (INTORNE et al., 2009).

2.2.4 Síntese de compostos indólicos

Os hormônios vegetais são reguladores naturais de crescimento das plantas e influenciam os processos fisiológicos. Entre os hormônios vegetais, o ácido indol acético (AIA) é a auxina natural mais comum encontrada em plantas. Uma das principais funções da auxina nos vegetais superiores é a regulação do crescimento por alongamento de caules jovens e coleóptilos. Baixos níveis de auxina são necessários para o alongamento da raiz, relacionando-se o efeito benéfico para o crescimento e morfologia da raiz pelo maior acesso à água e nutrientes do solo, embora altas concentrações atuem inibindo o crescimento desse órgão (GALDIANO JR., 2009).

Uma maneira indireta de verificar a capacidade de sintetizarem auxinas é a identificação de estirpes que sintetizam indol, substância precursora das auxinas, em ensaios colorimétricos *in vitro* (BRIC et al., 1991).

2.2.5 Atividade proteolítica

As proteases representam a classe de enzimas que ocupam uma posição central em relação aos seus papéis fisiológicos, bem como às suas aplicações comerciais. Enzimas proteolíticas hidrolisam ligações peptídicas de proteínas (Rao, Tanksale et al. 1998).

Como são fisiologicamente necessárias para os organismos vivos, as proteases são influenciadas por diversos fatores, como relação nitrogênio e carbono, pH, temperatura e tempo de incubação. As proteases mais utilizadas industrialmente são produzidas por bactérias do gênero *Bacillus* (Burhan, Nisa et al. 2003)

REFERÊNCIAS

- ADAMS, P. D.; KLOEPPER J. W. "Effect of host genotype on indigenous bacterial endophytes of cotton (*Gossypium hirsutum* L.)." **Plant and Soil**, v. 240, n. 1, p. 181-189, 2002.
- ASIS JR., C.; ADACHI, K. "Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* and nondiazotroph *Enterobacter asburiae* from sweetpotato stem in Japan." **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 19-23, 2004;
- ATLAS, R. M. **Microbial ecology: fundamentals and applications**. Pearson Education India, 1998.
- BALDANI, J.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSÉN, E.; BALDANI, V.; OLIVARES, F. B.; HOSTE, K.; KERSTERS, A.; HARTMANN; GILLIS, M. "Emended description of *Herbaspirillum*; incision of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. Nov.; and classification of a Group of Clinical Isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* species 3." **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 802-810, 1996.
- BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; OLIVARES, F. L.; VIANA, A. P.; BRESSAN-SMITH, R. 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.
- BARRETTI, P. B.; SOUZA, R. M. de; POZZA, A. A. A.; POZZA, E. A., J. G. de. CARVALHO, J. T. de. S. "Aumento da eficiência nutricional de tomateiros inoculados com bactérias endofíticas promotoras de crescimento." **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, v. 4, p. 1541-1548, 2008.
- BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J.; REIS, V. "Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications." **Plant and soil**, v. 252, n. 1, p.139-149, 2003.
- BOLDRINI, R. F.; W. O. SANTOS, Z. M.; CRUZ, A.; RAMOS, C. "Bases da associação micorrízica orquidóide." **Natureza on line**, v. 8, p. 140-145, 2010.
- BURHAN, A.; NISA, U.; GÖKHAN, C.; ÖMER, C.; ASHABIL, A.; OSMAN, G. "Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6." **Process Biochemistry**, v. 38, n. 10, p. 1397-1403, 2003.
- CAPRIOLI, R. M., T. B. Farmer and J. Gile. "Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS." **Analytical chemistry**, v. 69, n. 23, p. 4751-4760, 1997.

- CATTELAN, A.; HARTEL, P.; FUHRMANN, J. "Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth." **Soil Science Society of America Journal**, v. 63, n. 6, p. 1670-1680, 1999.
- DA SILVA, J. A. T.; ZENG, S.; GALDIANO, R. F.; DOBRÁNSZKI, J.; CARDOSO, J. C.; VENDRAME, W. A. "In vitro conservation of Dendrobium germplasm." **Plant cell reports**, v. 33, n. 9, p. 1413-1423, 2014.
- DI SIMINE, C.; SAYER, J.; GADD G. "Solubilization of zinc phosphate by a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from a forest soil." **Biology and Fertility of Soils**, v. 28, n. 1, p. 87-94, 1998.
- DOS SANTOS, J. F. et al. "Crescimento de girassol em função da inoculação de sementes com bactérias endofíticas." **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, n. 2, p. 142-150, 2014.
- FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; CARVALHO, J. F. R. P. de. "**Cultivo de Orquídeas.**" Mercenas, 2010. 208 p.
- FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; DA SILVA, R. "Bactérias diazotróficas associadas a coqueiros na região de baixada litorânea em Sergipe." **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n.12, p. 1509-1517, 2001.
- GALDIANO JR.; R. F. et al. "Auxin-producing bacteria isolated from the roots of *Cattleya walkeriana*, an endangered Brazilian orchid, and their role in acclimatization." **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, n. 3, p. 729-737, 2011.
- GARBEVA, P.; VAN VEEN, J. A.; VAN ELSAS, J. D. "Assessment of the diversity, and antagonism towards *Rhizoctonia solani* AG3, of *Pseudomonas* species in soil from different agricultural regimes." **FEMS Microbiology Ecology**, v. 47, n. 1, p. 51-64, 2004.
- GARCIA, P. O.; P. C. LOBO-FARIA. "**Metodologias para Levantamentos da Biodiversidade Brasileira.**" 2007. Texto apresentado (Conclusão de disciplina) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2007.
- GOMES, E.; PAIVA, C.; DIAS, F.; DOS SANTOS, F.; MARRIEL, I. "**Efeito da inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato sobre o crescimento de milho (*Pennisetum glaucum*) fertilizado com fosfato de rochas.**" Embrapa Milho e Sorgo-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E), 2011.
- GONTIJO, J. B.; ANDRADE, G. V. S.; BALDOTTO, M. A.; BALDOTTO, L. E. B. "Bioprospecting and selection of growth-promoting bacteria for *Cymbidium* sp. orchids." **Scientia Agricola**, v. 75, v. 5, p. 368-374, 2018.
- KLOPPER, J. W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R. M. "Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity." **Trends in biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 39-44, 1989.
- KUKLINSKY- SOBRAL, J.; ARAÚJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANI- KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. "Isolation and characterization of soybean- associated bacteria and their potential for plant growth promotion." **Environmental microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1244-1251, 2004.

LANGE, A.; MOREIRA, F. "Detecção de Azospirillum amazonense em raízes e rizosfera de Orchidaceae e de outras famílias vegetais." **Revista brasileira de ciência do solo**, v. 26, n. 2, p. 529-533, 2002.

LIU, J. X.; CUI, Z.; LIU, Z.; GUO, Z.; YU, Q.; YAO, Y.; SUI, J.; JIN, X.; LIU, G. "The diversity and geographic distribution of cultivable Bacillus-like bacteria across black soils of northeast China." **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1424, 2019.

LOACES, I.; FERRANDO, L.; SCAVINO, A. F. "Dynamics, diversity and function of endophytic siderophore-producing bacteria in rice." **Microbial ecology**, v. 61, n. 3, p. 606-618, 2011.

MAGURRAN, A. E. **Ecological diversity and its measurement**. Princeton university press, 1988.

MENDES, I. D. C.; DOS REIS JUNIOR, F. "**Microrganismos e disponibilidade de fósforo (P) nos solos: uma análise crítica**." Embrapa Cerrados-Documentos (INFOTECA-E), 2003.

MOORE, F. P.; BARAC, T.; BORREMANS, B.; OEYEN, L.; VANGRONSVELD, J. D.; VAN DER LELIE, C. D.; CAMPBELL, E. R. MOORE "Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: the characterisation of isolates with potential to enhance phytoremediation." **Systematic and applied microbiology**, v. 29, n. 7, p. 539-556, 2006.

MURASHIGE, T.; F. SKOOG "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures." **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

PATEL, R. "MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases." **Clinical chemistry**, v. 61, n. 1, p. 100-111, 2015.

PAULA, C. D.; SILVA, H. dE. Cultivo prático de orquídeas, Viçosa: UFV.

Peng, G., W. Zhang, H. Luo, H. Xie, W. Lai and Z. Tan (2009). "Enterobacter oryzae sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the wild rice species *Oryza latifolia*."

International journal of systematic and evolutionary microbiology, v. 59, n. 7, p. 1650-1655, 2001.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. "Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases." **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62. n. 3, p. 597-635, p. 1998.

ROY, A.; PATEL, R.; PATEL, V.; SAJEEV, S.; DEKA, B. C. "Asymbiotic seed germination, mass propagation and seedling development of *Vanda coerulea* Griff ex. Lindl.(Blue Vanda): An in vitro protocol for an endangered orchid." **Scientia Horticulturae**, v. 128, n. 3, p. 325-331, 2011.

