



ANA MILENA GÓMEZ SEPÚLVEDA

**BIOTIZAÇÃO COM BACTÉRIAS PROMOTORAS DE
CRESCIMENTO NA MICROPROPAGAÇÃO DO
MORANGUEIRO E CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE
MICROBIANA ENDOFÍTICA**

**LAVRAS – MG
2025**

ANA MILENA GÓMEZ SEPÚLVEDA

**BIOTIZAÇÃO COM BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO NA
MICROPROPAGAÇÃO DO MORANGUEIRO E CARACTERIZAÇÃO DA
COMUNIDADE MICROBIANA ENDOFÍTICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutora.

Prof^a. Dr^a. Joyce Dória Rodrigues
Orientadora

Prof. Dr. Ederson da Conceição Jesus
Coorientador

**LAVRAS – MG
2025**

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

Sepúlveda, Ana Milena Gómez.

Biotização com bactérias promotoras de crescimento na
micropropagação do morangueiro e caracterização da comunidade
microbiana endofítica / Ana Milena Gómez Sepúlveda. - 2024.

161 p. : il.

Orientador(a): Joyce Dória Rodrigues.

Coorientador(a): Ederson da Conceção Jesus.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2024.

Bibliografia.

1. Biotização. 2. Micropropagação. 3. Morangueiro. I.
Rodrigues, Joyce Dória. II. Jesus, Ederson da Conceção. III.
Título.

ANA MILENA GÓMEZ SEPÚLVEDA

**BIOTIZAÇÃO COM BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO NA
MICROPROPAGAÇÃO DO MORANGUEIRO E CARACTERIZAÇÃO DA
COMUNIDADE MICROBIANA ENDOFÍTICA**

**BIOTIZATION WITH GROWTH-PROMOTING BACTERIA IN STRAWBERRY
MICROPROPAGATION AND CHARACTERIZATION OF THE ENDOPHYTIC
MICROBIAL COMMUNITY**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADO em 21 de novembro de 2024.

Ph.D. Joyce Doria Rodrigues	UFLA
Ph.D. Claudineia Ferreira Nunes	UFMG
Ph.D. Lucas William Mendes	USP/CENA
Ph.D. Jorge Teodoro De Souza	UFLA
Ph.D. Ederson Da Conceição Jesus	EMBRAPA/UFLA

Prof^ª. Dr^ª. Joyce Dória Rodrigues
Orientadora

Prof. Dr. Ederson da Conceição Jesus
Coorientador

**LAVRAS – MG
2025**

À minha família, em especial à memória do meu querido pai, Jairo Antônio Gomez Aristizábal, cuja presença, ensinamentos e amor incondicional continuam sendo uma fonte inesgotável de inspiração. A Arley, pela paciência, pelo carinho e pelo apoio incansável, que me deram forças para superar cada desafio desta jornada intensa e transformadora. A vocês, dedico esta conquista, que só foi possível graças à sua presença em minha vida.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao programa de pós-graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade e confiança na realização do Doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Organização dos Estados Americanos (OEA) e ao Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (GCUB), por garantir oportunidades de desenvolvimento acadêmico aos países da América Latina.

Aos professores do programa de Microbiologia Agrícola, Fitotecnia e Fitopatologia, pelos ensinamentos transmitidos e concessão dos espaços para o desenvolvimento dos trabalhos.

A Professora Dra. Joyce Dória Rodrigues, pela orientação, paciência, apoio e lições profissionais oferecidas constantemente para a conclusão do trabalho de doutorado.

Ao meu coorientador, Professor Dr. Ederson da Conceição Jesus por todo o auxílio que me deu durante a fase experimental até a conclusão desta tese de doutorado.

A Professora Dra. Vera Lucia Dos Santos da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), bem como aos Professores Dr. Jorge Teodoro De Souza e Dr. Ludwig Heinrich Pfenning pela valiosa ajuda e dedicação demonstradas durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Cultura de Tecidos/Laboratório de Bioprodutos e Interações Planta Microrganismo (LCT/LBIMP) que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus colegas de pós-graduação Yulimar, Andressa, Yuliana, Camila, e a Luna, estudante de iniciação científica.

A meu amigo e parceiro Arley Rey, por seu carinho, compreensão e palavras de apoio.

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais – Brasil (FAPEMIG) – MODALIDADE: EDITAL 001/2021 - DEMANDA UNIVERSAL PROCESSO N.: APQ-02422-21

RESUMO GERAL

O morangueiro é uma planta de grande interesse mundial, cuja produção pode ser realizada por micropropagação *in vitro*, permitindo a obtenção de microplantas a partir de uma planta mãe em condições de assepsia, com posterior transplante para condições *ex vitro*, etapa crucial para a sobrevivência. Nesta pesquisa, avaliou-se o efeito de dez bactérias promotoras de crescimento vegetal na biotização durante a micropropagação *in vitro* e na adaptação *ex vitro*, além de caracterizar a comunidade bacteriana endofítica em plantas de morangueiro ao longo de três gerações da cultivar San Andreas. Os gêneros *Bacillus*, *Azospirillum* e *Rhizobium* destacaram-se pela fixação de nitrogênio, solubilização de fosfatos e potássio, bem como pela produção de enzimas hidrolíticas, ter efeitos benéficos na biotização e a re-inoculação *ex vitro* induzindo modulações fisiológicas e bioquímicas nas plantas. A caracterização da comunidade endofítica revelou uma redução na diversidade de filos ao longo do cultivo *in vitro*, com predominância do filo Actinobacteriota. Em contraste, a planta-mãe apresentou maior diversidade microbiana, com predomínio dos filos Firmicutes, Actinobacteriota e Proteobacteria, evidenciando mudanças no microbioma bacteriano ao longo do processo de micropropagação. Assim, a biotização com bactérias promotoras do crescimento vegetal surge como uma alternativa promissora para a reposição e recuperação da microbiota de microplantas cultivadas *in vitro*, podendo favorecer sua adaptação ao ambiente *ex vitro*. Desta forma, o uso individual ou em consórcios dessas bactérias poderia reduzir a dependência de fertilizantes químicos e promover uma agricultura mais sustentável.

Palavras-chave: Biotização; Micropropagação; Morangueiro; BPCV; interação planta-microrganismo; Metataxonômica.

GENERAL ABSTRACT

Strawberry (*Fragaria × ananassa*) is a globally important crop, and its production can be achieved through *in vitro* micropropagation. This technique enables the generation of microplants from a mother plant under aseptic conditions, followed by transplantation to *ex vitro* conditions, a crucial stage for survival. This study evaluated the effect of ten plant growth-promoting bacteria (PGPB) on biotization during *in vitro* micropropagation and *ex vitro* acclimatization, as well as characterized the endophytic bacterial community in strawberry plants across three generations of the San Andreas cultivar. The genera *Bacillus*, *Azospirillum*, and *Rhizobium* stood out due to their ability to fix nitrogen, solubilize phosphate and potassium, and produce hydrolytic enzymes, having beneficial effects on biotization. Additionally, *ex vitro* re-inoculation induced physiological and biochemical modulations in the plants. Characterization of the endophytic community revealed a reduction in phylum diversity throughout *in vitro* cultivation, with a predominance of the phylum *Actinobacteriota*. In contrast, the mother plant exhibited greater microbial diversity, with a predominance of the phyla *Firmicutes*, *Actinobacteriota*, and *Proteobacteria*, highlighting changes in the bacterial microbiome during the micropropagation process. Thus, biotization with plant growth-promoting bacteria emerges as a promising strategy for restoring and replenishing the microbiota of *in vitro*-cultivated microplants, potentially enhancing their adaptation to *ex vitro* conditions. Therefore, the individual or consortium application of these bacteria could reduce dependence on chemical fertilizers and promote more sustainable agriculture.

Keywords: Biotization; Micropropagation; Strawberry; PGPB; Plant-microorganism interaction; Metataxonomic.

INDICADORES DE IMPACTO

O presente trabalho focou na biotização com bactérias promotoras de crescimento na micropropagação do cultivo de morangueiro, bem como na caracterização da comunidade microbiana endofítica associada. Esta pesquisa tem o potencial de gerar impactos significativos nos âmbitos ambiental, social e econômico. No aspecto ambiental, o uso de bactérias promotoras de crescimento pode reduzir a dependência de fertilizantes químicos e pesticidas, diminuindo a contaminação do solo, da água e do ar, além de promover práticas agrícolas mais sustentáveis. Ademais, contribui para a biodiversidade microbiana e melhora a saúde dos ecossistemas agrícolas.

No âmbito social, essa abordagem pode beneficiar pequenos agricultores ao reduzir os custos de produção, substituindo insumos químicos caros por alternativas biológicas. Isso, por sua vez, pode melhorar a segurança alimentar e a qualidade de vida em comunidades rurais, gerando empregos e fortalecendo a economia local.

Do ponto de vista econômico, a aplicação de bactérias promotoras de crescimento poderia influenciar na produção, rendimentos e qualidade das plantas de morangueiro. Além disso, fomenta a inovação na agricultura, abrindo novas oportunidades para pesquisa e desenvolvimento de tecnologias sustentáveis.

Dessa forma, este trabalho contribui para o cumprimento de sete dos 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável propostos pela ONU, entre eles: Erradicação da Pobreza; Fome Zero e Agricultura Sustentável; Saúde e Bem-Estar; Trabalho Decente e Crescimento Econômico; Consumo e Produção Responsáveis; Ação Contra a Mudança Global do Clima; e Vida Terrestre. Assim, os resultados desta pesquisa reforçam a importância das bactérias promotoras de crescimento como uma ferramenta essencial para transformar a agricultura em um modelo mais sustentável, eficiente e equitativo.

INPACT INDICATORS

This study focused on biotization with growth-promoting bacteria in the micropropagation of strawberry crops, as well as on the characterization of the associated endophytic microbial community. This research has the potential to generate significant impacts in the environmental, social and economic spheres. In the environmental aspect, the use of growth-promoting bacteria can reduce dependence on chemical fertilizers and pesticides, reducing soil, water and air contamination, in addition to promoting more sustainable agricultural practices. In addition, it contributes to microbial biodiversity and improves the health of agricultural ecosystems.

In the social sphere, this approach can benefit small farmers by reducing production costs, replacing expensive chemical inputs with biological alternatives. This, in turn, can improve food security and quality of life in rural communities, generating jobs and strengthening the local economy.

From an economic perspective, the application of growth-promoting bacteria could influence the production, yield and quality of strawberry plants. Furthermore, it fosters innovation in agriculture, opening up new opportunities for research and development of sustainable technologies.

In this way, this work contributes to the fulfillment of seven of the 17 Sustainable Development Goals proposed by the UN, including: No Poverty; Zero Hunger and Sustainable Agriculture; Good Health and Well-Being; Decent Work and Economic Growth; Responsible Consumption and Production; Climate Action; and Life on Land. Thus, the results of this research reinforce the importance of growth-promoting bacteria as an essential tool for transforming agriculture into a more sustainable, efficient and equitable model.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Planta do morangueiro	27
Figura 2 - Micropropagação e aclimatização do morangueiro	29
Figura 3 - Microplantas biotizadas individualmente cultivar Oso grande e Camarosa	54
Figura 4 - Microplantas de morangueiro biotizadas com consórcios	56
Figura 5 - Microplantas biotizadas que apresentaram um efeito negativo na promoção de crescimento	57
Figura 6 - Quantificação do conteúdo total fenólico (TPC) <i>in vitro</i>	59
Figura 7 - Quantificação do conteúdo total de flavonóides (TFC) <i>in vitro</i>	60
Figura 8 - Produção de sideróforos em placa meio B-king-CAS	93
Figura 9 - Produção de sideróforos em meio líquido.....	94
Figura 10 - TPC em mudas biotizadas (A) e em mudas e re-inoculadas (B).....	100
Figura 11 - TFC em mudas biotizadas (A) e em mudas e re-inoculadas	101
Figura 12 - TPC em mudas biotizadas (A) e em mudas e re-inoculadas	104
Figura 13 - TFC em mudas biotizadas CA (A) e em mudas e re-inoculadas CA (B).....	105
Figura 14 - Estabelecimento do cultivo <i>in vitro</i> da cultivar San Andreas	127
Figura 15 - Sequência dos oligonucleotídeos.....	128
Figura 16 - PCA em matriz de covariância	135
Figura 17 - Índice de riqueza e diversidade	136
Figura 18 - Mapa de calor mostrando a abundância de OTUs	137
Figura 19 - Abundância relativa nível de filo	137
Figura 20 - Abundância relativa a nível de gênero	138
Figura 21 - Diagrama de Venn.....	139
Figura 22 - Dendrograma.....	139
Figura 23 - Microplantas biotizadas da cv San Andreas.....	141
Figura 24 - Conteúdo de TPC (A) e TFC (B) <i>in vitro</i>	142
Figura 25 - Conteúdo de TPC na biotização <i>ex vitro</i> (A) e na re-inoculação <i>ex vitro</i> (B)	145
Figura 26 - Conteúdo de TFC na biotização (A) e na re-inoculação <i>ex vitro</i> (B)	146

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Cepas bacterianas	47
Tabela 2 - Tratamentos utilizados na biotização em consórcios	49
Tabela 3 - Produção de biofilme bacteriano.....	52
Tabela 4 - Variáveis fitotécnicas nas cultivares de morangueiro biotizadas individualmente ..	53
Tabela 5 - Variáveis fitotécnicas na cultivares de morangueiro biotizadas em consórcios.....	56
Tabela 6 - Quantificação de clorofilas e carotenóides nas cultivares <i>in vitro</i>	58
Tabela 7 - Cepas bacterianas utilizadas nos testes bioquímicos	80
Tabela 8 - Tratamentos utilizados na casa de vegetação	87
Tabela 9 - Fixação Biológica de nitrogênio, índice de solubilização (IS) e acidificação ou alcalinização em meio sólido pelas BPCV	91
Tabela 10 - Produção de enzimas hidrolíticas pelas BPCV	92
Tabela 11 - Produção de sideróforos qualitativamente.....	93
Tabela 12 - Produção qualitativa e quantitativa de HCN.....	95
Tabela 13 - Percentagem de sobrevivência	95
Tabela 14 - Variáveis fitotécnicas da cultivar Oso Grande na casa de vegetação.....	97
Tabela 15 - Concentração de clorofilas e carotenóides na cultivar Oso Grande.....	99
Tabela 16 - Variáveis fitotécnicas da cultivar Camarosa na casa de vegetação	102
Tabela 17 - Concentração de clorofilas e carotenóides na cultivar Camarosa.....	103
Tabela 18 - Tratamentos utilizados na biotização individual e em consórcios	131
Tabela 19 - Biotização individual da cultivar San Andreas com as BPCVs.....	140
Tabela 20 - Biotização com os consórcios <i>in vitro</i> da cultivar San Andreas	141
Tabela 21 - Percentagem de sobrevivência	143
Tabela 22 - Variáveis fitotécnicas após aclimatização na cv San Andreas <i>ex vitro</i>	144

LISTA DE ABREVIATURAS

ACCd	1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminase
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AIA	Ácido Indol Acético
ARN	Ácido Ribonucleico
ATP	Adenosina Trifosfato
BPCV	Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCBD	Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner da Embrapa Agrobiologia do Brasil
CCMA	Coleção de Cultura da Microbiologia Agrícola
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
GCUB	Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras
LABIMP	Laboratório de Bioprodutos e Interações Planta Microrganismo
LCT	Laboratório de Culturas de Tecidos
LED	Diodo Emissor de Luz
MG	Minas Gerais
OEA	Organização dos Estados Americanos
UFLA	Universidade Federal de Lavras
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

LISTA DE SIGLAS

AN	Ágar Nutriente
AS	Ácido Salicílico
AUX	Auxinas
BA	Benzil-Adenina
BAP	Benzilaminopurina
BOD	Biochemical Oxygen Demand
CA	Camarosa
CAS	Chromium azurol Sulfonato
CMC	Carboximetilcelulose
CN	Caldo nutriente
CPA	Comprimento da Parte Aérea
CR	Comprimento da Raiz
CSAI	Índice de Atividade Solubilizante de Calcita
CV	Cristal Violeta
CZD	Diâmetro da Zona Clara
DAG	Departamento de Agricultura
DC	Cultivares de dia curto
Dc	Diâmetro da Colônia
DF	Diâmetro Foliar
DL	Cultivares de dia longo
FMA	Fungos Micorrízicos Arbusculares
GA	Giberelinas
GA	Giberelinas
HCN	Cianeto de hidrogênio
HDTMA	Brometo de Hexadeciltrimetilamônio
HZ	Diâmetro da Zona do Halo de Solubilização de ZnO
IBA	Ácido Indol Butírico
ID	Cultivares neutras ou indiferentes ao fotoperíodo
IE	Índice Enzimático
IS	Índice de Solubilização
ITS	Internal Transcribed Spacer de fungos
LCT	Laboratório de Culturas de Tecidos
LD	Leaf diameter (Diâmetro foliar)
MS	Murashige & Skoog
MSPA	Massa Seca da Parte Aérea
MSR	Massa Seca da Raiz
MT	Massa Total
OD	Densidade Óptica
ODC	Densidade Óptica de Corte
OG	Oso grande
RDM	Root dry mass (Massa Seca da Raiz)

RL	Root length (Comprimento da Raiz)
rpm	Rotações Por Minuto
SA	San Andreas
TDZ	Tidiazuron
TFC	Conteúdo Total de Flavonoides
TPC	Conteúdo Fenólico Total
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
ZnE	Eficiência de Solubilização de Zn

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE.....	38
1	INTRODUÇÃO GERAL.....	20
2	REFERENCIAL TEÓRICO	22
2.1	Os microrganismos e suas interconexões com as plantas	22
2.2	Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV).....	23
2.3	Mecanismos de promoção de crescimento das BPCV.....	24
2.4	Aspectos gerais da <i>Fragaria ananassa</i> Duch.	26
2.5	Aspectos botânicos do Morangueiro.....	27
2.6	Micropropagação <i>in vitro</i> de <i>Fragaria ananassa</i> Duch.....	28
2.7	Biotização: Interações planta-microrganismos em condições <i>in vitro</i>	29
2.8	O microbioma vegetal	30
	REFERÊNCIAS	32
	SEGUNDA PARTE: ARTIGOS – Redigidos conforme a norma NBR 6022 (ABNT, 2018).....	41
	ARTIGO 1 - Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal na Biotização de Microplantas de Morangueiro	42
1	INTRODUÇÃO.....	43
2	MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1	Materiais vegetais e obtenção de explantes.....	45
2.2	Condições de cultura das cepas bacterianas	46
2.3	Teste de produção de biofilme	47
2.4	Preparação dos inóculos bacterianos.....	48
2.5	Biotização de microplantas de morangueiro	48
2.6	Biotização de microplantas de morangueiro com consórcios bacterianos	48
2.7	Preparação dos inóculos bacterianos para consórcios.....	49
2.8	Análises Fitotécnicas	49
2.9	Extração e quantificação de clorofilas e carotenóides	50
2.10	Obtenção dos extratos hidro-metanólicos	50
2.11	Quantificação do conteúdo fenólico total (TPC)	50
2.12	Quantificação do conteúdo total de flavonóides (TFC)	51
2.13	Análises estatísticas	51
3	RESULTADOS.....	51
3.1	Teste de formação do biofilme.....	51
3.2	Biotização do morangueiro.....	52

3.3	Biotização de morangueiro com consórcios bacterianos.....	55
3.4	Quantificação de clorofila.....	57
3.5	Quantificação do conteúdo total fenólico (TPC)	58
3.6	Quantificação do conteúdo total de flavonóides (TFC)	59
4	DISCUSSÃO	60
5	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS	66
	ARTIGO 2 - Benefícios da biotização e re-inoculação <i>ex vitro</i> com bactérias promotoras de crescimento vegetal em mudas de morangueiro em casa de vegetação	76
1	INTRODUÇÃO	77
2	MATERIAL E MÉTODOS	79
2.1	Material vegetal e local experimental.....	79
2.2	Cepas bacterianas.....	80
2.3	Preparação do inóculo para aos testes de caracterização bioquímica.....	81
2.3.1	Fixação biológica de nitrogênio.....	81
2.3.2	Solubilização de fosfato	81
2.3.3	Solubilização de potássio	82
2.3.4	Solubilização de cálcio	82
2.3.5	Solubilização do zinco	82
2.3.6	Acidificação do Meio de Cultura	83
2.4	Produção de enzimas hidrolíticas	83
2.5	Produção de sideróforos em placa	85
2.5.1	Quantificação da produção de sideróforos em meio líquido	85
2.6	Produção de cianeto de hidrogênio (HCN) em placa	85
2.7	Análises estatísticas	86
2.8	Biotização	86
2.9	Quantificação de clorofilas e carotenóides.....	88
2.10	Obtenção dos extratos hidro-metanólicos para a quantificação de fenóis e flavonoides	89
2.11	Quantificação do conteúdo fenólico total (TPC)	89
2.12	Quantificação do conteúdo total de flavonóides (TFC)	89
2.13	Análises estatísticas	90
3	RESULTADOS.....	90
3.1	Testes de Fixação Biológica de nitrogênio (FBN), solubilização de fosfatos, potássio, cálcio, zinco e acidificação/alcalinização do meio	90

3.2	Produção de enzimas hidrolíticas pelas BPCV	91
3.3	Produção de sideróforos	92
3.3.1	Quantificação da produção de sideróforos	93
3.4	Produção de cianeto de hidrogênio (HCN)	94
3.5	Porcentagem de sobrevivência após a biotização e re-inoculação em condições <i>ex vitro</i>	95
3.6	Cultivar Oso Grande (OG) na casa de vegetação.....	96
3.7	Quantificação de clorofila e carotenóides na cultivar OG.....	98
3.8	Quantificação de flavonóides na cultivar OG.....	100
3.9	Cultivar Camarosa (CA) na casa de vegetação	101
3.10	Quantificação de clorofila na cultivar CA	103
3.11	Quantificação de Fenóis na cultivar Camarosa.....	104
3.12	Quantificação de flavonóides na cultivar CA	104
4	DISCUSSÃO	105
5	CONCLUSÃO	111
	REFERÊNCIAS	112
	ARTIGO 3 - Estudo da comunidade microbiana endofítica em plantas <i>in vitro</i> de morangueiro da cultivar San Andreas e sua resposta à biotização e adaptação às condições <i>ex vitro</i>	124
1	INTRODUÇÃO	125
2	MATERIAL E MÉTODOS	127
2.1	Material vegetal.....	127
2.2	Extração de DNA das gerações <i>in vitro</i> da cultivar San Andreas (SA).....	128
2.2.1	Sequenciamento e PCR.....	128
2.2.2	Reação de Indexação	129
2.2.3	Purificação e Quantificação da Biblioteca NGS.....	129
2.2.4	Análise de bioinformática	130
2.2.5	Análises de dados	130
2.3	Biotização de microplantas da cultivar San Andreas	130
2.4	Transplante e Condições de Casa de Vegetação	132
2.5	Extratos hido-metanólicos para a quantificação de fenóis e flavonoides.....	132
2.5.1	Quantificação do conteúdo fenólico total (TPC)	133
2.5.2	Quantificação do conteúdo total de flavonóides (TFC)	133
2.6	Análises estatísticas	133
3	RESULTADOS.....	134
3.1	Análises da microbiota endofítica de morangueiro em condições <i>in vitro</i> e <i>ex vitro</i>	134

3.2	Índice de riqueza e índice de diversidade.....	135
3.3	Resposta da cultivar SA à biotização individual	140
3.3.1	Quantificação de fenóis e flavonóides <i>in vitro</i>	142
3.4	Adaptação da cultivar San Andreas às condições <i>ex vitro</i>	142
3.4.1	Variáveis fitotécnicas sob condições <i>ex vitro</i> da Cultivar San	143
3.4.2	Quantificação de fenóis em condições <i>ex vitro</i> na cultivar San Andreas.....	145
3.4.3	Quantificação de flavonóides <i>ex vitro</i> na cultivar San Andreas.....	146
4	DISCUSSÃO.....	146
4.1	Microbioma vegetal endofítico na cultura <i>in vitro</i> do morangueiro	146
4.2	Resposta da cultivar SA à biotização individual e em consórcios.....	150
4.3	Resposta da cultivar San Andreas às condições <i>ex vitro</i>	151
5	CONCLUSÃO	152
	REFERÊNCIAS	153
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	160

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

O morangueiro (*Fragaria ananassa* Duch) é uma das frutas mais consumidas mundialmente devido às suas propriedades organolépticas, nutracêuticas e sensoriais, que oferecem diversos benefícios à saúde humana (Bombarely *et al.*, 2010; Kuras; Korbin, 2010; Ulrich; Olbricht, 2016). No Brasil, a área cultivada com morangueiro é de aproximadamente 5.084 hectares, colocando o país na 9ª posição entre os maiores produtores de morangueiro no mundo (Antunes *et al.*, 2023). A produtividade e rendimento do morangueiro são de grande relevância, e se percebe o destaque do desenvolvimento de estudos com foco nesta importante cultura vegetal.

A produção de morangueiro pode ser feita em sistemas fora do solo, em estufas com canteiros cobertos com plástico, em sistemas hidropônicos, ou sistemas semi-hidropônicos. Esses métodos são alternativas ao cultivo convencional em solo, que apresenta maiores desafios fitossanitários, susceptibilidade às condições climáticas e questões ergonômicas (Nichols, 2021). Outra alternativa promissória para o cultivo de morangueiro envolve o uso de ferramentas biotecnológicas, como a micropropagação *in vitro* que permite a obtenção de explantes vegetais viáveis para posterior transplante a condições *ex vitro* (Boxus, 1974; 1999; Miller *et al.*, 1992; El Hamdouni; Lamarti; Badoc, 2001; Mir *et al.*, 2010; Hernández- Soberano; Ruíz-Herrera; Valencia-Cantero, 2020).

A micropropagação *in vitro* representa um caminho promissor para a produção em larga escala, em espaço reduzido e em períodos curtos, além de possibilitar a obtenção de microplantas de alta qualidade e uniformidade genética (Dutra *et al.*, 2012; Khayat, 2012). No entanto, essa técnica requer o uso de reguladores de crescimento vegetal para estimular o desenvolvimento dos explantes, além de preparar a microplantas para as condições *ex vitro*, uma etapa crucial e comumente desafiadora para as microplantas (Chandra *et al.*, 2010, 2022; De Oliveira *et al.*, 2021). Assim, uma alternativa na cultura de tecidos vegetais (CTV) é a biotização, que consiste na co-cultura de microrganismos benéficos com explantes em condições *in vitro* promovendo uma interação benéfica que pode facilitar o crescimento e a modulação fisiológica podendo ajudar na adaptação ao ambiente externo (Del Rosario Espinoza-Mellado *et al.*, 2021; Nowak, 1992,1998; Teraiya; Nirmal; Joshi, 2023). Uma vez que as BPCV podem ter diversos mecanismos de ação incluindo a biofertilização, bioestimulação ou biocontrole (Cavalcanti *et al.*, 2020; Compant *et al.*, 2019; Michavila *et al.*, 2022; Nadal *et al.*, 2022; Sl *et al.*, 2023). Entre as vantagens das Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), destacam-se a produção de fitohormônios, a solubilização de

nutrientes, a produção de enzimas hidrolíticas, sideróforos, Cianeto de hidrogênio (HCN), bem como a formação de biofilmes, todos com grande potencial para aplicações agrícolas (Ferreira; Soares; Soares, 2019). Além disso, o estudo do microbioma endofítico em plantas tem ganhado destaque nas últimas décadas, especialmente em condições de cultivo *in vitro*, onde técnicas de metataxonômica permitem uma análise detalhada da diversidade microbiana associada a essas microplantas (Jansson *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2021). Esta pesquisa foi estruturada em três artigos: o primeiro abordou a biotização, tanto individual quanto em consórcios com BPCV, em microplantas de morangueiro em condições *in vitro* afim de avaliar o impacto da introdução de bactérias promotoras de crescimento vegetal durante o processo de micropropagação, o segundo artigo focou na caracterização bioquímica e fisiológica de dez bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) e seus efeitos em condições *ex vitro* testando os efeitos na adaptação das plantas às condições ambientais externas (*ex vitro*), como solo e clima, após a transferência, e por último, o terceiro artigo investigou a composição e a dinâmica do microbioma endofítico ao longo das gerações (G0, G5, G10) do cultivo *in vitro* da cultivar San Andreas (SA), com o interesse de realizar a caracterização da comunidade microbiana endofítica presente nas plantas de morangueiro cultivadas em condições de laboratório (*in vitro*).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Os microrganismos e suas interconexões com as plantas

A relação entre plantas e microrganismos apresenta benefícios importantes para a agricultura, pois as interações e perfis metabólicos resultantes podem influenciar diretamente o crescimento vegetal, a resistência a doenças e a tolerância a estresses bióticos e abióticos. Compreender essas interconexões é essencial para explorar as vantagens do microbioma vegetal, que envolve complexas interações entre diversos microrganismos que colonizam as plantas e seus nichos ecológicos (Berendsen; Pieterse; Bakker, 2012; Phour *et al.* 2020; Santos; Olivares, 2021). O termo microbioma refere-se ao conjunto de microrganismos presentes em um nicho ambiental específico em um dado tempo (Bhatt *et al.*, 2020; Chanway, 1996; Compant *et al.*, 2019; Hallmann *et al.*, 2011).

O solo abriga uma grande diversidade de microrganismos que interagem com as plantas, atraídos principalmente pela liberação de exsudatos radiculares, que influenciam a modulação da colonização da rizosfera e endosfera vegetal (Bais *et al.*, 2006). Esse processo, permite a seleção de microrganismos benéficos, que contribuem para a formação das comunidades endofíticas das plantas (Reinhold-Hurek *et al.*, 2012, 2015; Singh; Liu; Trivedi, 2020).

A rizosfera, região ao redor da raízes, é caracterizada por uma abundante diversidade microbiana, influenciada pela deposição de mucilagem vegetal e exsudatos radiculares, os quais facilitam interações com microrganismos que podem contribuir no crescimento vegetal (Berendsen; Pieterse; Bakker, 2012; Gocke *et al.*, 2017; Kent; Triplett, 2002; Lareen; Burton; Schäfer, 2016). A endosfera, por sua vez, é composta pelos microrganismos que habitam os tecidos vegetais internos (Gaiero *et al.*, 2013; Kaul; Sharma; K. Dhar, 2016; Wani *et al.*, 2015), e são o resultado de ampla gama de interações (Turner; James; Poole, 2013; Chanway, 1996; Hallmann *et al.*, 1997; Hardoim; Van Overbeek; Elsas, 2008). Além disso, a filosfera, que é estabelecida nas superfícies aéreas das plantas, com menos nutrientes e frequentes variações de temperatura, radiação e umidade (Lindow *et al.*, 2003; Vorholt, 2012).