SALA, V. M. R. et al. "Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo." **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, v. 3, p. 345-352, 2005.

SARAVANAN, V.; MADHAIYAN, M.; THANGARAJU, M. "Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*." **Chemosphere**, v. 66, n. 9, p. 1794-1798, 2007.

SHANNON, C. E. The mathematical theory of communication. 1963. **MD Comput.**, v. 14, n. 4, p. 306-17, jul./aug. 1997.

SOUZA, G. R. B. de. "**Desenvolvimento in vitro e criopreservação de sementes de orquídeas.**", 2015. 64 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2015.

STOESSL, A.; ARDITTI, J. "**Orchid phytoalexins.**" *Orchid Biology, Reviews and Perspectives III*. New York: Cornell University Press, Ithaca, 1984, p. 151-175.

TSAVKELOVA, E.; LOBAKOVA, E.; KOLOMEITSEVA, G. T. Cherdyntseva and A. Netrusov. "Associative cyanobacteria isolated from the roots of epiphytic orchids." **Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 92-97, 2003.

TSAVKELOVA, E.; CHERDYNTSEVA, T.; NETRUSOV, A. "Auxin production by bacteria associated with orchid roots." **Microbiology**, v. 74, n. 1, p. 46-53, p. 2005.

TSAVKELOVA, E. A.; CHERDYNTSEVA, T. A.; BOTINA, S. G.; NETRUSOV, A. I. "Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin." **Microbiological research**, v. 162, n. 1, p. 69-76, 2007.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. "Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice." **Journal of Biotechnology**, v. 91 n. 2-3, p. 127-141, 2001.

VETTORAZZI, R. G.; CARVALHO, V. S.; TEIXEIRA, M. C.; CAMPOSTRINI, E. et al. "Cryopreservation of immature and mature seeds of Brazilian orchids of the genus *Cattleya*." **Scientia Horticulturae**, v. 256, p.108-603, 2019.

VIDEIRA, S. S.; DE OLIVEIRA, D. M.; DE MORAIS, R. F.; BORGES, W. L.; V. L. D.; BALDANI, J.; BALDANI, I. "Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two *Pennisetum purpureum* Schum. genotypes grown in the field." **Plant and soil**, v. 356, n. 1-2, p. 51-66, 2012.

WHIPPS, J. M. "Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere." **Journal of experimental Botany**, v. 52(suppl_1), p. 487-511, 2001.

WILKINSON, K.; DIXON, K.; SIVASITHAMPARAM, K. "Interaction of soil bacteria, mycorrhizal fungi and orchid seed in relation to germination of Australian orchids." **New Phytologist**, v. 112, n. 3, p. 429-435, 1989.

WILKINSON, K.; SIVASITHAMPARAM, K.; DIXON, K.; FAHY; BRADLEY, P. J. "Identification and characterisation of bacteria associated with Western Australian orchids." **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, n. 1, p. 137-142, 1994.

ZAIDI, A.; KHAN, M.; AHMED, M.; OVES, M. "Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria." *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, v. 56, n. 3, p. 263-284, 2009.

CAPÍTULO 2 SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM *Cattleya walkeriana*

RESUMO

Um dos principais desafios da orquidicultura é otimizar o crescimento das plantas e, assim, reduzir o período necessário de aclimatização. A técnica da cultura de tecidos tem auxiliado expressivamente na obtenção de mudas da orquídea *Cattleya walkeriana* em larga escala, com alta qualidade fitossanitária em menor período de tempo. Porém, o crescimento lento das plântulas e a baixa taxa de sobrevivência em condições *ex vitro* ainda são fatores limitantes. Por outro lado, bactérias endofíticas vêm sendo notavelmente utilizadas como alternativa complementar e demonstram auxiliar no crescimento e na saúde das plantas. No entanto, pouco se sabe sobre os endofíticos promotores de crescimento aliado aos variados ambientes de crescimento e a atuação dos microrganismos na aclimatização de *Cattleya walkeriana*. Neste contexto, os objetivos deste estudo foram isolar e identificar os endofíticos bacterianos que ocorrem naturalmente em *Cattleya walkeriana* na natureza, em ambiente agrícola (casa de vegetação) e em plantas mantidas em cultivo assimbiótico *in vitro* e avaliar o potencial de promoção de crescimento *in vitro* desses microrganismos, bem como a capacidade de promoção de sobrevivência e crescimento de plântulas micropropagadas durante a aclimatização. Sete bactérias endofíticas foram testadas na aclimatização de *C. walkeriana*: *Paenibacillus illinoisensis*, *Enterobacter asburiae*, *Bacillus* sp., *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas* sp., *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter* sp. Após 120 dias de aclimatização em casa de vegetação, avaliou-se a taxa de sobrevivência e a capacidade de promover crescimento vegetal. Ao total, 33 endofíticos foram isolados, variando quanto a sua capacidade de produção de auxina, solubilização de fosfatos minerais e na taxa de sobrevivência. Os resultados indicam que as bactérias endofíticas podem realizar interações benéficas com plântulas de *Cattleya walkeriana* na aclimatização, estimulando o crescimento vegetal, aumentando a porcentagem de sobrevivência. Essas bactérias apresentam potencial para formulação de bioinoculantes a fim de otimizar e estabelecer um sistema sustentável de produção de mudas.

Palavras-chave: Bactérias diazotróficas. Orchidaceae. Bactérias promotoras de crescimento.

ABSTRACT

One of the main challenges in orchid culture is to optimize the growth of the plants, and thus to reduce the necessary acclimatization period. The tissue culture technique has significantly helped in obtaining seedlings of the *Cattleya walkeriana* orchid on a large scale, with high phytosanitary quality in a shorter period of time. However, the slow growth of seedlings and the low survival rate in *ex vitro* conditions are still limiting factors. On the other hand, endophytic bacteria have been remarkably used as a complementary alternative and have been shown to aid in plant growth and health. However, little is known about the endophytic growth promoters associated with the varied cultivation environments and the role of microorganisms in the acclimatization of *Cattleya walkeriana*. Seven representative endophytic bacteria were tested in the acclimatization of *C. walkeriana*: *Acinetobacter sp.*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter cloacae*, *Paenibacillus illinoisensis*, *Pantoea dispersa*, *Pseudomonas sp.* and *Klebsiella pneumoniae*. After 120 days of acclimatization in a greenhouse, the survival rate and the ability to promote plant growth were evaluated. In total, 33 endophytes were isolated, varying their auxin production capacity, mineral phosphate solubilization and survival rate. The results indicate that the endophytic bacteria can carry out beneficial interactions with *Cattleya walkeriana* seedlings in acclimatization, stimulating plant growth and increasing the percentage of survival. These bacteria have the potential to form bioinoculants in order to optimize and establish a sustainable seedling production system.

Keywords: Diazotrophic bacteria. Orchidaceae. Growth-promoting bacteria.

1 OBJETIVOS

Isolar, identificar e avaliar os endofíticos bacterianos que ocorrem naturalmente em *Cattleya walkeriana* na natureza, em ambiente agrícola (casa de vegetação) e de plantas mantidas em cultivo assimbiótico *in vitro*, e avaliar a capacidade de promover a sobrevivência e o crescimento das plântulas micropropagadas durante aclimatização.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Origem do material vegetal e local de coleta

O material vegetal foi coletado de três ambientes distintos de cultivo da orquídea *Cattleya walkeriana* sendo eles: na natureza, em uma mata particular localizada na região de Piumhi-MG, em um ambiente agrícola (casa de vegetação) e de plantas *in vitro* em condições assépticas.

Para a coleta das folhas e raízes das plantas matrizes com auxílio de bisturi estéril cortou-se cerca de 7 cm respectivamente de três plantas matrizes coletadas aleatoriamente para os distintos ambientes.

Os tecidos vegetais coletados das plantas matrizes na natureza e em ambiente agrícola procederam-se durante o verão fase de crescimento vegetativo para não comprometer o desenvolvimento das orquídeas.

A planta matriz mantida em ambiente agrícola pertence ao acervo do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Universidade Federal de Lavras (UFLA) do Departamento de Agricultura (DAG), mantendo os matrizeiros em casa de vegetação sob sombrite com 60% de sombreamento e cultivada em vaso de cerâmica arredondado com furos nas laterais e no fundo de modo a facilitar aeração e drenagem das raízes, contendo como substrato fibra de coco em pó. A orquídea foi manejada conforme descrito por (PAULA and SILVA 2001, Faria, Assis et al. 2010) considerando os diferentes aspectos de cultivo como controle fitossanitário, irrigação, substrato, adubação e luminosidade.