A colonização microbiana das plantas é influenciada por diversos fatores, composição do solo, o genótipo da planta, tipo de tecido, condições bióticas e abióticas, entre outros fatores, vão determinar a montagem do microbioma vegetal. No entanto, diferentes grupos microbianos conseguem se relacionar positivamente com a planta podendo desempenhar

papeis cruciais em seu desenvolvimento, crescimento, aptidão e diversificação (Reinhold-Hurek; Hurek, 2011; Singh; Gill; Tuteja, 2011; Iqbal; Nelson; Mcculley, 2012; Wani *et al.*, 2015; Hardoim *et al.*, 2015). As BPCVs, por exemplo, facilitam a aquisição de nutrientes, podem produzir fitohormônios que podem ter influência na promoção de crescimento vegetal, além de poder atuar em na mediação dos estresses abióticos e bióticos (Schlaeppli; Bulgarelli, 2015; Glick *et al.*, 2007, 2012, 2014). Assim, explorar as interações planta-microrganismo-solo é fundamental para entender as funções ecológicas e a dinâmica das comunidades microbianas associadas às plantas (Berg, 2009; Jansson; Baker, 2016; Compant *et al.*, 2019). Este estudo busca compreender algumas dessas associações, especialmente o papel das BPCV e suas interações com microplantas de morangueiro em cultura de tecidos vegetais, por meio da biotização, bem como a resposta em condições *ex vitro*, e o estudo do microbioma endofítico presente ao longo das micropropagações *in vitro* da cultivar San Andreas (SA).

2.2 Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV)

As BPCV são alternativas promissoras para a agricultura sustentável, uma vez que suas interações com as plantas podem desempenhar funções diretas e indiretas que beneficiam o desenvolvimento vegetal (Kloepper, 1992; Singh; Abhilash; Singh; Gupta, 2018; Compant *et al.*, 2019; Ali; Glick, 2019). Entre as funções diretas das BPCV s estão o estímulo ao crescimento da planta, a disponibilização de nutrientes, fixação biológica do nitrogênio, a produção de fitohormônios como auxinas e giberelinas, que estimulam o desenvolvimento radicular e a formação de brotos. Já os mecanismos indiretos incluem a produção de sideróforos, enzimas hidrolíticas, cianeto de hidrogênio (HCN), antibióticos, e enzimas como a 1-aminociclopropano-1-carboxílico deaminase (ACCd), além de influenciar a indução de resistência sistêmica e atuar na competição direta com fitopatógenos (Glick, 2012, 2014; Kang *et al.*, 2010; Shrivastava; Kumar, 2015; Bashan; Holguin, 2004; Esitken *et al.*, 2010; Esitken; Karlidag; Sahin, 2005; Glick, 2012, 2014; Khabbaz *et al.*, 2019; O'connell, 1992).

Diversos gêneros bacterianos destacam-se na promoção do crescimento vegetal. O gênero *Azospirillum*, por exemplo, é amplamente utilizado como biofertilizante, pois participa diretamente da fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção de fitohormônios, além de poder agir como agente de biocontrole (De Andrade *et al.*, 2019; Pedraza *et al.*, 2020). Outros gêneros também tem demonstrado potencial, como a bactéria *Sinorhizobium fredii*, relatada na produção do AIA, na solubilização de fosfato, e com a

capacidade de produzir sideróforos (Arya et al., 2020). e *Bradyrhizobium japonicum*, também tem sido citado como produtor de AIA (De Andrade et al., 2019), e giberelinas (Morrone et al., 2009). Além disso, espécies como *Rhizobium leucaenae*, *Rhizobium tropici* têm sido citados por estabelecer associações com plantas ajudando no crescimento vegetal, principalmente pela disponibilização de nutrientes (Picazevicz; Kusdra; Moreno, 2017).

O gênero *Bacillus*, também desempenha um papel significativo na promoção do crescimento vegetal. Espécies como *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus amyloliquefaciens*, são amplamente citados por estimularem o crescimento das plantas, aumentar a produção de metabólitos secundários e fitohormônios vegetais, produzir sideróforos, e contribuir para o controle biológico, e a tolerância aos estresses abióticos (Berg, 2009; Chandra; Chandra; Tripathi, 2021; Reed; Click, 2013; Tiwari et al., 2017; Khabbaz et al., 2019; Nascimento et al., 2020).

2.3 Mecanismos de promoção de crescimento das BPCV

O nitrogênio (N), é um elemento fundamental para as plantas, já que é necessário para a sínteses de proteínas, ácidos nucleicos, nucleotídeos, coenzimas, entre outros; e os microrganismos são essenciais para sua disponibilização, já que a maior parte do elemento não é assimilável, e, graças às bactérias fixadoras de nitrogênio, nitrificantes e amonificantes, ele pode ser disponibilizado para raízes das plantas (Sánchez; Ospina; Montoya, 2017). O fósforo (P), após do nitrogênio é o segundo principal macronutriente limitante para o desenvolvimento das funções biológicas das plantas ajudando na formação de fosfolipídios, coenzimas, nas estruturas de ADN, ARN, no ATP, entre outros, embora, os fosfatos sejam limitantes no solo devido à sua baixa solubilidade, a qual dependerá do pH do solo, no entanto, os microrganismos solubilizadores de fosfatos são essenciais para melhorar a concentração e disponibilização para as plantas (Lelapalli et al., 2021; Sánchez; Ospina; Montoya, 2017).

O potássio (K) também é um macronutriente essencial está presente no solo em aproximadamente 1% a 2% , o restante se encontra ligado a outros minerais tendo seus depósitos principalmente nas rochas, mas de formas insolúveis, assim a deficiência de K é uma das principais restrições na produção agrícola; portanto, os microrganismos presentes no solo podem ajudar na solubilização e disponibilização do K para as plantas mediante a liberação de ácidos orgânicos e inorgânicos (Aleksandrov; Blagodyr"; Il"ev, 1967; Boubekri et

al., 2021; Kumar Meena *et al.*, 2015; Meena *et al.*, 2016; Rogers; Bennett, 2004; Soumare; Sarr; Diédhiou, 2023).

O cálcio (Ca) é um macronutriente essencial para as plantas, desempenhando funções estruturais e atuando como mensageiro secundário na sinalização fisiológica e hormonal. Ele é absorvido pelas raízes e translocado para a parte aérea via xilema, dessa forma, os microrganismos presentes no solo facilitam sua solubilização e disponibilidade para as plantas (White; Broadley, 2003; Supanjani *et al.*, 2006). O zinco é um micronutriente necessário em pequenas quantidades para o crescimento e desenvolvimento vegetal, sendo fundamental para a síntese de coenzimas atuando como regulador e catalisador em várias reações enzimáticas, sendo sua deficiência um fator que reduz significativamente a produtividade agrícola (Kamran *et al.*, 2017).

As BPCVs também produzem enzimas hidrolíticas, que desempenham várias funções multifatoriais, como a decomposição de matéria orgânica, na circulação de nutrientes, nas zonas rizosféricas, e no controle biológico, contribuindo para um manejo sustentável de doenças (Jadhav; Shaikh; Sayyed, 2017; Reddy *et al.*, 2022; Desire *et al.*, 2014). A produção de fitohormônios como auxinas e giberelinas pelas BPCV também é importante para o desenvolvimento vegetal. A auxina, especialmente o ácido indol-3-acético (AIA) (Grossmann, 2010; Halliday; Martínez-García; Josse, 2009), têm funções na divisão celular, o alongamento, o desenvolvimento do fruto, a indução inicial das raízes (Phillips *et al.*, 2011; Spaepen; Vanderleyden, 2011).

O AIA produzido em concentrações adequadas facilita a formação de raízes laterais, promovendo um sistema radicular mais denso e eficiente, o que melhora o estabelecimento e a sobrevivência das plantas nas condições *ex vitro* (Davies, 2013; Duca *et al.*, 2014). Como por exemplo, há relatos da promoção de crescimento do sorgo através do uso da cepa *Azospirillum brasilense* SM pela produção de AIA (Malhotra; Srivastava, 2008, 2009). As giberelinas (GA), também desempenham papel essencial ao estimular o alongamento e a divisão celular (Khan *et al.*, 2014; Lang, 1956; Radley, 1956), sendo registradas aproximadamente 136 giberelinas produzidas por bactérias, fungos e plantas, embora, algumas delas são as mais descritas como as GA₁, GA₃, GA₄ e GA₇. Essas moléculas são pequenas e pertencem aos ácidos carboxílicos diterpenoides tetracíclicos, sendo fundamentais para o crescimento vegetal (Davies, 2013; Leitão; Enguita, 2016). Além disso, a enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminase (ACCd), presente em algumas BPCV, ajuda a reduzir o etileno nas plantas, diminuindo seu impacto negativo no crescimento sob

estresse, melhorando assim a resiliência das plantas em condições adversas (Honma; Shimomura, 1978; Glick; Penrose; Li, 1998; Glick *et al.*, 2007; Glick, 2012, 2014).

As BPCVs também produzem sideróforos, moléculas orgânicas de baixo peso molecular que quelam o ferro, facilitando sua disponibilidade em condições limitantes deste elemento, além de se unirem a outros elementos como o Mo, Mn, Co e Ni e ajudando a sua disponibilização (Bellenger *et al.*, 2008; Braud *et al.*, 2009a, 2009b). Contudo, algumas BPCV possuem a capacidade de produção de Cianeto de hidrogênio (HCN) que é um metabólito secundário volátil produzido por alguns microrganismos da rizosfera mediado pelo precursor, a glicina, liberada pelos exsudados das raízes. O HCN pode atuar principalmente na mediação de alguns fitopatógenos (Bakker; Schippers, 1987; Flury *et al.*, 2016; Re, 2015; Sehwat; Sindhu; Glick, 2022). Por fim, as BPCVs podem formar biofilmes microbianos, que facilitam a adesão bacteriana às raízes, ajudam a aumentar a resistência a condições ambientais adversas, proteger contra patógenos, melhorar a aquisição de nutrientes liberados no ambiente da planta e facilitar as interações benéficas entre bactérias e plantas (Ajijah *et al.*, 2023).

2.4 Aspectos gerais da *Fragaria ananassa* Duch.

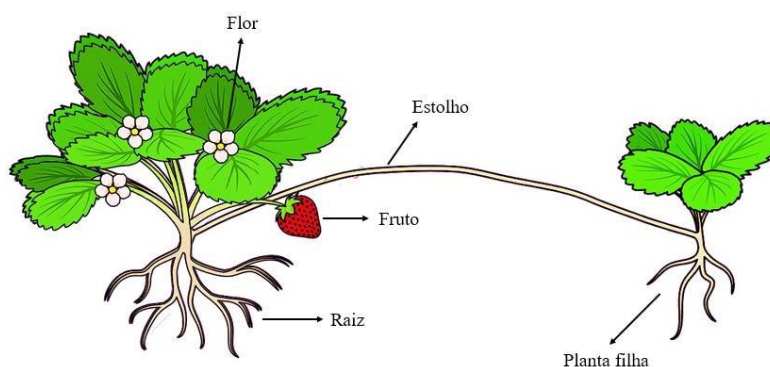
O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) pertence à família Rosaceae, inclui diversas cultivares que se adaptam a diferentes condições de cultivo e mercado (Byrne, 2012; Samtani *et al.*, 2019; Queiroz Voltan *et al.*, 1996; Chandler *et al.*, 2012). O morangueiro é conhecido por seu alto teor de compostos fenólicos, flavonoides, vitamina C, minerais, antocianinas, que conferem propriedades antioxidantes e benefícios à saúde, incluindo atividades anti-inflamatórias, antiobesidade e antidiabéticas (Lakshmi; Sharma; Singh, 2021; Nemzer *et al.*, 2020).

No cenário global, a China lidera a produção de morangueiro, com 129.046 hectares plantados e 3.389.620 toneladas produzidas. No Brasil, a produção atingiu 197.000 toneladas em uma área de 5.084 hectares em 2023 (Antunes *et al.*, 2023).

2.5 Aspectos botânicos do Morangueiro

O morangueiro é uma planta herbácea e estolonífera e rasteira, contém folhas trifoliadas que se originam de forma helicoidal. Possui um caule semi-subterrâneo e um sistema radicular fibroso com raízes primárias e secundárias, responsáveis pela absorção da água e nutrientes, além de armazenar substâncias de reservas (Antunes; Hoffmann; Luis Eduardo Correa Antunes, 2013; Bortolozzo *et al.*, 2007). Seu caule, é um rizoma estolhoso curto, que se ramifica para formar a “coroa” onde emergem as inflorescências, estolões, coroas ramificadas e raízes adventícias, os pecíolos têm folhas trifoliadas que na base tem duas estípulas de proteção, e onde se encontram os brotos que podem originar novos estolões ou coroas. A inflorescência terminal se desenvolve em uma flor (PALHA, 2005; SCHWENGBER *et al.*, 2016).

Figura 1 - Planta do morangueiro



Partes de uma planta de morango. Mostra a flor, o fruto (morango), o estolho (caule que liga as plantas), a raiz e a planta-filha, que é formada pela reprodução da planta-mãe.

Fonte: Da autora (2024).

A floração e frutificação do morangueiro são influenciadas por fatores como fotoperíodo e temperatura, além das características específicas de cada cultivar. As cultivares são classificadas em plantas de dia curto (DC), dia longo (DL) ou neutras em relação ao fotoperíodo (ID), sendo que temperaturas acima de 30°C podem impactar negativamente a produção (Palha, 2005; Schwengber *et al.*, 2016). No Brasil, a produção de morangueiro ocorre em vários estados, com a escolha das cultivares variando conforme a adaptabilidade climática local (Santos, 1993; Antunes; Carvalho; Santos, 2011).

Nesta pesquisa, foram selecionadas as cultivares Oso grande, Camarosa e San Andreas, todas as três são originárias da Universidade da Califórnia. A cultivar Oso grande,

originada em 1987, é de dia curto, possui frutos grandes, firmes e doces, com baixa acidez, sendo bem aceita no mercado. A cultivar Camarosa, lançada em 1992, também é dia curto e apresenta frutos firmes e ligeiramente ácidos, com coloração intensa. A cultivar San Andreas, lançada em 2008 e descendente da cultivar Albion, é de dia neutro, produz frutos vermelhos, firmes e com maior vigor em comparação à Albion (Schwengber *et al.*, 2016). Essas características fazem do morangueiro uma cultura de grande interesse global (Samtani *et al.*, 2019).

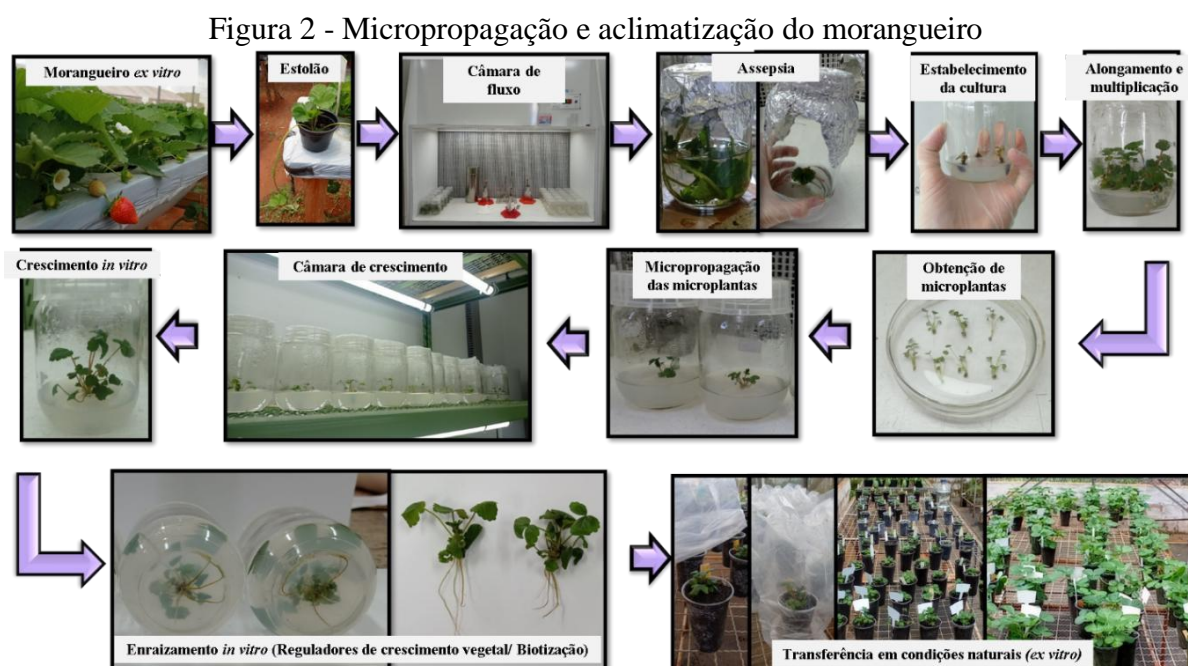
2.6 Micropropagação *in vitro* de *Fragaria ananassa* Duch.

A aplicação de tecnologias *in vitro* representa um avanço significativo na biotecnologia vegetal, pois permite a multiplicação de células, tecidos, órgãos ou partes de uma planta em condições nutricionais controladas sob iluminação, temperatura e umidade ajustadas (Carvalho, 1996; Carvalho; Silva; Medeiros, 2006; Debnath, 2007; Read; Preece, 2014). Para garantir o sucesso, é essencial controlar rigorosamente a assepsia dos explante, o meio de cultura, o uso de fitorreguladores de crescimento vegetal, bem como parâmetros de temperatura, luz, pH, umidade, entre outras características; o manejo adequado desses fatores refletirá na manutenção das propriedades de interesse da planta em estudo (Haque *et al.*, 2022; Read; Preece, 2014).

No caso do morangueiro, a micropropagação foi inicialmente descrita por (Boxus, 1974), utilizando a multiplicação de meristemas a partir de gemas axilares. Desde então, diversos pesquisadores têm investigado combinações de fitorreguladores, tipos de explante, e condições otimizadas para maximizar a produção de brotos com menor, minimizando variações somaclonais (Bhatt, 2000; Hamdouni; Lamarti; Badoc, 1999; Hanhineva; Kokko; Kärenlampi, 2005; Nehra; Stushnoff; Kartha, 1990; Omar *et al.*, 2013; Vine, 1968). A micropropagação permite a obtenção de microplantas completas que podem ser originadas de tecidos de botões pré-existent por meio de proliferação de brotos, seguindo a morfogênese de brotos por meio de plantas adventícias (Debnath, 2007). Além disso, também pode ser feita a partir de segmentos nodais, em meio suplementado com reguladores de crescimento como Benzil-Adenina (BA) e ácido indol-3-butírico (IBA).

Estudos mostraram que a combinação de 0.5 mg L⁻¹ BA e 0.1 mg L⁻¹ IBA em meio MS é eficaz para a regeneração de brotos (Mir, 2010). Além disso, o cultivo de meristemas em meio MS suplementado com os mesmos reguladores, tiveram um aumento no número de brotos (Rattanpal; Gill; Sangwan, 2011). Outras pesquisas, relatam protocolos para indução de

calos em meio MS suplementado com diferentes concentrações e combinações de reguladores, permitindo regeneração de brotos e enraizamento com auxina antes do transplante para condições *ex vitro* (KARIM *et al.*, 2015). As etapas da micropropagação são apresentadas na figura 2, onde estão ilustradas as fases *in vitro* da micropropagação do morangueiro.



Processo de micropropagação *in vitro* de microplantas de morangueiro, abrangendo desde o estabelecimento do cultivo até a fase de aclimação *ex vitro*.

Fonte: Da autora (2024).

2.7 Biotização: Interações planta-microrganismos em condições *in vitro*

A biotização refere-se à co-cultura *in vitro* de explantes de tecido vegetal ou plântulas, com microrganismos benéficos, permitindo investigar as respostas dos propágulos a modificações metabólicas e seu desenvolvimento. Dentre as abordagens de biotização, destaca-se o uso de BPCVs, e de microrganismos endofíticos que se manifestam durante a micropropagação (Del Rosario Espinoza-Mellado *et al.*, 2021). As respostas das microplantas à biotização tem sido documentada em algumas espécies vegetais, por exemplo, em *Cattleya walkeriana*, a biotização melhorou o desenvolvimento das plantas e possibilitou a produção de metabólitos secundários (Andrade *et al.*, 2023). Em outro estudo, o uso de bactérias endofíticas na biotização de *Pyrus communis*, aumentou a produção de fitohormônios vegetais, (Nadal *et al.*, 2022).

Outros estudos descrevem os benefícios dos microrganismos endofíticos no auxílio do balanço osmótico, a absorção de nutrientes, a proteção contra patógenos e aclimatização das plantas, podendo resultar em maior rendimento produção de biomassa (Dias *et al.*, 2009; Esposito-Polesi, 2020). Além disso, destaca-se o interesse nestes microrganismos para a obtenção de compostos bioativos em plantas cultivadas *in vitro*, configurando-se como uma ferramenta promissória na biotecnologia vegetal (Beraldo-Borrazzo *et al.*, 2021).

2.8 O microbioma vegetal

O microbioma vegetal é constituído por diversos microrganismos que colonizam as plantas, formando uma rede de interações ecológicas complexas (Berendsen; Pieterse; Bakker, 2012; Simmons *et al.*, 2018; FIGUEIREDO; LOPES, 2021). Esse termo se refere à coleção de microrganismos presentes em um nicho ambiental específico em um determinado momento (Chanway, 1996; Hallmann *et al.*, 1997; COMPANT *et al.*, 2019; BHATT *et al.*, 2020). O solo é uma importante fonte de microrganismos para as plantas, e elas recrutam microrganismos benéficos, que colonizam inicialmente a rizosfera seguida pela endosfera. Durante esses processos, ocorre uma seleção para a montagem de comunidades endofíticas, assim nesses dois compartimentos, os microrganismos que provocam fortes respostas de defesa da planta ou que não possuem as características de fixação ou penetração nos tecidos da raiz são impedidos de entrar na endosfera, enquanto aqueles que trazem benefícios à planta podem ingressar. Fatores bióticos e abióticos, como condições do solo, dispersão aérea e visitas de insetos, contribuem para a montagem do microbioma vegetal (Singh; Liu; Trivedi, 2019), podendo desempenhar um papel importante ao poder atuar na absorção de nutrientes do solo, na adaptação a estresses abióticos e bióticos, e na promoção de crescimento vegetal auxiliando as plantas na adaptação ao seu entorno (Schlaeppli; Bulgarelli, 2015). Atualmente, essa relação planta-microrganismos pode ser estudada por meio das tecnologias multi-omics permitindo avaliar as diversas associações das comunidades microbianas presentes, ajudando a compreender sua função ecológica, a estrutura, e a dinâmica que as modulam (Lederberg; Mccray, 2001; Berg *et al.*, 2009, 2017, 2020; Jansson; Baker, 2016; Compant, *et al* 2019).

Assim, os endófitos são classificados como aqueles microrganismos que vivem dentro dos tecidos internos da planta, durante parte ou todo o ciclo de vida, sem causar doenças, e formam diversas comunidades microbianas (Chanway, 1996; Hallmann *et al* 1997; Hardoim *et al.* 2008). A colonização endofítica é influenciada por muitas variáveis como o tipo de tecido, o genótipo da planta, o táxon microbiano, bem como o tipo de cepa, as condições

ambientais bióticas e abióticas presentes, e podem desempenhar papéis cruciais no desenvolvimento, crescimento, aptidão e diversificação das plantas, indicando um forte gradiente seletivo atuando ao longo do desenvolvimento vegetal (Reinhold-Hurek; Hurek, 2011; Singh *et al.*, 2011; Iqbal *et al.*, 2013; Wani *et al.*, 2015; Hardoim *et al.*, 2015).

REFERÊNCIAS

- ALEKSANDROV, V G.; BLAGODYR, R N.; Ilev I P. 1967. Liberation of phosphoric acid from apatite by silicate bacteria. **Mikrobiol Zhurnal** (Kiev). 29: 111–114.
- ALI, S.; GLICK, BR. Plant bacterial interactions in management of plant growth under abiotic stresses. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**, 21–45. 2019. doi: 10.1016 / b978-0-12-818258-1.00002-9
- ANDRADE, G. et al. Plant-endophytic bacteria interactions associated with root and leaf microbiomes of *Cattleya walkeriana* and their effect on plant growth. **Scientia Horticulturae**, v. 309, p. 111656, 1 fev. 2023.
- ANTUNES, L. E. C. et al. **Morangueiros: os desafios da produção brasileira**. 2023.
- ANTUNES, L. E. C.; CARVALHO, G. L.; SANTOS, A. M. DOS. **A cultura do morangueiro**. 2011.
- ARYA, R. et al. Fertilizer adaptive bacteria *Acidovorax valerianellae* and *Sinorhizobium fredii* in integrated nutrient management of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.). **South African Journal of Botany**, Current and Future Directions in Endophyte Research. v. 134, p. 84–90, 1 nov. 2020.
- AJIJAH, N.; FIODOR, A.; PANDEY, A. K.; RANA, A.; PRANAW, K. Bactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPB) com capacidade de formação de biofilme: um agente multifacetado para a agricultura sustentável. **Diversity**, v. 15, p. 112, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/d15010112>.
- BAKKER, A. W.; SCHIPPERS, B. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* SPP-mediated plant growth-stimulation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, n. 4, p. 451–457, 1 jan. 1987.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 8, p. 521–577, ago. 2004.
- BELLENGER, J. P. et al. Uptake of molybdenum and vanadium by a nitrogen-fixing soil bacterium using siderophores. **Nature Geoscience**, v. 1, n. 4, p. 243–246, abr. 2008.
- BERALDO-BORRAZZO, J. et al. Communities of endophytic bacteria from *Cereus peruvianus* Mill. (*Cactaceae*) plants obtained from seeds and from *in vitro*-regenerated somaclone. **South African Journal of Botany**, v. 142, p. 335–343, 1 nov. 2021.
- BERENDSEN, R. L.; PIETERSE, C. M.; BAKKER, P. A. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends Plant Sci**. Aug;17(8):478-86. 2012. doi: 10.1016/j.tplants.04.001. Epub 2012 May 5. PMID: 22564542. 2012.

BERG G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Appl Microbiol Biotechnol.** Aug;84(1):11-8. 2009. doi: 10.1007/s00253-009-2092-7. Epub 2009 Jul 1. PMID: 19568745.

BERG, G. et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. **Microbiome**, v. 8, n. 1, p. 103, 30 jun. 2020.

BERG, G. et al. Plant microbial diversity is suggested as the key to future biocontrol and health trends. **FEMS microbiology ecology**, v. 93, n. 5, 1 maio 2017.

BHATT, I. Micropropagation of Indian Wild Strawberry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 1 jan. 2000.

BHATT, P. et al. Understanding Phytomicrobiome: A Potential Reservoir for Better Crop Management. **Sustainability**, v. 12, 6 jul. 2020.

BORTOLOZZO, A. R. et al. **Produção de morangueiros no sistema semihidropônico.** 2007a.

BOUBEKRI, K. et al. The Screening of Potassium- and Phosphate-Solubilizing *Actinobacteria* and the Assessment of Their Ability to Promote Wheat Growth Parameters. **Microorganisms**, v. 9, n. 3, p. 470, 25 fev. 2021.

BRAUD, A. et al. Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacteria. **Chemosphere**, v. 74, n. 2, p. 280–286, jan. 2009a.

BRAUD, A. et al. New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine-iron uptake pathway. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 1079–1091, maio 2009b.

BYRNE, D. H. Trends in Fruit Breeding. Em: BADENES, M. L.; BYRNE, D. H. (Eds.). **Fruit Breeding.** Handbook of Plant Breeding. Boston, MA: Springer US, 2012. p. 3–36.

CARVALHO, J. M. F. C. **Aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro* en la multiplicación y mejora del algodón (*Gossypium hirsutum* L.).** Universidad Politécnica de Madrid, 1996.

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. DE A.; MEDEIROS, M. J. L. E. **Fatores inerentes à micropropagação.** 2006.

CHANDLER, C. K. et al. Strawberry. Em: BADENES, M. L.; BYRNE, D. H. (Eds.). **Fruit Breeding.** Handbook of Plant Breeding. Boston, MA: Springer US, 2012. p. 305–325.

CHANDRA, A.; CHANDRA, P.; TRIPATHI, P. Whole genome sequence insight of two plant growth-promoting bacteria (*B. subtilis* BS87 and *B. megaterium* BM89) isolated and characterized from sugarcane rhizosphere depicting better crop yield potentiality. **Microbiological Research**, v. 247, p. 126733, jun. 2021.

CHANWAY, C. Endophytes: They're not just fungi! **Canadian Journal of Botany**, v. 74, p. 321–322, 1 fev. 1996.

COMPANT, S.; SAMAD, A.; FAIST, H.; SESSITSCH, A. A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. **Journal of Advanced Research**, v. 19, p. 29–37, 2019.

DAVIES, P. J. **Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology**. Springer Science & Business Media, 2013.

DE ANDRADE, F. M. et al. Beneficial effects of inoculation of growth-promoting bacteria in strawberry. **Microbiological Research**, v. 223–225, p. 120–128, 2019.

DEBNATH, S. C. Strawberry Culture *In Vitro*: Applications in Genetic Transformation and Biotechnology. **Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 1-12, 2007.

DEL ROSARIO ESPINOZA-MELLADO, M. et al. Chapter 3 - Biotization and *in vitro* plant cell cultures: plant endophyte strategy in response to heavy metals knowledge in assisted phytoremediation. Em: KUMAR, A. et al. (Eds.). **Microbe Mediated Remediation of Environmental Contaminants**. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. [s.l.] Woodhead Publishing, 2021. p. 27–36.

DESIRE, M. H. et al. Enzymes and qualitative phytochemical screening of endophytic fungi isolated from *Lantana camara* Linn. Leaves. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, v. 2, n. 6, p. 001–006, 27 dez. 2014.