A planta matriz *in vitro* é proveniente da propagação seminífera mantida em condições assépticas em sala de crescimento, também pertencente ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (UFLA/DAG). A semeadura *in vitro* foi realizada em frascos contendo 40 mL da metade da concentração de macronutrientes do meio de cultivo MS (Murashige and Skoog 1962) e mantidos em câmara de crescimento com temperatura e luz controladas (25 ± 2 °C, luz artificial de $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h). No aparecimento dos primeiros folíolos, foram transferidos para meio MS completo e subcultivados em intervalos de 90 dias.

2.1.1 Isolamento de bactérias endofíticas

Para isolamento de bactérias endofíticas pertencente aos ambiente de cultivo de *Cattleya walkeriana* foi realizada a desinfecção das folhas e raízes em hipoclorito de sódio a 1% por três minutos e etanol a 70% (v/v) por um minuto, e posterior lavagem em triplicata em água destilada autoclavada (Tsavkelova, Cherdyntseva et al. 2007).

Amostras de 1 g de folhas e raízes, separadamente, foram maceradas em almofariz e em seguida realizou-se diluições seriadas em solução salina estéril (NaCl 0,8%) com fator diluição 1:10 até a diluição 10^{-6} . Alíquotas de 100 μ L de cada diluição foram plaqueadas, em triplicata, contendo o meio de cultivo sólido Ágar nutriente 5 g L⁻¹ de Peptona; 3 g L⁻¹ de Extrato de Carne; 5 g L⁻¹ de Cloreto de Sódio (NaCl); 15 g L⁻¹ de Ágar e incubadas a 30°C por 24 horas.

As bactérias isoladas foram crescidas em Caldo Nutriente líquido (CN) 5 g L⁻¹ de Peptona; 3 g L⁻¹ de Extrato de Carne; 5 g L⁻¹ de Cloreto de Sódio (NaCl) e, posteriormente, pelo método de estrias paralelas, em placas de Petri contendo o mesmo de cultura suplementado com 15 g L⁻¹ de Ágar, em triplicata foram incubadas a 30 °C, por 24 horas e repetidas três vezes consecutivas para purificação dos isolados.

Placas que contenham entre 30 e 300 colônias foram utilizadas para a classificação dos isolados de acordo com as características das células (forma e coloração Gram) e das colônias (diâmetro, borda, forma, brilho, textura, elevação e cor) visando à diferenciação dos morfotipos.

As culturas puras foram estocadas à -20 °C em criotubos contendo glicerol 25% para posteriores análises.

2.1.2 Identificação dos isolados bacterianos por MALDI-TOF MS

A espectrometria de massa de dessorção/ionização por laser, assistida por matriz (MALDI MS) foi usada para identificação através do perfil proteico dos isolados bacterianos. As culturas puras foram reativadas em ágar nutriente e incubadas em BOD a 28 °C por 18 horas, as quais foram submetidas a análise no equipamento ultrafleXtreme MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics; Bremen, Germany).

A extração proteica foi realizada com solução orgânica com etanol, acetonitrila e água pura na proporção 1:1:1 acrescida de 10% de ácido trifluoroacético (TFA). A massa celular foi adicionada a um eppendorf juntamente com 6 μ L de solução orgânica, agitou-se em vortex

por cinco minutos. Alíquota de 0,6 uL da extração proteica foi adicionada à placa do MALDI-TOF em triplicata. Após secagem, a amostra foi coberta com 1uL de solução matriz ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA), previamente preparada para uma concentração final de 10 mg CHCA/ml de solução orgânica (Caprioli, Farmer et al. 1997, Patel 2015).

Os espectros de massa foram processados usando o software BioTyper (versão 3.0; Bruker Daltonics) executado com a versão de banco de dados BioTyper DB5989, contendo 5989 perfis de referência MALDI-TOF. A correspondência entre os perfis experimentais MALDI-TOF MS obtidos de isolados de bactérias e os perfis MALDI-TOF MS de referência são expressos por BioTyper de acordo com um Log (Score) e um código de cor associada (verde, amarelo e vermelho).

O registro BioTyper (pontuação) superior a 2,3 (cor verde) indica uma identificação altamente provável ao nível da espécie. Um registro (pontuação) entre 2,0 e 2,3 significa identificação altamente provável no nível do gênero (cor verde) e identificação provável ao nível da espécie. Um registro (pontuação) entre 1,7 e 2,0 (cor amarela) implica apenas a identificação provável do gênero, enquanto o valor da pontuação abaixo de 1,7 (cor vermelha) não significa semelhança significativa entre o perfil desconhecido e qualquer um da base de dados.

2.1.3 Análise da biodiversidade

A análise da diversidade microbiana nos tecidos vegetais (folhas e raízes) de diferentes ambientes de cultivo de *Cattleya walkerina* do habitat natural, do ambiente agrícola e do cultivo assimiótico *in vitro* foram avaliados quanto diversidade e distribuição numérica de microrganismo endofíticos (Garcia and Lobo-Faria 2007).

O índice de Shannon-Wiener (H) assume que os indivíduos são coletados aleatoriamente dentro de uma amostra, enfatizando a riqueza de espécies $H' = - \sum p_i * \text{Log}(p_i)$, onde: H' = índice de diversidade de espécies de Shannon-Wiener; p_i , é uma proporção de bactérias endofíticos encontrada nos distintos ambiente de cultivo de *Cattleya walkeriana* (Garcia and Lobo-Faria 2007).

Já o índice de Equitabilidade de Shannon (E): $E = H'/H'^{\text{max}}$ utiliza o resultado obtido pelo índice de Shannon-Wiener e leva em consideração o padrão de distribuição das espécies bacterianas entre as espécies, ou seja, o número de espécies envolvidas na amostra (Shannon 1997); (Magurran 1988, Atlas 1998).

2.2 Avaliação da promoção de crescimento vegetal por bactérias endofíticas

2.2.1 Produção de inóculo

Os microrganismos endofíticos avaliados em testes de promoção de crescimento foram selecionados em relação à fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfatos minerais e produção de auxina. Após a seleção dos microrganismos endofíticos foi realizada a curva de crescimento dos microrganismos a fim de selecionar a concentração do microrganismo que promoveu melhor crescimento bacteriano. Para isso os microrganismos endofíticos foram crescidos em Caldo Nutriente líquido (CN) e incubados a 30 °C à 120 rpm por 24 horas.

A curva de crescimento foi obtida a partir da leitura de absorbância (O.D) a um comprimento de onda de 600 nm em espectrofotômetro Biospectro SP-220 e pelo plaqueamento por técnica de microgota. A população microbiana de 1×10^8 UFC/mL foi escolhida entre as populações 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^6 até 10^{10} UFC/mL em testes preliminares que permitiu o melhor crescimento bacteriano.

2.2.2 Avaliação de bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico

A seleção de bactérias fixadoras de nitrogênio, diazotróficas, foi realizada a partir da metodologia descrita por Döbereiner et al. (1995) e (Baldani, Pot et al. 1996). Para isso, bactérias puras previamente selecionadas foram crescidas em meio Caldo Nutriente líquido sob agitação por 24 horas, a 30 °C e 120 rpm. Alíquotas de 100 µL das soluções bacterianas foram inoculadas em triplicata, em tubos de ensaio de 10 mL contendo 5 mL do meio de cultura semissólido JNFb, NFb, LGI, LGI-P, JMV e JMVl sem adição de nitrogênio, e incubadas a 30 °C, em câmara de crescimento por sete dias.

Posteriormente, por meio de estrias compostas em triplicata, foram transferidas para os mesmos meios de cultivos, porém, sólidos, para confirmação das bactérias diazotróficas. A formação de halo ou uma película aerotóxica típica na superfície do meio foi considerada como crescimento satisfatório, podendo ou não ocorrer mudança de coloração do meio de cultura considerada como fixadores de nitrogênio indicando redução do nitrogênio atmosférico em amônia. Como controle positivo foi utilizado à estirpe Ab-V5 *Azospirillum brasiliense*.

2.2.3 Avaliação do potencial de solubilização de fosfato de cálcio

Bactérias endofíticas foram crescidas em meio Caldo Nutriente líquido sob agitação de 120 rpm em shaker por 24 h a 30 °C. Aliquotas de 20 µL das soluções bacterianas foram ajustada a densidade óptica à um comprimento de onda de 600 nm para um valor igual a 0,5 (equivalente a 1×10^8 células/mL) e colocadas em placas de Petri contendo o meio de cultura sólido 10 g L⁻¹ de glicose, 5 g L⁻¹ de cloreto de amônio (NH₄Cl), 1 g L⁻¹ de cloreto de sódio (NaCl), 1 g L⁻¹ de sulfato de magnésio heptahidratado (Mg SO₄.7H₂O), 5,0 g L⁻¹ de fosfato de fosfato de cálcio, 15 g L⁻¹ de ágar, 1 L de água destilada a pH 7,0 e incubadas a 30°C por sete dias (Verma, Ladha et al. 2001).

Os isolados foram considerados capazes de solubilizar fosfato inorgânico e insolúvel quando observada a formação do halo translúcido que se forma em torno das colônias solubilizadores. Foram realizadas três repetições para cada estirpe bacteriana. E como positivo utilizou-se a bactéria *Pseudomonas* sp. (Cattelan, Hartel et al. 1999).

2.2.4 Avaliação do potencial de solubilização de óxido de zinco

Para a avaliação das bactérias com potencial para solubilização de óxido de zinco, as estirpes isoladas foram crescidas em meio Caldo Nutriente líquido por 24 h a 30 °C e sob agitação de 120 rpm. Aliquotas de 20 µL das soluções bacterianas foram ajustada a densidade óptica à um comprimento de onda de 600nm para um valor igual a 0,5 (equivalente a 1×10^8 células/mL) e colocadas em placas de Petri com meio de cultura sólido contendo 10 g L⁻¹ de glicose, 1 g L⁻¹ de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), 0,2 g L⁻¹ de cloreto de potássio (KCl), 0,1 g L⁻¹ de fosfato dipotássio (K₂HPO₄), 0,2 g L⁻¹ de sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄.7H₂O), 1,0 g L⁻¹ de óxido de zinco (ZnO), 15 g L⁻¹ de ágar, 1L de água destilada, a pH 7,0 e incubadas a 30 °C por sete dias (Saravanan, Madhaiyan et al. 2007, Baldotto, Baldotto et al. 2010). A avaliação da solubilização de zinco foi caracterizada pela formação do halo translúcido que se forma em torno das colônias solubilizadoras. Foram realizadas três repetições para cada isolado. E como controle positivo utilizou-se a bactéria *Pseudomonas* sp.

2.2.5 Identificação de Bactérias Produtoras de Ácido Indol-Acético (AIA)

A determinação da produção de ácido indol-acético foi realizada usando o método colorimétrico Salkowski, preparado a partir de cloreto férrico em ácido sulfúrico (GORDON; WEBER, 1951; LOACES et al., 2011). Os isolados foram cultivados em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio caldo nutriente com pH ajustado para 6.8 a 7.0, incubados a 30 °C durante 48 horas sob agitação constante 120 rpm.

A concentração de células bacterianas foi ajustada para 1×10^8 células/mL pela densidade óptica em espectrofotômetro (densidade óptica de 0,5 em comprimento de onda de 600 nm).

Posteriormente, foram transferidos 5% (v/v) da cultura bacteriana com auxílio de uma micropipeta para tubos de ensaio contendo 5 mL de meio caldo nutriente suplementado com triptofano (100 ug/mL). Os tubos de ensaio foram incubados em BOD a 30°C por 72 horas no escuro sob agitação constante de 120 rpm. Após esse período, a cultura bacteriana foi submetida à centrifugação a 12000rpm por 5 minutos e o sobrenadante recuperado.

A produção de auxina foi determinada pela mistura de 1mL do sobrenadante recuperado, com 1 mL do Reagente de Salkowski (1,875g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 150 mL de H_2SO_4 a 35% e 100 mL de água). Em seguida, a mistura foi incubada em BOD a 30°C por 10 minutos no escuro.

Após a incubação da mistura, a mudança na coloração róseo-avermelhada das amostras foi considerada indicador de produção de auxina. Foram realizadas três repetições para cada microrganismo bacteriano. Como controle positivo foi utilizado à estirpe Ab-V5 *Azospirillum brasiliense*.

2.2.6 Atividade de enzima proteolítica

A produção da enzima protease por microrganismos endofíticos da rizosfera e de folhas de *Cattleya walkeriana* foi avaliada através de testes qualitativos. Os microrganismos bacterianos foram crescidos em meio Caldo Nutriente líquido por 24 h, a 30 °C e 120 rpm e ajustada densidade óptica a um comprimento de onda de 600 nm para um valor igual a 0,5 (equivalente a 1×10^8 células/mL).

Alíquotas de 20 µL dessa solução bacteriana foram transferidas para placas de petri contendo meio de cultivo hidrolisado de caseína e incubadas a 30 °C por 24 h. A formação de halos translúcidos e a precipitação em torno das colônias cultivadas indicou atividade

proteolítica do microrganismo. O respectivo meio de cultura apresenta a seguinte constituição: 20 g L⁻¹ de caseína; 5 g L⁻¹ de peptona; 5 g L⁻¹ de extrato de levedura; 10 g L⁻¹ de glicose; 20 g L⁻¹ de ágar e a pH 5,0.

2.3 Avaliação da Inoculação de Bactérias Endofíticas no Crescimento de *Cattleya Walkeriana*

O material vegetal para aclimatização foi oriundo de plântulas de *Cattleya walkeriana* micropropagadas, mantidas em frascos de 300 mL contendo 40 mL do meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Os frascos foram mantidos em câmara de crescimento com temperatura e luz controladas ($25 \pm 2,0$ °C, luz artificial de $75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h). Para a realização das etapas experimentais subsequentes, foram selecionadas plântulas homogêneas com $1,0 \pm 0,4$ cm.

Para investigar o efeito da inoculação de microrganismo endofítico no crescimento de plântulas de *Cattleya walkeriana*, foram selecionadas sete potenciais bactérias endofíticas que apresentaram resultados positivos para capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, solubilização de fosfato de cálcio e óxido de zinco como também para atividade da enzima protease e produção de auxina. A caracterização desses isolados é uma condição para estimar seu potencial de aplicação em campo (Moore, Barac et al. 2006) e (Videira, de Oliveira et al. 2012).

As bactérias selecionadas foram crescidas em meio Caldo Nutriente líquido por 24 h a 30 °C, 120 rpm e ajustada a densidade óptica 1×10^8 células/mL à um comprimento de onda de 600 nm. A inoculação foi realizada pela imersão de plântulas de *Cattleya walkeriana* provenientes de cultura de tecidos em 10 mL da solução bacteriana por 30 min. Posteriormente, as plântulas foram transferidas para condições *ex vitro* em vasos de 100 ml contendo o substrato esfagno autoclavado por três vezes consecutivas, para eliminação de possíveis contaminantes. Cinquenta plântulas foram inoculadas com cada inóculo bacteriano e um tratamento sem bactérias, mas conteúdo caldo nutritivo foi utilizado como controle. E, durante o período experimental, cada plântula foi tratada com 10 ml da solução bacteriana a cada mês e regadas com 10 ml de água da torneira duas vezes por semana.

2.4 Triagem das plantas aclimatizadas

Plântulas de *Cattleya walkeriana*, inoculadas com bactérias endofíticas e aclimatizadas por 150 dias, foram coletadas para confirmação da presença do inóculo bacteriano. Por conseguinte, foi realizado o isolamento e a identificação das bactérias endofíticas conforme descrito nas seções 2.1.1 e 2.1.2. Os resultados revelaram que todos endofíticos inoculados estavam presentes na orquídea aclimatizada.

2.5 Análises de crescimento

Após aclimatização, as plântulas foram coletadas para a mensuração das seguintes variáveis: número de folhas (NF); número de raízes (NR) e com auxílio de um paquímetro digital Max Tools foi medido comprimento médio das folhas (CMF); comprimento médio das raízes (CMR); altura das plântulas (HP); massa fresca total (MF) e massa seca total (MS), obtidas após secagem em estufa de ventilação forçada a 65 ° C por 48 h. E taxa de sobrevivência de plântulas aclimatizadas (TS).

2.6 Análise estatística

O experimento foi instalado segundo o delineamento inteiramente casualizado (DIC), com 8 tratamentos (TABELA 1), sendo estes compostos por sete bactérias endofíticas, mais o controle sem bactérias e, 50 repetições por tratamento.

Os dados foram submetidos análise de variância (ANOVA) utilizando o software R e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Tabela 1 - Descrição dos tratamentos utilizados.

Tratamento	Descrição
T1	Controle (sem inoculação de bactérias)
T2	<i>Paenibacillus illinoisensis</i>
T3	<i>Bacillus</i> sp
T4	<i>Enterobacter asburiae</i>
T5	<i>Pantoea agglomerans</i>
T6	<i>Pseudomonas</i> sp
T7	<i>Enterobacter cloacae</i>
T8	<i>Acinetobacter</i> sp

Fonte: Da autora (2020).

3 RESULTADOS

3.1 Isolamento bacteriano endofítico

Ao total, foram isoladas 33 bactérias endofíticas diferentes de folhas e raízes dos três ambientes de cultivo da orquídea *Cattleya walkeriana* do habitat natural, em ambiente agrícola (casa de vegetação) e em mantidas em cultivo assimbiótico *in vitro* (TABELA 2). Encontrou-se maior número de isolados endofíticos da orquídea matriz na natureza com cerca de 42 % quando comparado aos outros ambientes de cultivo, com cerca de 33 % em ambiente agrícola e 27% *in vitro*.