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

EL HAMDOUNI, E. M.; LAMARTI, A.; BADOUC, A. *In vitro* germination of the achenes of Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) cvs Chandler[®] et Tudla[®]. **Bulletin-Societe de Pharmacie de Bordeaux**, v. 140, n. 1/4, p. 31–42, 2001.

ESITKEN, A.; KARLIDAG, H.; SAHIN, F. Potential use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in organic apricot production. **International Conference on Environmentally Friendly Fruit Growing**. Tartu, Estonia, v. 2005, p. 90–97, 1 jan. 2005.

ESPOSITO-POLESI, N. Contaminação versus manifestação endofítica: implicações no cultivo *in vitro* de plantas. **Rodriguésia**, v. 71, 1 jan. 2020.

FIGUEIREDO SANTOS, LIDIAN.; LOPES OLIVARES, FABIO. Plant microbiome structure and benefits for sustainable agriculture, **Current Plant Biology**, Volume 26, 2021. 100198, ISSN 2214-6628.

FLURY, P. et al. Insect pathogenicity in plant-beneficial pseudomonads: phylogenetic distribution and comparative genomics. **The ISME journal**, v. 10, n. 10, p. 2527–2542, out. 2016.

GAIERO, JR.; MCCALL, CA.; THOMPSON, KA.; DAY, NJ.; BEST, AS.; DUNFIELD, KE. Inside the root microbiome: Bacterial root endophytes and plant growth promotion. **American Journal of Botany**, 100 (9), 1738–1750. 2013. doi: 10.3732 / ajb.1200572

GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the

world. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 30–39, 20 jan. 2014.

GLICK, B. R. et al. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, n. 3, p. 329–339, 1 nov. 2007.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 963401, 2012.

GLICK, B. R.; PENROSE, D. M.; LI, J. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. **Journal of Theoretical Biology**, v. 190, n. 1, p. 63–68, 7 jan. 1998.

GLICK, BERNARD R. Plant Growth-Promoting Bacteria: **Mechanisms and Applications**, **Scientifica**, vol. 2012a, Artigo ID 963401, 15 páginas, 2012.
<https://doi.org/10.6064/2012/963401>

GOCKE, M. I. et al. Disentangling interactions between microbial communities and roots in deep subsoil. **Science of The Total Environment**, v. 575, p. 135–145, 1 jan. 2017.

GROSSMANN, K. Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. **Pest Management Science**, v. 66, n. 2, p. 113–120, fev. 2010.

HALLIDAY, K. J.; MARTÍNEZ-GARCÍA, J. F.; JOSSE, E.-M. Integration of Light and Auxin Signaling. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 6, p. a001586, dez. 2009.

HALLMANN J, QUADT-HALLMANN A, MAHAFFEE WF, KLOEPPER JW. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Can J Microbiol** 43:895–914.
<http://dx.doi.org/10.1139/m97-131>.

HALLMANN, J. et al. Endophytic Bacteria in Agricultural Crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 895–914, 10 fev. 1997.

HANHINEVA, K.; KOKKO, H.; KÄRENLAMPI, S. Shoot Regeneration from Leaf Explants of Five Strawberry (*Fragaria x ananassa*) Cultivars in Temporary Immersion Bioreactor System. **In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant**, v. 41, n. 6, p. 826–831, 2005.

HAQUE, M. I. et al. Chapter 1 - A general introduction to and background of plant tissue culture: Past, current, and future aspects. Em: CHANDRA RAI, A. et al. (Eds.). **Advances in Plant Tissue Culture**. Academic Press, 2022a. p. 1–30.

HARDOIM, P. R. et al. The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR**, v. 79, n. 3, p. 293–320, 1 jul. 2015.

HARDOIM, P.R.; VAN, OVERBEEK, L.S.; BERG, G.; PIRTTILÄ, A.M.; COMPANT, S.; CAMPISANO, A.; DÖRING, M.; SESSITSCH, A. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 79, 293–320. 2015. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00050-14>.

- HARDOIM, PR.; VAN, OVERBEEK, LS.; VAN, ELSAS, JD. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology** 16: 463-471. 2008.
- HOFFMANN, A.; ANTUNES, L. E. C.; LUIS EDUARDO CORREA ANTUNES, C. A. H. **Pequenas frutas: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. 2012.
- HONMA, M.; SHIMOMURA, T. Metabolism of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 42, n. 10, p. 1825–1831, 1 out. 1978.
- IQBAL, J.; NELSON, JÁ.; MCCULLEY, RL. Fungal endophyte presence and genotype affect plant diversity and soil-to-atmosphere trace gas fluxes. **Plant Soils** 364:15–27. 2013.
- JADHAV, H. P.; SHAIKH, S. S.; SAYYED, R. Z. Role of Hydrolytic Enzymes of Rhizoflora in Biocontrol of Fungal Phytopathogens: An Overview. Em: MEHNAZ, S. (Ed.). **Rhizotrophs: Plant Growth Promotion to Bioremediation**. Microorganismos para Sustentabilidade. Singapore: Springer, 2017. p. 183–203.
- JANSSON, J. K.; BAKER, E. S. A multi-omic future for microbiome studies. **Nature Microbiology**, v. 1, n. 5, p. 1–3, 26 abr. 2016.
- KAMRAN, S. et al. Contribution of Zinc Solubilizing Bacteria in Growth Promotion and Zinc Content of Wheat. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.
- KANG, B. G. et al. Use of plant growth-promoting rhizobacteria to control stress responses of plant roots. **Plant Biotechnology Reports**, v. 4, n. 3, p. 179–183, 1 jul. 2010.
- KARIM, R. et al. Varietal Improvement of Strawberry (*Fragaria x ananassa* Dutch.) Through Somaclonal Variation Using *In Vitro* Techniques. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 17, p. 977–986, 1 jul. 2015.
- KAUL, S.; SHARMA, T.; K. DHAR, M. “Omics” Tools for Better Understanding the Plant–Endophyte Interactions. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 955, 29 jun. 2016.
- KENT, A. D.; TRIPLETT, E. W. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 211–236, 2002.
- KHABBAZ, S. E. et al. Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) - A Versatile Tool for Plant Health Management. **Canadian Journal of Pesticides & Pest Management**, v. 1, p. 1–25, 30 ago. 2019.
- KHABBAZ, S.E.; LADHALAKSHMI, D.; BABU, M.; KANDAN, A.; RAMAMOORTHY, V.; SARAVANAKUMAR, D.; AL-MUGHRABI, T.; KANDASAMY, S. Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) A Versatile Tool for Plant Health Management. **Can. J. Pestic. Pest Manag.** 1(1), 1–25; 2019. doi: 10.34195/can.j.ppm.2019.05.001.
- KHAN, A. L. et al. Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. **Journal of Microbiology**, v. 52, n. 8, p. 689–695, 1 ago. 2014.
- KLOPPER, J. W. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. **Soil**

microbial ecology: applications in agricultural and environmental management., p. 255–274, 1992.

KUMAR MEENA, R. et al. Isolation of low temperature surviving plant growth – promoting rhizobacteria (PGPR) from pea (*Pisum sativum* L.) and documentation of their plant growth promoting traits. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 806–811, 1 out. 2015.

LAKSHMI, M. A.; SHARMA, V.; SINGH, R. D. Medicinal properties of strawberry: a short review. **Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology**, p. 99–105, 3 maio 2021.

LANG, A. Induction of flower formation in biennial hyoscyamus by treatment with gibberellin. **Naturwissenschaften**, v. 43, n. 12, p. 284–285, 1 jan. 1956.

LAREEN, A.; BURTON, F.; SCHÄFER, P. Plant root-microbe communication in shaping root microbiomes. **Plant Molecular Biology**, v. 90, n. 6, p. 575–587, abr. 2016.

LEDERBERG, B. J.; McCRAY, A.T. 'Ome Sweet 'Omics - A Genealogical Treasury of Words. **Genealogical Treasury of Words. Scientist**, 15, p. 8. 2001.

LEITÃO, A. L.; ENGUITA, F. J. Gibberellins in *Penicillium* strains: Challenges for endophyte-plant host interactions under salinity stress. **Microbiological Research**, v. 183, p. 8–18, 1 fev. 2016.

LELAPALLI, S. et al. Characterization of phosphate solubilizing plant growth promoting rhizobacterium *lysini bacillus* pakistanensis strain PCPSMR15 isolated from *Oryza sativa*. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 2, p. 100080, dez. 2021.

LINDOW, S, E.; BRANDL, M, T. Microbiology of the phyllosphere. **Appl Environ Microb.**69:1875–83. 2003. doi: 10.1128 / AEM.69.4.1875-1883.2003.

MALHOTRA, M.; SRIVASTAVA, S. An ipdC gene knock-out of *Azospirillum brasilense* strain SM and its implications on indole-3-acetic acid biosynthesis and plant growth promotion. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 93, n. 4, p. 425–433, maio 2008.

MALHOTRA, M.; SRIVASTAVA, S. Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. **European Journal of Soil Biology**, Ecology and application of *Azospirillum* and other plant growth promoting bacteria (PGPB). v. 45, n. 1, p. 73–80, 1 jan. 2009.

MEENA, V. S. et al. Potassium-Solubilizing Microorganism in Evergreen Agriculture: An Overview. Em: MEENA, V. S. et al. (Eds.). **Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture**. New Delhi: Springer India, 2016. p. 1–20.

MORRONE, D. et al. Gibberellin biosynthesis in bacteria: separate ent-copalyl diphosphate and ent-kaurene synthases in *Bradyrhizobium japonicum*. **FEBS letters**, v. 583, n. 2, p. 475–480, 22 jan. 2009.

NADAL, M. et al. Endophytic Bacteria Can Replace the Need for Synthetic Auxin during *In Vitro* Rooting of *Pyrus communis*. **Agronomy**, v. 12, p. 1226, 19 maio 2022 DIAS, A. C. F. et al. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their

potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 189–195, fev. 2009.

NASCIMENTO, F. X. et al. Plant growth-promoting activities and genomic analysis of the stress-resistant *Bacillus megaterium* STB1, a bacterium of agricultural and biotechnological interest. **Biotechnology Reports**, v. 25, p. e00406, 1 mar. 2020.

NEHRA, N. S.; STUSHNOFF, C.; KARTHA, K. K. Regeneration of plants from immature leaf-derived callus of strawberry (*Fragaria × ananassa*). **Plant Science**, v. 66, n. 1, p. 119–126, 1 jan. 1990.

NEMZER, B. et al. Bioactive Compounds, Antioxidant Activities, and Health Beneficial Effects of Selected Commercial Berry Fruits: A Review. **Journal of Food Research**, v. 9, n. 5, p. p78, 10 set. 2020.

O'CONNELL, P. F. Sustainable Agriculture-a Valid Alternative. **Outlook on Agriculture**, v. 21, n. 1, p. 5–12, 1 mar. 1992.

OMAR, G. F. et al. Somatic embryo-like structures of strawberry regenerated *in vitro* on media supplemented with 2,4-D and BAP. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 51, n. 9, p. 739–745, set. 2013.

PALHA, M. G. A planta do morangueiro. In: PALHA, M. G. (coord.). **Manual do Morangueiro**. Projeto PO AGRO DE&D nº 193: Tecnologias de produção integrada no morangueiro visando a expansão da cultura e a reconquista do mercado, p. 3-12. 2005.

PEDRAZA, R. O. et al. Chapter 6 - *Azospirillum*. Em: AMARESAN, N. et al. (Eds.). **Beneficial Microbes in Agro-Ecology**. Academic Press, 2020. p. 73–105.

PHILLIPS, K. A. et al. vanishing tassell2 encodes a grass-specific tryptophan aminotransferase required for vegetative and reproductive development in maize. **The Plant Cell**, v. 23, n. 2, p. 550–566, fev. 2011.

PHOUR RE, Z. Bacterial cyanogenesis: impact on biotic interactions. **Journal of applied microbiology**, v. 118, n. 2, fev. 2015.

PHOUR, M. et al., M. et al. Interkingdom signaling in plant-rhizomicrobiome interactions for sustainable agriculture. **Microbiological Research**, v. 241, p. 126589, dez. 2020.

PICAZEVICZ, A. A. C.; KUSDRA, J. F.; MORENO, A. DE L. Crescimento do milho em resposta a *Azospirillum brasilense*, *Rhizobium tropici*, molibdênio e nitrogênio. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 21, p. 623–627, set. 2017.

QUEIROZ VOLTAN, R. B. et al. Caracterização botânica de cultivares de morangueiro. **Bragantia**, v. 55, p. 29–44, 1996.

RADLEY, M. Occurrence of Substances Similar to Gibberellic Acid in Higher Plants. **Nature**, v. 178, n. 4541, p. 1070–1071, nov. 1956.

RATTANPAL, H.; GILL, M.; SANGWAN, A. Micropropagation of strawberry through

meristem culture. **Acta Horticulturae**, v. 890, p. 149–153, 1 mar. 2011.

READ, P.E., & PREECE, J.E. **Cloning: Plants – Micropropagation/Tissue Culture**. 2014.

REDDY, E. C. et al. Hydrolytic Enzyme Producing Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) in Plant Growth Promotion and Biocontrol. Em: SAYYED, R. Z.; UARROTA, V. G. (Eds.). **Secondary Metabolites and Volatiles of PGPR in Plant-Growth Promotion**. Cham: Springer International Publishing, 2022. p. 303–312.

REED, M. L. E.; CLICK, B. Applications of Plant Growth-Promoting Bacteria for Plant and Soil Systems. **Applications of microbial engineering**, v. 181. p. 181–228. 2013.

REINHOLD-HUREK, B. et al. Roots shaping their microbiome: global hotspots for microbial activity. **Annual Review of Phytopathology**, v. 53, p. 403–424, 2015.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Living inside plants: bacterial endophytes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, n. 4, p. 435–443, ago. 2011.

ROGERS, J. R.; BENNETT, P. C. Mineral stimulation of subsurface microorganisms: release of limiting nutrients from silicates. **Chemical Geology**, v. 203, n. 1, p. 91–108, 15 jan. 2004.

SAMTANI, J. B. et al. The Status and Future of the Strawberry Industry in the United States. **HortTechnology**, v. 29, n. 1, p. 11–24, 1 fev. 2019.

SÁNCHEZ, Ó. J.; OSPINA, D. A.; MONTOYA, S. Compost supplementation with nutrients and microorganisms in composting process. **Waste Management**, v. 69, p. 136–153, nov. 2017.

SANTOS, A. M. DOS. **A cultura do morangueiro**. Brasília, DF: Embrapa-SPI; Embrapa-CPACT, 1993., 1993.

SANTOS, L. F.; OLIVARES, F. L. Plant microbiome structure and benefits for sustainable agriculture. **Current Plant Biology**, v. 26, p. 100198, 1 jun. 2021.

SCHLAEPPI, K.; BULGARELLI, D. The plant microbiome at work. **Molecular plant-microbe interactions: MPMI**, v. 28, n. 3, p. 212–217, mar. 2015.

SCHWENGBER, J. E. et al. **Morangueiro**. Brasília, DF: Embrapa; Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2016., 2016.

SHRIVASTAVA, P.; KUMAR, R. Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, n. 2, p. 123–131, mar. 2015.