Tabela 2 - Números de bactérias endofíticas isoladas de *Cattleya walkeriana*.

Ambiente de cultivo	Tecido vegetal	Nº de isolados
Natureza	Folha	6
	Raiz	8
Casa de vegetação	Folha	4
	Raiz	7
<i>in vitro</i>	Folha	4
	Raiz	5
Total de isolados		33

Fonte: Da autora (2020).

3.2 Avaliação da ocorrência de bactérias endofíticas em *Cattleya walkeriana*

A diversidade de bactérias endofíticas presente nos três ambientes de cultivo de *Cattleya walkeriana* pelo índice de Shannon-Wiener (H) assume que a riqueza dos microrganismos não foi contrastante do habitat natural e do ambiente agrícola (casa de vegetação) porém, para as condições de cultivo *in vitro* foram relativamente menores.

No entanto, quando se analisa o índice de Equitabilidade de Shannon (E) que leva em consideração o padrão de distribuição dos microrganismos presente nas amostras, a orquídea do ambiente natural de crescimento apresenta maior abundância de espécies bacterianas endofíticas entre as espécies isoladas seguida do ambiente agrícola e cultivo assimbiótico *in vitro*.

Tabela 3 - Índices de diversidade de bactérias endofíticas de três locais de crescimento de *Cattleya walkeriana*.

Ambiente de cultivo / Índices	H	E
Natureza	2,34	0,9
Casa de vegetação	2,16	0,88
<i>In vitro</i>	1,73	0,82

H= índice de Shannon-Wiener; E= equitabilidade

Fonte: Da autora (2020).

3.3 Relação entre os diferentes processos promotores de crescimento vegetal dos endofíticos

Os resultados dos testes para verificação da capacidade de promoção de crescimento *in vitro* dos isolados endofíticos estão apresentados na Tabela 4.

Dos 33 isolados bacterianos endofíticos obtidos, todos apresentam capacidade de fixação biológica de nitrogênio nos distintos meios de cultivo seletivos sendo eles JNFb, NFb, LGI, LGI-P, JMV e JMVl, sem adição de nitrogênio. Bactéria endofítica como *Enterobacter asburiae* apresentou capacidade de crescer em vários meios de cultivo, indicando alta interação simbiótica planta-microrganismo e atividade da enzima nitrogenase capaz de fixar nitrogênio atmosférico.

Comparativamente, as bactérias endofíticas diferiram na capacidade de sintetizar compostos indólicos, solubilizar fosfato de cálcio, óxido de zinco e atividade proteolítica.

A atividade para produção de ácido indol acético (AIA) foi expressa por praticamente todas as estirpes 30 (90,9%) e apenas 3 (9,1%) restantes não produziram AIA na presença de aminoácido precursor Triptofano, provavelmente não apresentaram ativa a via do indol-3-pirúvico na presença do aminoácido.

Observa-se que 26 (78,8%) dos microrganismos endofíticos selecionados solubilizam fosfato de cálcio *in vitro*, apresentando o halo característico que identifica a condição de solubilizadores do fosfato.

Quanto à solubilização de óxido de zinco, 10 isolados endofíticos formaram o halo de solubilização, e os 23 restantes não apresentaram a formação do halo translúcido que forma em torno das estripes solubilizadores.

Analisando cada microrganismo testado, notou-se que houve variação na capacidade enzimática entre elas, dentro de uma mesma espécie. A atividade

proteolítica foi verificada em 18 bactérias endofíticas no qual o halo translúcido de degradação foi observado nas colônias após o período de incubação.

Tabela 4 - Características promotoras de crescimento vegetal dos isolados endofíticos obtidos dos tecidos vegetais folha e raízes selecionados do habitat natural, do ambiente agrícola e de de propagação seminífera *in vitro* de *Cattleya walkeriana*. (continua)

Ambiente de cultivo	Espécie	TV	FBN	MC	FCa	OZn	PRO	AUX
NATURAL	<i>Achromobacter xylooxidans</i>	1	+	5,6	+	-	-	+
	<i>Acinetobacter ursingii</i>	2	+	1,2,3	+	-	+	+
	<i>Bacillus circulans</i>	2	+	6	-	-	+	+
	<i>Burkholderia xenovorans</i>	1	+	1	+	-	-	+
	<i>Buttiauxella noackiae</i>	2	+	6	+	-	-	+
	<i>Enterobacter asburiae</i>	2	+	2,3,5,6	+	-	-	+
	<i>Enterobacter asburiae</i>	1	+	3,6	+	+	+	+
	<i>Enterobacter cloacae</i>	1	+	5	+	+	+	+
	<i>Enterobacter cloacae</i>	2	+	2	+	-	-	+
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	+	5	+	+	-	+
	<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	1	+	2	+	+	+	+
	<i>Pantoea agglomerans</i>	1	+	1,2,4	+	-	+	
	<i>Pseudomonas monteilii</i>	2	+	1	+	-	+	+
	<i>Pseudomonas sp</i>	1	+	5	+	+	+	+
CASA DE VEGETAÇÃO	<i>Achromobacter xylooxidans</i>	1	+	5,6	+	-	-	+
	<i>Acinetobacter sp.</i>	2	+	1	+	+	+	+
	<i>Bacillus sp.</i>	2	+	6	+	+	+	+
	<i>Burkholderia sp.</i>	1	+	1	+	-	-	+
	<i>Pseudomonas sp</i>	1	+	5	+	+	+	+
	<i>Enterobacter asburiae</i>	1	+	2,4,5,6	+	+	+	+
	<i>Enterobacter cloacae</i>	1	+	5	-	+	+	+
	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	2	+	4	-	-	-	-
	<i>Pantoea dispersa</i>	2	+	1	+	+	+	+
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	+	2	-	-	+	+

Tabela 5 - Características promotoras de crescimento vegetal dos isolados endofíticos obtidos das partes vegetais (folha e raiz) selecionados nos ambientes de cultivo de *Cattleya walkeriana* na natureza, agrícola (casa de vegetação) e de propagação seminífera *in vitro*. (conclusão)

IN VITRO	Achromobacter xylooxidans	2	+	5	+	-	-	+
	Achromobacter xylooxidans	1	+	6	+	-	-	+
	Acinetobacter pittii	2	+	3	+	-	-	+
	Bacillus cereus	1	+	2	+	-	+	+
	Enterobacter asburiae	2	+	2,3,5	-	-	+	+
	Enterobacter asburiae	1	+	3	+	-	+	+
	Enterobacter cloacae	1	+	5	+	-	+	+
	Leclercia adecarboxylata	2	+	2	-	-	-	-
	Leclercia adecarboxylata	1	+	2	-	-	-	-

Tecido vegetal (TV) de onde foi isolado a bactéria endofítica da raiz (1) ou folha (2); bactérias fixadoras de nitrogênio (FBN); meio de cultura (MC) usado para detecção de bactérias diazotróficas (1: JMV, 2:JMVL, 3: JNFb, 4:LGI, 5:LGI-P, 6:NFb); solubilização de fosfato de cálcio (FCa); solubilização de óxido de zinco (OZn); produção enzimática de protease (PRO); síntese de compostos indol (AIA); atividade antagônica ao fungo *Fusarium oxysporum* (ATF); (+) resultados positivos; resultados negativos (-).

Fonte: Da autora (2020).

3.4 Avaliação da promoção de crescimento em plântulas de *Cattleya walkeriana* aclimatizadas

Foram avaliadas 7 diferentes bactérias endofíticas que diferiram na capacidade de promover crescimento vegetal e o aumento na porcentagem da taxa de sobrevivência das plântulas micropropagadas de *Cattleya walkeriana* durante o período de aclimatização de 120 dias como apresentado os dados na Tabela 5.

Os microrganismos *Bacillus* sp e *Enterobacter asburiae* incrementaram cerca de 67,8% e 39,9%, respectivamente, no ganho em massa seca. Porém, a inoculação da estirpe *Bacillus* sp apresentou maiores porcentagem de sobrevivência e acúmulo na massa fresca.

Plântulas inoculadas com *Paenibacillus illinoisensis*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas* sp. e *Enterobacter cloacae* também tiveram incrementos significativos no acúmulo da massa fresca e apresentam em média expressiva contribuição na aclimatização das plântulas pela taxa de sobrevivência. Entretanto, com exceção da inoculação de *Acinetobacter* sp., todas as bactérias endofíticas nas características avaliadas, promoveram crescimento em plântulas micropropagadas de *Cattleya walkeriana*.

Tabela 6 - Crescimento das plântulas micropropagadas de *Cattleya walkeriana* em resposta a inoculação de bactérias endofíticas após aclimatização em casa de vegetação durante 120 dias.

Tratamento	NF	CMFo	NR	CMR	HP	MF	MS	TS
	#	(cm)	#	---(cm)---		---(mg)---		(%)
T1	5,142a	1,995c	4,981 b	4,691 b	6,669 b	2,797 c	0,858 c	64
T2	6,142a	4,105a	8,428 a	7,397 a	11,144 a	3,658 b	1,011 b	84
T3	6,000a	4,392a	11,857 a	8,445 a	13,188 a	5,197 a	1,440 a	86
T4	6,571a	4,092a	9,428 a	6,868 a	11,269 a	4,072 b	1,200 a	82
T5	5,571a	4,318a	6,000 b	7,940 a	11,693 a	3,894 b	0,912 b	80
T6.	6,285a	3,255b	8,142 a	6,978 a	10,853 a	3,345 b	0,937 b	76
T7	6,000a	3,996a	10,000 a	7,456 a	11,475 a	4,012 b	1,098 b	78
T8	5,428a	2,247c	5,285 b	4,890 b	6,773 b	2,968 c	0,876 c	66
CV (%)	9,82	7,23	10,14	7,95	10,88	14,09	15,66	

NF= número de raízes; CMFo= comprimento médio do tamanho das folhas; NR= número de raízes; CMR= comprimento médio das raízes; HP= altura da planta; MF= massa fresca; MS= massa seca; TS= taxa de sobrevivência (porcentagem). Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2020).

4 DISCUSSÃO

A biotecnologia, por meio de ferramentas como cultura de tecidos, permite a preservação e multiplicação da orquídea brasileira *Cattleya walkerina* ameaçada de extinção, porém, a alta taxa de mortalidade aliada ao longo período de aclimatização onera essa prática agrícola (Souza 2015).

Abordagens tecnológicas alternativas como o uso de bactérias endofíticas podem ter impacto significativo na produção e adaptação de mudas de *Cattleya walkeriana* micropropagadas. Porém, pouco se sabe sobre os endófitos associados à orquídea e seus efeitos benéficos bem como a influência do habitat da planta hospederira na população bacteriana (Gontijo, Andrade et al. 2018).

No presente estudo, investigou-se o potencial promissor dos microrganismos endofíticos presentes em folhas e raízes, em diferentes condições de cultivo de *Cattleya walkeriana* do habitat natural, ambiente agrícola (casa de vegetação) e em plantas provenientes de propagação seminífera *in vitro*.

O número de bactérias endofíticas isoladas da planta matriz no ambiente natural foi mais expressivo quando comparado aos outros ambientes de crescimento (TABELA 2), porém, obteve maior número de isolados da rizosfera independente do ambiente de cultivo da orquídea. A quantidade de microrganismos endofíticos isolados nos distintos ambientes da planta matriz pode variar de acordo com as estações do ano, habitat, espécie e idade dos tecidos vegetais (Garbeva, van Veen et al. 2004) e (Wilkinson, Dixon et al. 1989).

A diversidade de espécies endofíticas está diretamente relacionada aos diferentes ambientes de crescimento de *Cattleya walkeriana*, a julgar pelo índice de Shannon-Wiener (H), foi possível observar que a diversidade das bactérias endofíticas isoladas diminui na ordem natureza>casa de vegetação>*in vitro* (TABELA 3). Os gêneros *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus* e *Enterobacter* foram os mais recorrentes nos três ambientes de cultivo (TABELA 3). Indicando assim, que esses gêneros não são distribuídos aleatoriamente e pelo índice de equitabilidade (igualdade), independente do ambientes de crescimento, responsáveis pela diversidade dos endofíticos vinculados a *Cattleya walkeriana* (Tsavkelova, Cherdyntseva et al. 2007).

O índice de equitabilidade (igualdade) quanto mais próximo de 1, maior é a igualdade entre as bactérias endofíticas isoladas proporcional a sua diversidade (Magurran 1988). Os microrganismos endofíticos isolados do ambiente agrícola (casa

de vegetação) e da propagação seminífera *in vitro* apresentaram boa equitabilidade entre si, ou seja, sua diversidade é bastante proporcional. Fato que pode ser explicado devido à planta matriz em cultivo assimbiótico *in vitro* ser proveniente de propagação seminífera de cápsula de *Cattleya walkeriana* cultivada em casa de vegetação.

À medida que a diversidade de um ambiente aumenta, maiores são sua plasticidade funcional e estabilidade, de modo que as perturbações externas teriam pouco efeito na sua funcionalidade. Isso explica o fato da orquídea matriz na natureza, apresentar maiores valores para índice de Shannon-Wiener e equitabilidade (Magurran 1988).

Dos 33 isolados endofíticos obtidos, todos foram capazes de fixar nitrogênio atmosférico, sugerindo que diferentes meios de cultura utilizados JNFb, NFb, LGI, LGI-P, JMV e JMVl (TABELA 4), sem adição de nitrogênio é aplicável para analisar comunidades microbianas endofíticas. Uma vez que a enzima nitrogenase responsável pela redução do N₂ atmosférico é inativa na presença de amônio (Liu, Cui et al. 2019); (Lange and Moreira 2002).

A promoção de crescimento em plântulas micropropagadas de *Cattleya walkeriana* pela inoculação de bactérias endofíticas, pode ser atribuída à fixação biológica de nitrogênio e à síntese de fitormônios, auxinas, sendo os principais mecanismos envolvidos na promoção de crescimento vegetal (Tsavkelova, Lobakova et al. 2003); (Tsavkelova, Cherdyntseva et al. 2005). Contudo, outros mecanismos como solubilização de fosfato de cálcio, solubilização de óxido de zinco, e atividade proteolítica, podem estar envolvidos (TABELA 4).

Os isolados *Paenibacillus illinoisensis* e *Bacillus* sp. conferiu às plântulas micropropagadas maiores porcentagens na taxa de sobrevivência em comparação ao tratamento controle sem inoculação bacteriana (TABELA 4). Por outro lado, *Acinetobacter* sp. acarretou baixa taxa de sobrevivência quando comparando estatisticamente ao controle. A inoculação de bactérias endofíticas em plântulas micropropagadas de *Cattleya walkeriana* pode variar da inibição ao crescimento de acordo com o microrganismo utilizado e as competições com populações microbianas locais (Adams and Kloepper 2002).

Associações benéficas podem estimular o crescimento vegetal como observado *Bacillus* sp., *Enterobacter cloacae*, incrementando 67,8%; 39,8% e 28% na massa seca (MS), respectivamente, favorecendo o acúmulo das outras variáveis analisadas como comprimento médio da folha (CMFo); altura da planta (HP); massa fresca (MF) e

aumento no número de raízes (NR) e no comprimento médio das raízes (CMR) essas características também refletem em maiores taxas de sobrevivência. Resultados semelhantes descrito por (Júnior, Pedrinho et al. 2011) foi obtido ao inocular *Enterobacter* sp. em plântulas *in vitro* e aclimatizadas de *Cattleya walkeriana*.

O gênero *Enterobacter* tem sido relatado em diversas culturas, como no trabalho descrito por (Fernandes, Fernandes et al. 2001) ao isolarem folhas e raízes de coqueiro obtiveram 20 isolados, sendo 13 pertencente ao gênero *Enterobacter* e 9 deles foram descritos como *Enterobacter cloacae*, também, salienta-se que já foram descritos em arroz (Peng, Zhang et al. 2009), batata doce (Asis Jr and Adachi 2004) apresentando potencial significativo para fixação biológica de nitrogênio e produção de fitohormônios.

Plântulas inoculadas com *Paenibacillus illinoisensis*, *Pantoea agglomerans* e *Pseudomonas* sp. foi possível observar simbiose planta-endofítico através de diferentes mecanismos exibidos pelos endófitos (TABELA 3) influenciando positivamente no crescimento das plantas aclimatizadas e melhorando significativamente as características agrícolas avaliadas (TABELA 4). As bactérias desses gêneros são promotoras de crescimento vegetal, uma vez que demonstram capacidade de produzir auxina e fixação biológica de nitrogênio, melhorando o crescimento e a qualidade das plantas (Gontijo, Andrade et al. 2018).

Ao passo que, a inoculação de *Acinetobacter* sp. pode ter favorecido o desenvolvimento de populações microbianas ativas ao redor da raiz ocorrendo perda no número de raízes (NR) e no comprimento médio das raízes (CMR). Uma vez que a colonização microbiana da rizosfera pode ser determinada pelos exsudatos liberados como carboidratos, ácidos orgânicos, aminoácidos e vitaminas, atraindo microrganismos benéficos ou excretando compostos fenólicos e fitoalexinas, impedindo que ocorra a colonização de outros microrganismos. Assim, o hospedeiro determina a interação com outros microrganismos e a composição da população rizobactérias (Stoessl and Arditti 1984). Posto que, essas rizobactérias endofíticas forneçam relações não patogênicas com seu hospedeiro, porém, podem apresentar interações benéficas planta-microrganismo, outras interações neutras e outras interações prejudiciais (Whipps 2001).