SIMMONS, T. et al. Exploring the Root Microbiome: Extracting Bacterial Community Data from the Soil, Rhizosphere, and Root Endosphere. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2018, 2 maio 2018.

SINGH, B. K.; LIU, H.; TRIVEDI, P. Eco-holobiont: A new concept to identify drivers of host-associated microorganisms. **Environmental Microbiology**, v. 22, n. 2, p. 564–567, fev.

2020.

SINGH, J. S.; ABHILASH, P. C.; GUPTA, V. K. Agriculturally Important Microbes in Sustainable Food Production. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 10, p. 773–775, 1 out. 2016.

SINGH, J. S.; GUPTA, V. K. Soil microbial biomass: A key soil driver in management of ecosystem functioning. **Science of The Total Environment**, v. 634, p. 497–500, 1 set. 2018.

SINGH, LP.; GILL, SG.; TUTEJA, N. Unraveling the role of fungal symbionts in plant abiotic stress tolerance. **Plant Signal Behav** 6:175–191. 2011.

SOUMARE, A.; SARR, D.; DIÉDHIOU, A. G. Potassium sources, microorganisms and plant nutrition: Challenges and future research directions. **Pedosphere**, v. 33, n. 1, p. 105–115, 1 fev. 2023.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin and plant-microbe interactions. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 4, p. a001438, 1 abr. 2011.

SUPANJANI, S. et al. Nod factor enhances calcium uptake by soybean. **Plant physiology and biochemistry: PPB**, v. 44, n. 11–12, p. 866–872, 2006.

TIWARI, S.; PRASAD, V.; CHAUHAN, PS.; LATA, C. Bacillus amyloliquefaciens Confers Tolerance to Various Abiotic Stresses and Modulates Plant Response to Phytohormones through Osmoprotection and Gene Expression Regulation in Rice. **Front. Plant Sci.** 8:1510. 2017.doi: 10.3389/fpls.2017.01510

TURNER, T. R.; JAMES, E. K.; POOLE, P. S. The plant microbiome. **Genome Biology**, v. 14, n. 6, p. 209, 25 jun. 2013.

VINE, S. J. Improved Culture of Apical Tissues for Production of Virus-Free Strawberries. **Journal of Horticultural Science**, v. 43, n. 3, p. 293–297, 1 jan. 1968.

VORHOLT, JA: Microbial life in the phyllosphere. **Nat Rev Microbiol**, 10: 828-840. 2012.

WANI, ZA.; ASHRAF, N.; MOHIUDDIN, T.; RIYAZ-UL-HASSAN, S. Plant-endophyte symbiosis, and ecological perspective. **Appl Microbiol Biotechnol.** Apr;99(7):2955-65. 2015. doi: 10.1007/s00253-015-6487-3. Epub 2015 Mar 10. PMID: 25750045.

WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Calcium in Plants. **Annals of Botany**, v. 92, n. 4, p. 487–511, 1 out. 2003.

SEGUNDA PARTE: ARTIGOS – Redigidos conforme a norma NBR 6022 (ABNT, 2018)

ARTIGO 1 - Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal na Biotização de Microplantas de Morangueiro

Ana Milena Gómez Sepúlveda¹, Ederson da Conceição Jesus², Yulimar Castro Molina¹, Luna Queiroz Carvalho³, Vera Lúcia dos Santos⁴, Moacir Pasqual³, Joyce Dória Rodrigues³.

1 Departamento de Biologia, Lavras DBI, Brasil, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, Caixa Postal 37200-900, Brasil.

2 Embrapa Agrobiologia, Rodovia BR-465, Km 7, Seropédica 23897-970, RJ, Brasil

3 Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, Lavras, MG 37200-900, Brasil.

4 Laboratório de Microbiologia Aplicada, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

E-mails: milena.biotec@outlook.com, ederson.jesus@embrapa.br, yulimarcastromolina@gmail.com, luna.carvalho@estudante.ufla.br, verabio@gmail.com, mpasqual@ufla.br, joyce.doria@ufla.br

RESUMO

O morangueiro (*Fragaria ananassa* Duch) é uma das frutas mais apreciadas mundialmente, e a micropropagação *in vitro* destaca-se como uma técnica eficiente para a produção de mudas de alta qualidade sob condições assépticas. Recentemente, a biotização *in vitro* tem sido explorada como uma ferramenta promissora para o desenvolvimento de microplantas em co-cultivo com bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV). Neste estudo, avaliou-se a formação de biofilmes em 10 cepas bacterianas, seguida da biotização, realizada individualmente e em consórcios, em microplantas das cultivares „Oso Grande“ e „Camarosa“. Os resultados mostraram que 70% das cepas formaram biofilmes fracamente aderentes, enquanto 30%, pertencentes ao gênero *Bacillus*, foram classificadas como fortes produtoras de biofilme. Além disso, 40% das cepas, incluindo *Azospirillum brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6), *Bacillus subtilis* CCMA 0401 e *Rhizobium leucaneae* BR935, promoveram respostas benéficas nas microplantas, destacando-se também em consórcios como Ab-V5 + BR935, Ab-V5 + 0401, BR935 + 0401, Ab-V6 + BR935 e Ab-V6 + 0401, que apresentaram impactos positivos nas variáveis fitotécnicas e fisiológicas. Esses resultados reforçam a biotização como uma ferramenta biotecnológica eficaz, com potencial para melhorar a cultura de tecidos vegetais e promover práticas agrícolas mais sustentáveis.

Palavras-chave: Cultura de tecidos; *Fragaria Ananassa* Duch; Bioestimulantes; Interação Planta-microrganismo.

ABSTRACT

The strawberry (*Fragaria ananassa* Duch) is one of the most globally appreciated fruits, with *in vitro* micropropagation standing out as an efficient technique for producing high-quality seedlings under aseptic conditions. Recently, *in vitro* biotization has been explored as a promising tool for the development of microplants during co-cultivation with plant growth-promoting bacteria (PGPB). In this study, biofilm formation was evaluated in 10 bacterial strains, followed by biotization, conducted both individually and in consortia, in microplants of the cultivars „Oso Grande“ and „Camarosa“. The results showed that 70% of the strains formed weakly adherent biofilms, while 30%, belonging to the genus *Bacillus*, were classified as strong biofilm producers. Moreover, 40% of the strains, including *Azospirillum brasilense* (Ab-V5 and Ab-V6), *Bacillus subtilis* CCMA 0401, and *Rhizobium leucaneae* BR935,

promoted beneficial responses in the microplants, also standing out in consortia such as Ab- V5 + BR935, Ab-V5 + 0401, BR935 + 0401, Ab-V6 + BR935, and Ab-V6 + 0401, which demonstrated positive effects on phytotechnical and physiological variables. These findings highlight biotization as an effective biotechnological tool with potential applications in plant tissue culture and the promotion of more sustainable agricultural practices.

Keywords: Tissue culture; *Fragaria Ananassa* Duch; Biostimulants; Plant-microorganism interaction.

1 INTRODUÇÃO

O morangueiro *Fragaria x ananassa* Duch, pertence à família *Rosaceae*, é uma das frutas mais consumidas no mundo (Mezzetti *et al.*, 2018). Contém vários compostos bioativos, incluindo fenóis, flavonoides, antocianinas, taninos, entre outros (Fierascu *et al.*, 2020; Kajdzanoska *et al.*, 2011). Esses compostos podem ter efeitos benéficos para a saúde, como propriedades imunomoduladoras, anti-inflamatórias (Fumagalli *et al.*, 2016; Gasparrini *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2022; Van De Velde *et al.*, 2019), antioxidantes (Nowicka *et al.*, 2019) e antimicrobianas (Cardoso *et al.*, 2018).

A China lidera a produção mundial de morangueiros, ocupando a primeira posição com uma área plantada de 129.046 hectares e uma produção de 3.389.620 toneladas. Já o Brasil, no ano de 2023, alcançou uma produção de 197.000 toneladas em uma área de 5.084 hectares (Antunes *et al.*, 2023). A forma mais comum de propagação é por estolões (GUO *et al.*, 2021). No entanto, a micropropagação por cultura de tecidos vegetais (CTV) tem sido relatada por Boxus e, desde então, tem sido utilizada para produzir vários clones de uma planta matriz (Boxus, 1999, 1974), assim, o estabelecimento do cultivo *in vitro* pode ser realizado a partir de diferentes tipos de explantes como estolões (Dias *et al.*, 2009), as pontas de brotação, segmentos nodais (Karim *et al.*, 2015) ou aquênios (Hernández-Soberano; Ruíz- Herrera; Valencia-Cantero, 2020; Pang *et al.*, 2023), permitindo a multiplicação de células, tecidos, órgãos ou partes da planta em condições controladas, possibilitando a coleta rápida, em larga escala, durante todo o ano (Abdalla *et al.*, 2022; Carvalho; Silva; Medeiros, 2006; Read; Preece, 2014; Yildirim; Turker, 2014).

Seis são os estágios da micropropagação: o estágio 0: consiste na seleção do explante; o estágio I: é o estabelecimento da cultura, o estágio II: Alongamento e multiplicação; o estágio III: enraizamento, estágio IV: endurecimento, por último, o estágio V: transferência para as condições naturais (para o campo) (Soumare *et al.*, 2021). Os explantes vegetais são

previamente desinfetados e cultivados assepticamente em meio de cultivo Murashige & Skoog (MS) que pode ser adicionado com reguladores de crescimento como auxinas, tais como o ácido índol acético (AIA,) e o ácido índol butírico (IBA) (Madumali; Abeythilakarathna; H. Seran, 2021) ou mediante o uso de citocininas como a benzilaminopurina (BAP) e o tidiazuron (TDZ) (Haddadi *et al.*, 2010), para melhorar a produção de brotos, o crescimento vegetal e/ou enraizamento de morangueiro (Bhatt, 2000; El Hamdouni; Lamarti; Badoc, 2001; Hanhineva; Kokko; Kärenlampi, 2005; Nehra; Stushnoff; Kartha, 1990; Omar *et al.*, 2013; Vine, 1968).

Outra alternativa além do uso dos fitohormônios que atualmente está sendo estudada é a biotização de microplantas *in vitro* com microrganismos altamente prospectivos para aumentar a eficácia do processo de micropropagação através do desenvolvimento de uma interação benéfica entre o explante vegetal e o microrganismo (Castro *et al.*, 2019; Kanani; Modi; Kumar, 2020; Lim *et al.*, 2023a; Nowak, 1998; Nowak *et al.*, 1999; Soumare *et al.*, 2021). Neste sentido, podem ser usadas bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) (Arslan; Akkaya, 2020; Castro-Restrepo *et al.*, 2022a; Lim *et al.*, 2023b), fungos micorrízicos arbusculares (FMA) (Ważny *et al.*, 2024; Williams *et al.*, 1992), ou aqueles microrganismos endofíticos benéficos que se manifestam ao longo da manutenção do cultivo *in vitro* (Castro-Restrepo *et al.*, 2022b; Espinoza *et al.*, 2021; Kanani; Modi; Kumar, 2020). Assim, durante o período de interação micropântula-microrganismo (co-inoculação), podem ocorrer mudanças fisiológicas e bioquímicas no explante vegetal, e a colonização bem-sucedida dependerá de diversos fatores que poderiam induzir uma quimiotaxia positiva, permitindo a fixação à superfície da raiz para a possível colonização dos tecidos internos (Balsanelli *et al.*, 2016; Botta *et al.*, 2013; Krasova *et al.*, 2022; Lim *et al.*, 2023b). Neste sentido, a formação de biofilme também é de interesse, uma vez que podem oferecer diversos benefícios, como melhorar a aquisição de nutrientes, resistência bacteriana, ademais fornece uma estabilidade mecânica, facilita as interações benéficas entre bactérias e plantas pela comunicação célula- célula, podendo induzir a formação de consórcios sinérgicos (Ajijah *et al.*, 2023).

A biotização pode beneficiar a microplantas durante a fase *in vitro* bem como na fase *ex vitro*, podendo ajudar na adaptação do sistema radicular e promovendo um maior desenvolvimento da parte aérea, possibilitando-lhe uma preparação para as novas interações com o solo e os microrganismos do ambiente externo (Chandran *et al.*, 2020; Gray, 2010; Hazarika, 2006; Rather *et al.*, 2022; Read; Preece, 2014; Saad *et al.*, 2012; Saeedi *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2022). *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Bacillus* são alguns dos gêneros bacterianos de interesse por apresentam diversos mecanismos de ação e

podem ser usados como biofertilizantes, bioestimuladores ou biocontroladores em diferentes sistemas agrícolas (Arya *et al.*, 2020; Babalola, 2010; Castro-Restrepo *et al.*, 2022a; Cavalcanti *et al.*, 2020; Chandran; Meena; Swapnil, 2021, 2021; Flores-Félix *et al.*, 2018; Fukami; Cerezini; Hungria, 2018; Hernández-Soberano; Ruíz-Herrera; Valencia-Cantero, 2020; Masciarelli; Llanes; Luna, 2014; Pedraza, 2020; Kour *et al.*, 2020).

Nesta pesquisa, foram utilizadas algumas Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (BPCV), onde algumas delas foram previamente estudadas no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais/Laboratório de Bioprodutos e Interações Planta Microrganismo (LCT/LABIMP-UFLA). Anteriormente, as cepas de *Azospirillum brasilense* Ab-V5, *Bacillus subtilis* CCMA 0401, *Bradyrhizobium japonicum* CCMA 0088 foram avaliadas quanto à produção de AIA e à fixação biológica de nitrogênio. Também, a cepa Ab-V5 foi testada individualmente e em consórcios em plantas de morangueiro em casa de vegetação, encontrando que a melhor combinação foi dada entre *Azospirillum brasilense* (Ab-V5) + *Burkholderia cepacia* (CCMA 0056) + *Enterobacter cloacae* (CCMA 1285) tendo uma resposta positiva à inoculação em comparação com controles não inoculados (ANDRADE *et al.*, 2023). Além disso, em outra pesquisa, foram estudadas a solubilização de fósforo, potássio e a produção de AIA, bem como o potencial biofertilizante com *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e *Bacillus megaterium* CCMA 0401 encontrando melhoria das propriedades fisiológicas e morfoanatômicas em mudas de morangueiro inoculadas (Silva *et al.*, 2022). Por último, as 10 bactérias testadas aqui também foram utilizadas na biotização de duas cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L), onde também se caracterizou previamente a produção de fitohormônios como AIA, Ácido salicílico (AS) e Giberelinas (GA) além da produção de ACCd (Aminociclopropano-1-Carboxílico Deaminase) (Molina *et al.*, 2024). O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de formação de biofilme de 10 cepas bacterianas e investigar os efeitos das BPCVs na biotização de microplantas de morangueiro *in vitro*, bem como as respostas de acúmulo de clorofilas, carotenóides, fenóis e flavonoides.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Materiais vegetais e obtenção de explantes

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais/Laboratório de Bioprodutos e Interações Planta Microrganismo (LCT/LABIMP-UFLA) do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA),

Lavras-MG. As microplantas de duas cultivares de morangueiro, Oso Grande (OG) e Camarosa (CA) foram cedidas pela Multiplanta Tecnologia Vegetal Ltda. Utilizaram-se frascos de 200 mL contendo 50 mL do meio basal MS (Murashige; Skoog, 1962) suplementados com 1 mg/L^{-1} 6-benzilaminopurina (BAP) (Boxus, 1974). O pH foi ajustado para 5.7, e foi autoclavado por 20 min a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 psi. As microplantas foram mantidas por aproximadamente 30 ± 3 dias em uma sala de crescimento, com iluminação artificial fornecida por lâmpadas de LED brancas ($6400\text{ K}-\lambda = 525\text{ nm}$) e irradiância média de $49.4\text{ }\mu\text{Mol m}^2\text{ s}^{-1}$, com fotoperíodo de 16 horas (h) e temperatura de $25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Araújo *et al.* 2021a, b). Posteriormente as microplantas foram individualizadas e transferidas para frascos com o meio MS sem regulador de crescimento por 30 dias.

2.2 Condições de cultura das cepas bacterianas

Foram utilizadas dez bactérias cedidas pela Coleção de Cultura da Microbiologia Agrícola (CCMA/UFLA) do Laboratório de Microbiologia das Fermentações no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e pelo Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner da Embrapa Agrobiologia do Brasil (CCBD) (Tabela 1). As bactérias utilizadas foram previamente estocadas a -80°C . Ao momento do uso foram reativadas em ágar nutriente (AN) composto por peptona 5 gL^{-1} , extrato de levedura 3 gL^{-1} , cloreto de sódio 5 gL^{-1} , e ágar 15 gL^{-1} , e mantidas no BOD (Bio-Oxygen Demand) a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 h.

Tabela 1 - Cepas bacterianas

Código	Gênero e espécie	Localização geográfica	Origem
Ab-V5 (CCMA1291)	<i>Azospirillum brasilense</i>	Curitiba-PR, Brasil	Fukami <i>et al.</i> , 2018
Ab-V6 (CNPSO 2084)	<i>Azospirillum brasilense</i>	Curitiba-PR, Brasil	-
CIAT 899	<i>Rhizobium tropici</i>	Colômbia, Embrapa	-
BR935	<i>Rhizobium leucaneae</i>	Cipó-BA, Brasil, Embrapa	-
BR921	<i>Sinorhizobium fredii</i>	Lapão-BA, Brasil, Embrapa	-
CCMA0122	<i>Sinorhizobium fredii</i>	Luminárias-MG, Brasil	Fruto (Cerrado) Pixirica
CCMA0088	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Arcos-MG, Brasil	Fruto (Cerrado) Marolo
CCMA0401	<i>Bacillus subtilis</i>	Alto Garças-MT, Brasil	Bebida indígena - Chicha (Arroz)
CCMA0004	<i>Bacillus megaterium</i>	Confresa-MT, Brasil	Bebida indígena - Caxiri
CCMA0112	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Luminárias-MG, Brasil	Fruto (Cerrado) Murici do cerrado

Cepas bacterianas utilizadas ao longo dos experimentos. CCMA: Coleção de Cultura da Microbiologia Agrícola; EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Fonte: Da autora (2024).

2.3 Teste de produção de biofilme

A quantificação do biofilme foi realizada utilizando a metodologia descrita por (O'toole, 2011). Cada cepa bacteriana foi cultivada em caldo nutriente por 48 h, sendo mantida a 120 rpm a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Após o crescimento, alíquotas das amostras foram transferidas para placas de 96 poços, onde cada amostra foi misturada em 1:1 com meio fresco, e mantida a temperatura ambiente por 1, 2 e 3 dias. Após a incubação, as placas foram invertidas para remover o meio presente e, em seguida, mergulhadas cuidadosamente em água destilada estéril, repetindo-se o processo duas vezes. Posteriormente, foram adicionados 125 μL de uma solução de 0.1% de cristal violeta (CV) a cada poço da placa de microtitulação e incubadas temperatura ambiente por 15 minutos (min), em seguida, a placa foi enxaguada com água destilada estéril 3 vezes e seca com papel toalha.

Na sequência, foram adicionados 125 μL de ácido acético a 30 % a cada poço e mantidos à temperatura ambiente durante 15 min. Por fim, 125 μL de cada amostra foram transferidos para uma nova placa, e a absorbância foi quantificada a 570 nm no espectrofotômetro (Thermo Scientific™ Multiskan™), utilizando ácido acético a 30% como

branco. A formação de biofilme pelas BPCV foi quantificada aos 1, 2 e 3 dias, a fim de agrupar os resultados em quatro categorias a partir das medições OD (densidade óptica) e ODC (densidade óptica de corte, ou seja, o valor do ensaio sem bactérias). As categorias foram definidas como: não aderentes $OD \leq ODC$, debilmente aderentes $ODC < OD \leq (2 \times ODC)$, moderadamente aderentes $(2 \times ODC) < OD \leq (4 \times ODC)$ e fortemente aderentes $(4 \times ODC) < OD$ (Basson; Flemming; Chenia, 2008; Karimi *et al.*, 2022; Stepanović *et al.*, 2000). Os testes foram feitos em triplicata.

2.4 Preparação dos inóculos bacterianos

Células bacterianas de cada cepa foram crescidas em AN a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 h no BOD, após o crescimento as UFC (Unidades Formadoras de Colônias) foram tomadas usando um loop de inoculação e então transferidas e ressuspensas em caldo nutriente CN, o inóculo foi mantido sob agitação a 120 rpm a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 48 h, logo após foram centrifugados por 10 min a $1924 \times g$ (Kasvi K14-0815^a) e lavados duas vezes com água destilada estéril. Em seguida, a densidade celular foi ajustada para 1.5×10^8 UFC mL⁻¹ com a escala de McFarland, e com recuento das UFC no momento do inóculo.

2.5 Biotização de microplantas de morangueiro

Microplantas das cultivares OG e CA com 2 a 2.5 cm de comprimento, 6 a 8 folhas e 3 a 5 mm de raiz foram selecionadas e transferidas individualmente para frascos de 200 mL, contendo 50 mL de meio MS. Estas foram mantidas na sala de crescimento por 7 dias com iluminação artificial fornecida por lâmpadas de LED brancas (6400 K- $\lambda = 525$ nm) e irradiância média de $49.4 \mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, com fotoperíodo de 16 h e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (Araújo *et al.* 2021a, b). A biotização foi feita na câmara de fluxo laminar, pipetando 50 μL do inóculo bacteriano (10^8 células mL⁻¹) na base do caule-raiz de cada microplantas de morangueiro, resultando em uma concentração bacteriana final de aproximadamente 10^6 células para cada microplântula. Os frascos foram mantidos na sala de crescimento por 30 ± 3 dias com iluminação artificial. Foi estabelecido um delineamento inteiramente casualizado com onze tratamentos (10 cepas bacterianas e o tratamento controle, sem inoculação) e quatro repetições. Cada tratamento foi composto por 24 microplantas para cada cultivar. Após o tempo de crescimento foram avaliadas as características fitotécnicas dos tratamentos.

2.6 Biotização de microplantas de morangueiro com consórcios bacterianos

Após a determinação das melhores associações entre microplântula-bactéria, foram selecionadas as bactérias potenciais para formar consórcios para a biotização *in vitro* (Tabela 2).

Tabela 2 - Tratamentos utilizados na biotização em consórcios

Código	Cepas bacterianas
Ab-V5 + BR935	<i>A. brasilense</i> + <i>R. leucaneae</i>
Ab-V5 + 0401	<i>A. brasilense</i> + <i>B. subtilis</i>
BR935 + 0401	<i>R. leucaneae</i> + <i>B. subtilis</i>
Ab-V6 + BR935	<i>A. brasilense</i> + <i>R. leucaneae</i>
Ab-V6 + 0401	<i>A. brasilense</i> + <i>B. subtilis</i>
Controle	Sem bactéria, (H ₂ O destilada estéril)

Consórcios bacterianos utilizados na biotização *in vitro* das cultivares Oso Grande e Camarosa
 Fonte: Da autora (2024).

2.7 Preparação dos inóculos bacterianos para consórcios

As suspensões bacterianas foram preparadas individualmente e misturadas em proporção 1:1, e mantidas em agitação por 20 min a 90 rpm em 25±2°C (Blanco *et al.*, 2021). Logo após foram utilizadas para a biotização das microplantas em consórcios. Os frascos foram levados para a sala de crescimento por 30±3 dias com iluminação artificial fornecida por lâmpadas de LED brancas (6400 K–λ = 525 nm) e irradiância média de 49.4 μMol m² s⁻¹, com fotoperíodo de 16 h e temperatura de 25 ± 2 °C. Após o tempo de crescimento foram avaliadas as características fitotécnicas.

2.8 Análises Fitotécnicas

Ao final do experimento foram realizadas as análises fitotécnicas no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais/Laboratório de Bioprodutos e Interações Planta Microrganismo (LCT/LABIMP-UFLA). Foram avaliados o comprimento de parte aérea (CPA), comprimento da raiz (CR), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), massa seca total (MT) e número de brotos. Um paquímetro digital foi utilizado para medir o comprimento da parte aérea e o comprimento da raiz, e uma balança analítica de precisão foi empregada para a determinação da massa fresca e seca.

2.9 Extração e quantificação de clorofilas e carotenóides

Para a quantificação de clorofilas e carotenoides 0.1 g de folhas de cada tratamento foram coletadas em 10 mL de acetona a 80% e mantidas por 24h em ausência de luz, logo após os extratos foram filtrados e foram feitas as leituras da absorbância em 663.2 nm, 646,8 nm e 470 nm no espectrofotômetro (Thermo Scientific™ Multiskan™). Os cálculos de μg de clorofila/g de matéria fresca foliar, seguiram as seguintes equações (Lichtenthaler, Buschmann, 2001):

$$\begin{aligned}\text{Clorofila } a: & 12.25 \times A_{663.2} - 2.79 \times A_{646.8} \\ \text{Clorofila } b: & 21.50 \times A_{646.8} - 5.10 \times A_{663.2} \\ \text{Carotenóides:} & (1000 \times A_{470} - 1.82 \times Ca - 85.02 \times Cb) / 198\end{aligned}$$

2.10 Obtenção dos extratos hidro-metanólicos

Foram pesados 0.2 g de matéria seca da parte aérea e adicionados com 10 mL da mistura de metanol: água (80:20, v/v) e acidificados com HCl (0.1%) para a obtenção dos extratos hidro-metanólicos, que foram mantidos em agitação em temperatura ambiente na ausência de luz por 24 h, logo após foram centrifugados a 855 x g (Kasvi K14-0815^a) por 15 min, os sobrenadantes foram recuperados e armazenados a -80 até análise (Ariza *et al.*, 2016).

2.11 Quantificação do conteúdo fenólico total (TPC)

O conteúdo fenólico total (TPC) dos extratos foi determinado usando o reagente de Folin-Ciocalteu (FC) (SINGLETON., 1965), onde 100 μL dos extratos hidro-metanolicos foram misturados com 500 μL do reagente FC ao 10% e incubados por 3 min, logo após foi adicionado 400 μL do $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$ (7 M) e incubados em temperatura ambiente por 2 horas na ausência de luz, a absorbância foi medida a 760 nm usando o espectrofotômetro (Thermo Scientific™ Multiskan™). A curva de calibração foi realizada a partir de uma solução stock de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido gálico, os dados foram expressos em mgGAE/g, miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de matéria seca (Ariza *et al.*, 2016; Simirgiotis *et al.*, 2008).

2.12 Quantificação do conteúdo total de flavonóides (TFC)

O conteúdo total de flavonóides (TFC) foi quantificado segundo a metodologia proposta por (Ariza *et al.*, 2016), com algumas modificações nos volumes. v250 µL dos extratos hidro-metanolicos, misturados em 1.25 mL de água MilliQ, com a adição de 75 µL de solução de NaNO₂ (5%), e incubados por 6 min, posteriormente foram adicionados 150 µL de solução de AlCl₃·6H₂O (10%), seguido de 500 µL de NaOH (1 M), sendo o volume final foi ajustado para 2.5 mL com água MilliQ e a absorbância medida a 420 nm usando o espectrofotômetro (Thermo Scientific™ Multiskan™). A curva de calibração foi a partir de uma solução stock de 100 µg/mL de quercetina, foram os expressos em mgQE/g miligramas de equivalentes de quercetina por grama de matéria seca (Chang *et al.*, 2002; Memari-Tabrizi *et al.*, 2021).

2.13 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Posteriormente, foi realizada análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey com um nível de significância de $p < 0.05$ utilizando os softwares Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2020) e Sisvar v 5.8 (Ferreira., 2023).

3 RESULTADOS

3.1 Teste de formação do biofilme

A formação de biofilme pelas BPCV foi quantificada aos 1, 2 e 3 dias, a fim de agrupar os resultados em quatro categorias, sendo elas: não aderentes: (-); fracamente aderentes: (+); moderadamente aderentes: (+ +); fortemente aderentes (+ + +), a partir das medições OD (densidade ótica) e ODC (densidade ótica de corte) ou seja, o valor do ensaio sem bactéria (Tabela 4) (Basson; Flemming; Chenia, 2008; Karimi *et al.*, 2022; Stepanović *et al.*, 2000). Foi observado que a maior formação de biofilme bacteriano foi no *B. amyloliquefaciens* CCMA 0112 com uma produção fortemente aderente após 2 dias de crescimento, seguidamente as cepas de *B. subtilis* CCMA 0401 e *B. megaterium* CCMA 0004 estiveram na categoria moderadamente aderente após 2 dias de crescimento, por último, se

encontram as demais cepas bacterianas que mantiveram uma formação fracamente aderente ao longo do tempo avaliado (Tabela 3).

Tabela 3 - Produção de biofilme bacteriano

BPCVs	24 H	48 H	72 H
<i>A. brasilense</i> Ab-V5	+	+	+
<i>A. brasilense</i> Ab-V6	+	+	+
<i>R. tropici</i> CIAT 899	+	+	+
<i>R. leucaneae</i> BR935	+	+	+
<i>S. fredii</i> BR921	+	+	+
<i>S. fredii</i> CCMA 0122	+	+	+
<i>B. japonicum</i> CCMA 0088	+	+	+
<i>B. subtilis</i> CCMA 0401	+	++	++
<i>B. megaterium</i> CCMA 0004	+	++	++
<i>B. amyloliquefaciens</i> CCMA 0112	+	+++	+++

Teste de produção de biofilme bacteriano após 72 horas de cultivo. Categorias de classificação: Não aderentes: (-); Fracamente aderentes: (+); Moderadamente aderentes: (++); fortemente aderentes (+++)

Fonte: Da autora (2024).

3.2 Biotização do morangueiro

A biotização *in vitro* das cultivares de morangueiro Oso Grande (OG) e Camarosa (CA) revelou que 40% das bactérias apresentaram uma interação positiva na promoção de crescimento vegetal. Destacaram-se as cepas *A. brasilense* Ab-V5, *A. brasilense* Ab-V6, *B. subtilis* CCMA 0401 e *R. leucaneae* BR935. Por outro lado, 60% das cepas não permitiram o desenvolvimento completo das microplantas, e *B. amyloliquefaciens* CCMA 0112 induziu a morte da microplantas após 2 dias da biotização, nas duas cultivares, sendo, portanto, excluída dos testes subsequentes.