5 CONCLUSÕES

Os distintos ambientes de crescimento da orquídea *Cattleya walkerina*, da habitat natural, apresentaram maior diversidade de bactérias endofíticas quando comparados ao ambiente agrícola e de condições assimbiótico *in vitro*. Os gêneros *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Bacillus* e *Enterobacter* apresentaram maior distribuição independente do ambiente de cultivo.

A bactéria endofítica *Bacillus* sp. promoveu maior incremento na biomassa das plântulas micropropagadas na aclimatização.

A inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas melhora a adaptação das plântulas micropropagadas ao ambiente *ex vitro*, auxiliando na sobrevivência e no crescimento, reduzindo o período de aclimatização, bem como apresentam potencial para serem utilizados como bioinoculantes.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, P. D.; KLOPPER J. W. "Effect of host genotype on indigenous bacterial endophytes of cotton (*Gossypium hirsutum* L.)." **Plant and Soil**, v. 240, n. 1, p. 181-189, 2002.
- ASIS JR., C.; ADACHI, K. "Isolation of endophytic diazotroph *Pantoea agglomerans* and nondiazotroph *Enterobacter asburiae* from sweetpotato stem in Japan." **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 19-23, 2004;
- ATLAS, R. M. **Microbial ecology: fundamentals and applications**. Pearson Education India, 1998.
- BALDANI, J.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.; OLIVARES, F. B.; HOSTE, K.; KERSTERS, A.; HARTMANN; GILLIS, M. "Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. Nov.; and classification of a Group of Clinical Isolates (EF Group 1) as *Herbaspirillum* species 3." **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 802-810, 1996.
- BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; OLIVARES, F. L.; VIANA, A. P.; BRESSAN-SMITH, R. 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.
- BOLDRINI, R. F.; W. O. SANTOS, Z. M.; CRUZ, A.; RAMOS, C. "Bases da associação micorrízica orquídeide." **Natureza on line**, v. 8, p. 140-145, 2010.
- BURHAN, A.; NISA, U.; GÖKHAN, C.; ÖMER, C.; ASHABIL, A.; OSMAN, G. "Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolate ANT-6." **Process Biochemistry**, v. 38, n. 10, p. 1397-1403, 2003.
- CAPRIOLI, R. M., T. B. Farmer and J. Gile. "Molecular imaging of biological samples: localization of peptides and proteins using MALDI-TOF MS." **Analytical chemistry**, v. 69, n. 23, p. 4751-4760, 1997.
- CATTELAN, A.; HARTEL, P.; FUHRMANN, J. "Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth." **Soil Science Society of America Journal**, v. 63, n. 6, p. 1670-1680, 1999.
- DA SILVA, J. A. T.; ZENG, S.; GALDIANO, R. F.; DOBRÁNSZKI, J.; CARDOSO, J. C.; VENDRAME, W. A. "In vitro conservation of *Dendrobium* germplasm." **Plant cell reports**, v. 33, n. 9, p. 1413-1423, 2014.
- DI SIMINE, C.; SAYER, J.; GADD G. "Solubilization of zinc phosphate by a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from a forest soil." **Biology and Fertility of Soils**, v. 28, n. 1, p. 87-94, 1998.

DOS SANTOS, J. F. et al. "Crescimento de girassol em função da inoculação de sementes com bactérias endofíticas." **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, n. 2, p. 142-150, 2014.

FARIA, R. T.; ASSIS, A. M.; CARVALHO, J. F. R. P. de. "**Cultivo de Orquídeas.**" Mercenas, 2010. 208 p.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; DA SILVA, R. "Bactérias diazotróficas associadas a coqueiros na região de baixada litorânea em Sergipe." **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n.12, p. 1509-1517, 2001.

GALDIANO JÚNIOR, R. F.; PEDRINHO, E. A. N.; CASTELLANE T. C. L.; LEMOS, E. G. de M. "Auxin-producing bacteria isolated from the roots of *Cattleya walkeriana*, an endangered Brazilian orchid, and their role in acclimatization." *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 35, n. 3, p. 729-737, 2011.

GARBEVA, P.; VAN VEEN, J.; VAN ELSAS, J. "Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE." **Microbial Ecology**, v. 45. n. 3, p. 302-316, 2003.

GARBEVA, P.; VAN VEEN, J. A.; VAN ELSAS, J. D. "Assessment of the diversity, and antagonism towards *Rhizoctonia solani* AG3, of *Pseudomonas* species in soil from different agricultural regimes." **FEMS Microbiology Ecology**, v. 47, n. 1, p. 51-64, 2004.

GARCIA, P. O.; P. C. LOBO-FARIA. "**Metodologias para Levantamentos da Biodiversidade Brasileira.**" 2007. Texto apresentado (Conclusão de disciplina) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2007.

GOMES, E.; PAIVA, C.; DIAS, F.; DOS SANTOS, F.; MARRIEL, I. "**Efeito da inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato sobre o crescimento de milho (*Pennisetum glaucum*) fertilizado com fosfato de rochas.**" Embrapa Milho e Sorgo-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E), 2011.

GONTIJO, J. B.; ANDRADE, G. V. S.; BALDOTTO, M. A.; BALDOTTO, L. E. B. "Bioprospecting and selection of growth-promoting bacteria for *Cymbidium* sp. orchids." **Scientia Agricola**, v. 75, v. 5, p. 368-374, 2018.

KLOEPPER, J. W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R. M. "Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity." **Trends in biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 39-44, 1989.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. "Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion." **Environmental microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1244-1251, 2004.

LANGE, A.; MOREIRA, F. "Detecção de *Azospirillum amazonense* em raízes e rizosfera de Orchidaceae e de outras famílias vegetais." **Revista brasileira de ciência do solo**, v. 26, n. 2, p. 529-533, 2002.

- LIU, J. X.; CUI, Z.; LIU, Z.; GUO, Z.; YU, Q.; YAO, Y.; SUI, J.; JIN, X.; LIU, G. "The diversity and geographic distribution of cultivable *Bacillus*-like bacteria across black soils of northeast China." **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1424, 2019.
- LOACES, I.; FERRANDO, L.; SCAVINO, A. F. "Dynamics, diversity and function of endophytic siderophore-producing bacteria in rice." **Microbial ecology**, v. 61, n. 3, p. 606-618, 2011.
- MAGURRAN, A. E. **Ecological diversity and its measurement**. Princeton university press, 1988.
- MENDES, I. D. C.; DOS REIS JUNIOR, F. "**Microorganismos e disponibilidade de fósforo (P) nos solos**: uma análise crítica." Embrapa Cerrados-Docmentos (INFOTECA-E), 2003.
- MOORE, F. P.; BARAC, T.; BORREMAN, B.; OEYEN, L.; VANGRONSVELD, J. D.; VAN DER LELIE, C. D.; CAMPBELL, E. R. MOORE "Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: the characterisation of isolates with potential to enhance phytoremediation." **Systematic and applied microbiology**, v. 29, n. 7, p. 539-556, 2006.
- MURASHIGE, T.; F. SKOOG "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures." **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.
- PATEL, R. "MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases." **Clinical chemistry**, v. 61, n. 1, p. 100-111, 2015.
- PAULA, C. D.; SILVA, H. dE. Cultivo prático de orquídeas, Viçosa: UFV.
Peng, G., W. Zhang, H. Luo, H. Xie, W. Lai and Z. Tan (2009). "Enterobacter oryzae sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the wild rice species *Oryza latifolia*." **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 59, n. 7, p. 1650-1655, 2001.
- RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. "Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases." **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, n. 3, p. 597-635, p. 1998.
- ROY, A.; PATEL, R.; PATEL, V.; SAJEEV, S.; DEKA, B. C. "Asymbiotic seed germination, mass propagation and seedling development of *Vanda coerulea* Griff ex. Lindl.(Blue Vanda): An in vitro protocol for an endangered orchid." **Scientia Horticulturae**, v. 128, n. 3, p. 325-331, 2011.
- SALA, V. M. R. et al. "Ocorrência e efeito de bactérias diazotróficas em genótipos de trigo." **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, v. 3, p. 345-352, 2005.
- SARAVANAN, V.; MADHAIYAN, M.; THANGARAJU, M. "Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*." **Chemosphere**, v. 66, n. 9, p. 1794-1798, 2007.

SHANNON, C. E. The mathematical theory of communication. 1963. **MD Comput.**, v. 14, n. 4, p. 306-17, jul./aug. 1997.

SOUZA, G. R. B. de. "**Desenvolvimento in vitro e criopreservação de sementes de orquídeas.**", 2015. 64 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2015.

STOESSL, A.; ARDITTI, J. "**Orchid phytoalexins.**" *Orchid Biology, Reviews and Perspectives III*. New York: Cornell University Press, Ithaca, 1984, p. 151-175.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; NOWAK, J. "Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production." **Critical reviews in plant sciences**, v. 19, n. 1, p. 1-30, 2000.

TSAVKELOVA, E.; CHERDYNTSEVA, T.; NETRUSOV, A. "Auxin production by bacteria associated with orchid roots." **Microbiology**, v. 74, n. 1, p. 46-53, p. 2005.

TSAVKELOVA, E.; LOBAKOVA, E.; KOLOMEITSEVA, G. T. Cherdyntseva and A. Netrusov. "Associative cyanobacteria isolated from the roots of epiphytic orchids." **Microbiology**, v. 72, n. 1, p. 92-97, 2003.

TSAVKELOVA, E. A.; CHERDYNTSEVA, T. A.; BOTINA, S. G.; NETRUSOV, A. I. "Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin." **Microbiological research**, v. 162, n. 1, p. 69-76, 2007.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. "Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice." **Journal of Biotechnology**, v. 91 n. 2-3, p. 127-141, 2001.

VETTORAZZI, R. G.; CARVALHO, V. S.; TEIXEIRA, M. C.; CAMPOSTRINI, E. et al. "Cryopreservation of immature and mature seeds of Brazilian orchids of the genus *Cattleya*." **Scientia Horticulturae**, v. 256, p.108-603, 2019.

VIDEIRA, S. S.; DE OLIVEIRA, D. M.; DE MORAIS, R. F.; BORGES, W. L.; V. L. D.; BALDANI, J.; BALDANI, I. "Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two *Pennisetum purpureum* Schum. genotypes grown in the field." **Plant and soil**, v. 356, n. 1-2, p. 51-66, 2012.

WHIPPS, J. M. "Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere." **Journal of experimental Botany**, v. 52 (suppl_1), p. 487-511, 2001.

WILKINSON, K.; DIXON, K.; SIVASITHAMPARAM, K. "Interaction of soil bacteria, mycorrhizal fungi and orchid seed in relation to germination of Australian orchids." **New Phytologist**, v. 112, n. 3, p. 429-435, 1989.

WILKINSON, K.; SIVASITHAMPARAM, K.; DIXON, K.; FAHY; BRADLEY, P. J. "Identification and characterisation of bacteria associated with Western Australian orchids." **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, n. 1, p. 137-142, 1994.

ZAJDI, A.; KHAN, M.; AHMAD, M.; OVES, M. "Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria." **Acta microbiologica et immunologica Hungarica**, v. 56, n. 3, p. 263-284, 2009.

ANEXOS

1 Composição dos meios de cultura

1.1 Meio JMV

Para 1000 mL de água destilada foi acrescentado 5 g de Manitol; 6 mL de Solução de Fosfato de Potássio Dibásico (K_2HPO_4) (sol. 10%); 18 mL de Fosfato Potássio Monobásico (KH_2PO_4) (sol. 10%); 2 mL de Sulfato de Magnésio Heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) (sol. 10%); 1 mL de Cloreto de Sódio (NaCl) (sol. 10%); 2 mL de Cloreto de Cálcio Dihidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) (sol. 1%); 2 mL de Azul de Bromotimol (sol. 0,5% em 0,2N de KOH); 4 mL de Ferro EDTA (FeEDTA) (sol. 1,64%); 2 mL de Solução de Micronutrientes para Meio de Cultura; 1 mL de Vitamina para Meio de Cultura; ajustou-se o pH para 4,2 - 4,5 com Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) (sol. 5%) e/ou Hidróxido de Potássio (sol. 10%). O ágar para o meio sólido – 25 g (e adicionar 100 mg de Extrato de Levedura) e para o meio semissólido - 2,1 g.

1.2 Meio JMV L

Para 1000 mL de água destilada foi acrescentado 5 g Manitol; 6 mL de Solução de Fosfato de Potássio Dibásico (K_2HPO_4) (sol. 10%); 18 mL de Fosfato Potássio Monobásico (KH_2PO_4) (sol. 10%); 2 mL de Sulfato de Magnésio Heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) (sol. 10%); 1 mL de Cloreto de Sódio (NaCl) (sol. 10%); 2 mL de Cloreto de Cálcio Dihidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) (sol. 1%); 2 mL de Azul de Bromotimol (sol. 0,5% em 0,2N de KOH); 4 mL de Ferro EDTA (FeEDTA) (sol. 1,64%); 2 mL de Solução de Micronutrientes para Meio de Cultura; 1 mL de Vitamina para Meio de Cultura; 20 mg Extrato de Levedura; ajustou-se o pH para 5,0 – 5,4 com Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) (sol. 5%) e/ou Hidróxido de Potássio (sol. 10%). O ágar para o meio sólido – 25 g e para meio semissólido - 1,6 g.

1.3 Meio JNFb

Para 1000 mL de água destilada foi acrescentado 5 g de Ácido Málico; 6 mL Solução de Fosfato de Potássio Dibásico (K_2HPO_4) (sol. 10%); 18 mL de Fosfato Potássio Monobásico (KH_2PO_4) (sol. 10%); 2 mL de Sulfato de Magnésio Heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) (sol. 10%); 1 mL de Cloreto de Sódio (NaCl) (sol. 10%); 2 mL de Cloreto de Cálcio Dihidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) (sol. 1%); 4 mL de Azul de Bromotimol (sol. 0,5% em 0,2N de KOH); 4 mL de Ferro EDTA (FeEDTA) (sol. 1,64%); 2 mL de Solução de Micronutrientes para Meio de Cultura; 1 mL de Vitamina para Meio de Cultura; 4,5 mL de Hidróxido de Potássio (KOH); ajustou-se o pH para 5,8 com Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) (sol. 5%) e/ou Hidróxido de Potássio (sol. 10%). O ágar para o meio sólido – 17 g (adicionar 20 g de Extrato de Levedura) e para o meio semissólido - 1,7 g.

1.4 Meio LGI

Para 1000 mL de água destilada foi acrescentado 5 g de Açúcar Cristal; 2 de mL Solução de Fosfato de Potássio Dibásico (K_2HPO_4) (sol. 10%); 6 mL de Fosfato Potássio Monobásico (KH_2PO_4) (sol. 10%); 2 mL de Sulfato de Magnésio Heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) (sol. 10%); 2 mL Cloreto de Cálcio Dihidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) (sol. 1%); 4 mL Ferro EDTA (FeEDTA) (sol. 1,64%); 2 mL de Molibdato de Sódio Dihidratado ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) (sol. 0,1%); 5 mL de Azul de Bromotimol (sol. 0,5% em 0,2N de KOH); 1 mL de Vitamina para Meio de Cultura; ajustou-se o pH para 6,0 - 6,2 com Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) (sol. 5%) e/ou Hidróxido de Potássio (sol. 10%). O ágar para o meio sólido – 15 g e para o meio semissólido - 1,4 g.

1.5 Meio LGI-P

Para 1000 mL de água destilada foi acrescentado 100 g de açúcar cristal; 2 mL de Solução de Fosfato de Potássio Dibásico (K_2HPO_4) (sol. 10%); 6 mL de Fosfato Potássio Monobásico (KH_2PO_4) (sol. 10%); 2 mL de Sulfato de Magnésio Heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) (sol. 10%); 2 mL de Cloreto de Cálcio Dihidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) (sol. 1%); 1 mL de Cloreto de Ferro Hexahidratado ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) (sol.

1%); 2 mL de Molibdato de Sódio Dihidratado ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (sol. 0,1%); 1 mL de Vitamina para Meio de Cultura; 5 mL de Azul de Bromotimol (sol. 0,5% em 0,2N de KOH); ajustou-se o pH para 5,5 com Ácido Acético (sol. 10%). O ágar para o meio sólido – 25 g e para o meio semissólido - 1,6 g.

1.6 Meio NFb

Para 1000 mL de água destilada foi acrescentado; 5 g de Ácido Málico; 5 mL de Fosfato de Potássio Dibásico (K_2HPO_4) (sol. 10%); 2 mL de Sulfato de Magnésio Heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (sol. 10%); 1 mL de Cloreto de Sódio (NaCl) (sol. 10%); 2 mL de Cloreto de Cálcio Dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (sol. 1%); 2 mL de Azul de Bromotimol (sol. 0,5% em 0,2N de KOH); 4 mL de Ferro EDTA (FeEDTA) (sol. 1,64%); 2 mL Solução de Micronutrientes para Meio de Cultura; 1 mL de Vitamina para Meio de Cultura; 4,5 mL de Hidróxido de Potássio (KOH); ajustou-se o pH para 6,5 com Ácido Sulfúrico (H_2SO_4) (sol. 5%) e/ou Hidróxido de Potássio (sol. 10%). O ágar para o meio sólido – 15 g (adicionar 20 g de Extrato de Levedura) e para o meio semissólido - 1,6 g.