A biotização de microplantas da cultivar OG revelou um aumento no comprimento da parte aérea (CPA) nas interações com as cepas *A. brasilense* Ab-V5 e *R. leucaneae* BR935, que apresentaram valores de aproximadamente 1.4 vezes maiores que o controle. Em relação ao comprimento da raiz (CR), quatro cepas se destacaram: *A. brasilense* Ab-V5, *A. brasilense* Ab-V6, *B. subtilis* CCMA 0401 e o *R. leucaneae* BR935, sem apresentar diferenças significativas entre elas. A massa seca da parte aérea (MSPA) mostrou um comportamento similar com o comprimento da parte aérea, com *A. brasilense* Ab-V5, e *R. leucaneae* BR935 aumentando aproximadamente 1.3 e 1.26 vezes em comparação ao controle.

Na massa seca da raiz (MSR) observou-se que a biotização com o *A. brasilense* Ab-V5 foi a que teve maior influência neste parâmetro, seguido do *R. leucaneae* BR935, *B.*

subtilis CCMA 0401 e *A. brasilense* Ab-V6 sem apresentar diferenças significativas entre eles. Por último, na massa total (MT) 40% das cepas apresentaram um incremento (Ab-V5, BR935, Ab-V6 e CCMA 0401) (Figura 1A). Por outro lado, o 60 % das BPCV apresentaram valores inferiores ao controle em todos os parâmetros avaliados (Tabela 4).

Tabela 4 - Variáveis fitotécnicas nas cultivares de morangueiro biotizadas individualmente

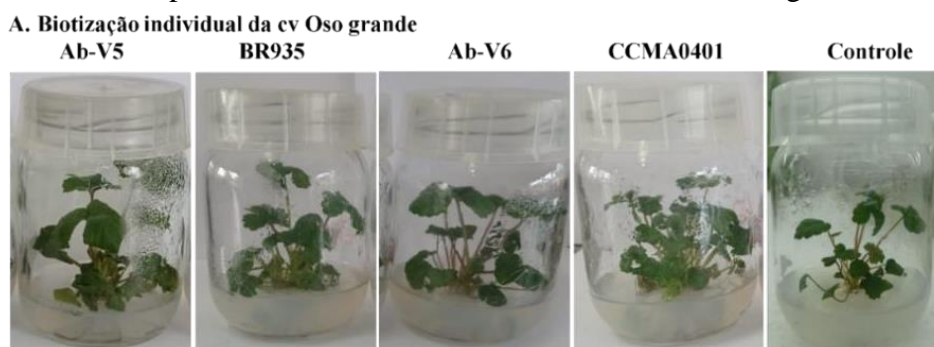
Biotização <i>in vitro</i> Cultivar Oso Grande		Comprimento (cm)		Massa seca (mg)	
Tratamentos	Comprimento parte aérea (CPA)	Comprimento da raiz (CR)	Massa seca parte aérea (MSPA)	Massa seca da raiz (MSR)	Massa total (MT)
<i>A. brasilense</i> Ab-V5	5.83 ± 0.01 ^a	6.95 ± 0.07 ^a	215.75 ± 0.3 ^a	63.38 ± 0.3 ^a	279.13 ± 0.4 ^a
<i>A. brasilense</i> Ab-V6	4.66 ± 0.008 ^b	6.60 ± 0.08 ^a	194.13 ± 1.0 ^{b, c}	50.1 ± 0.2 ^b	244.2 ± 1.1 ^c
<i>R. tropici</i> CIAT 899	1.88 ± 0.02 ^d	0.31 ± 0.02 ^d	59.34 ± 1.4 ^f	8.34 ± 0.1 ^d	67.68 ± 1.5 ^f
<i>R. leucaneae</i> BR935	5.75 ± 0.01 ^a	6.74 ± 0.06 ^a	208.63 ± 0.2 ^{a, b}	53.0 ± 0.3 ^b	261.63 ± 0.3 ^b
<i>S. fredii</i> BR921	4.15 ± 0.01 ^c	3.81 ± 0.02 ^c	144.45 ± 2.0 ^e	36.49 ± 0.2 ^c	180.94 ± 2.0 ^e
<i>S. fredii</i> CCMA 0122	1.46 ± 0.04 ^e	0.0 ± 0.0 ^d	17.14 ± 0.3 ^g	3.35 ± 0.1 ^e	20.49 ± 0.3 ^g
<i>B. japonicum</i> CCMA 0088	1.66 ± 0.03 ^{d, e}	0.0 ± 0.0 ^d	11.75 ± 0.19 ^g	4.01 ± 0.2 ^e	15.76 ± 0.2 ^g
<i>B. subtilis</i> CCMA 0401	4.71 ± 0.007 ^b	6.58 ± 0.07 ^a	190.63 ± 0.1 ^c	50.25 ± 0.1 ^b	240.88 ± 0.2 ^c
<i>B. megaterium</i> CCMA 0004	1.65 ± 0.04 ^{d, e}	0.65 ± 0.06 ^d	62.0 ± 1.2 ^f	8.89 ± 0.3 ^d	70.89 ± 1.5 ^f
Controle	3.93 ± 0.01 ^c	5.05 ± 0.8 ^b	165 ± 0.3 ^d	35.0 ± 0.08 ^c	200.0 ± 0.3 ^d
Biotização <i>in vitro</i> Cultivar Camarosa		Comprimento (cm)		Massa seca (mg)	
Tratamentos	Comprimento parte aérea (CPA)	Comprimento da raiz (CR)	Massa seca parte aérea (MSPA)	Massa seca da raiz (MSR)	Massa total (MT)
<i>A. brasilense</i> Ab-V5	4.46 ± 0.02 ^a	3.41 ± 0.07 ^c	233.88 ± 0.2 ^a	54.5 ± 0.2 ^a	288.3 ± 0.4 ^a
<i>A. brasilense</i> Ab-V6	4.78 ± 0.01 ^a	6.44 ± 0.06 ^a	193.0 ± 0.2 ^b	47.06 ± 0.1 ^b	240.06 ± 0.2 ^b
<i>R. tropici</i> CIAT 899	1.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^e	27.49 ± 0.8 ^d	5.71 ± 0.2 ^e	33.2 ± 1.0 ^e
<i>R. leucaneae</i> BR935	4.53 ± 0.04 ^a	2.80 ± 0.02 ^d	246.38 ± 0.1 ^a	52.0 ± 0.1 ^a	298.38 ± 0.2 ^a
<i>S. fredii</i> BR921	3.99 ± 0.03 ^b	2.51 ± 0.04 ^d	164.75 ± 2.0 ^e	33.0 ± 0.6 ^d	197.75 ± 2.2 ^d
<i>S. fredii</i> CCMA 0122	1.0 ± 0.0 ^c	0.0 ± 0.0 ^e	9.24 ± 0.08 ^f	3.23 ± 0.1 ^e	12.47 ± 0.1 ^g
<i>B. japonicum</i> CCMA 0088	1.13 ± 0.04 ^c	0.18 ± 0.01 ^e	13.25 ± 0.1 ^{e, f}	4.45 ± 0.2 ^e	17.7 ± 0.2 ^{f, g}
<i>B. subtilis</i> CCMA 0401	4.76 ± 0.01 ^a	6.21 ± 0.02 ^a	183.12 ± 0.1 ^b	40.50 ± 0.1 ^c	223.62 ± 0.1 ^c
<i>B. megaterium</i> CCMA 0004	1.24 ± 0.03 ^c	0.23 ± 0.01 ^e	25.94 ± 0.9 ^{d, e}	3.44 ± 0.1 ^e	29.38 ± 1.0 ^{e, f}
Controle	3.91 ± 0.01 ^b	4.83 ± 0.04 ^b	160.00 ± 0.2 ^c	36.13 ± 0.04 ^d	196.13 ± 0.2 ^d

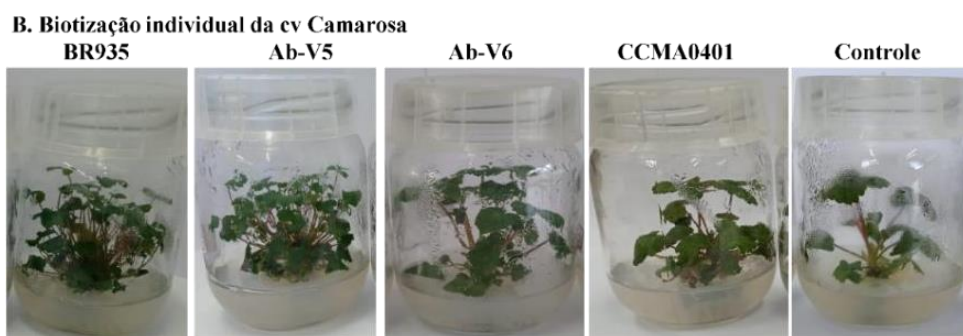
Variáveis fitotécnicas das microplantas das cultivares Oso Grande e Camarosa biotizadas individualmente após o término do cultivo *in vitro*. Comprimento parte aérea (CPA), Comprimento da raiz (CR), Massa seca parte aérea (MSPA), Massa seca da raiz (MSR), Massa total (MT). Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$).

Fonte: Da autora (2024).

As respostas positivas à biotização das microplantas da cultivar (CA) também foram evidentes nos mesmos gêneros bacterianos descritos anteriormente para a cultivar (OG). Assim, observou-se um aumento no comprimento da parte aérea (CPA) quando as microplantas foram biotizadas com as cepas de *A. brasilense* Ab-V6, *B. subtilis* CCMA 0401, *R. leucaneae* BR935 e *A. brasilense* Ab-V5. A cepa *S. fredii* BR921 apresentou valores próximos ao controle, enquanto o 50% correspondente às demais cepas utilizadas tiveram um efeito negativo neste parâmetro. No que diz respeito ao CR, apenas os tratamentos com *A. brasilense* Ab-V6 e *B. subtilis* CCMA 0401 evidenciaram um incremento entre 1.33 e 1.28 vezes, respectivamente, em comparação ao controle. Com relação à MSPA, MSR e MT, observou-se um incremento nesses parâmetros quando foram utilizadas cepas bacterianas *R. leucaneae* BR935, *A. brasilense* Ab-V5, *A. brasilense* Ab-V6 e *B. subtilis* CCMA 0401 (Figura 3B), revelando que a biotização com esses gêneros bacterianos favoreceu o acúmulo de biomassa aérea e radicular na microplantas de morangueiro cultivadas *in vitro* (Tabela 4). Enquanto ao número de brotos na cultivar OG foi aumentado quando biotizadas com o *B. subtilis* CCMA0401, já na cultivar CA a biotização individual com as cepas de *R. leucaneae* BR935 e *A. brasilense*, Ab-V5 foram os tratamentos que aumentaram a produção de brotos.

Figura 3 - Microplantas biotizadas individualmente cultivar Oso grande e Camarosa





Microplantas de morangueiro biotizadas individualmente *in vitro*. (A) cultivar Oso Grande e (B) cultivar Camarosa.

Fonte: Da autora (2024).

3.3 Biotização de morangueiro com consórcios bacterianos

A biotização com os consórcios bacterianos formados a partir da seleção das melhores cepas individuais (*A. brasilense* Ab-V5, *A. brasilense* Ab-V6, *B. subtilis* CCMA 0401 e o *R. leucaneae* BR935) revelou que, na cultivar (OG), todas as combinações foram benéficas (Tabela 5), no entanto o tratamento Ab-V5+0401 se destacou em todas as variáveis analisadas. No CPA, os melhores tratamentos foram Ab-V5+0401 e Ab-V5+BR935 com um incremento de 1.39 e 1.27 vezes em comparação ao controle, respectivamente. No CR, apenas o tratamento Ab-V5+0401 apresentou diferença significativa. Enquanto a MSPA, os dois melhores tratamentos foram Ab-V5+0401 e Ab-V5+BR935 com um incremento de 2.4 e 2.1 vezes. Na MSR e na MT, as combinações Ab-V5+0401, Ab-V5+BR935 e BR935+0401 demonstraram melhor acúmulo de biomassa, seguido dos consórcios com Ab-V6 (Figura 2A).

Na cultivar Camarosa (CA), todas as combinações também se mostraram benéficas (Tabela 5). O CPA apresentou maior incremento no tratamento Ab-V5+BR935 (1.38 vezes), seguido do Ab-V5+0401 (1.27 vezes). No CR, os tratamentos que tinham a cepa *A. brasilense* Ab-V5 apresentaram valores similares ao controle, os demais tratamentos tiveram valores inferiores. Na MSPA, os tratamentos Ab-V5+BR935 e Ab-V5+0401 proporcionaram aumentos de aproximadamente 2.3 e 2.1 vezes, respectivamente.

Por outro lado, a MSR teve um incremento em todos os tratamentos com valores entre 1.91 e 3.28 vezes. Por último, a MT indicou que todos os tratamentos tiveram diferença significativa em comparação ao controle, com destaque para o tratamento o Ab-V5+BR935, que proporcionou o maior aumento nesta cultivar (Figura 2A). É importante destacar que, em ambas cultivares, os consórcios formados com a cepa Ab-V5 apresentaram maiores incrementos no acúmulo de biomassa, embora os tratamentos com a cepa Ab-V6 também induziram um aumento desta quando comparado com os tratamentos individuais.

Tabela 5 - Variáveis fitotécnicas na cultivares de morangueiro biotizadas em consórcios

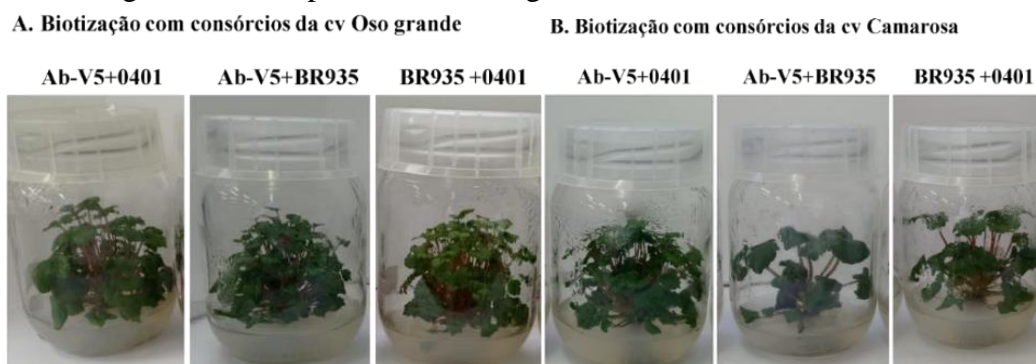
Consórcios <i>in vitro</i> Cultivar Oso Grande					
Tratamentos	Comprimento (cm)		Massa seca (mg)		
	Comprimento parte aérea (CPA)	Comprimento da raiz (CR)	Massa seca parte aérea (MSPA)	Massa seca da raiz (MSR)	Massa total (MT)
Ab-V5 + BR935	4.98 ± 0.02 ^{a, b}	3.65 ± 0.02 ^c	356.17 ± 1.1 ^b	113.6 ± 1.2 ^b	469.8 ± 1.5 ^b
Ab-V5 + 0401	5.43 ± 0.01 ^a	5.60 ± 0.02 ^a	397.83 ± 1.4 ^a	135.0 ± 0.9 ^a	532.8 ± 1.7 ^a
BR935 + 0401	4.53 ± 0.01 ^{b, c}	3.52 ± 0.08 ^c	297.67 ± 1.0 ^c	114.83 ± 0.3 ^b	412.5 ± 1.0 ^c
Ab-V6 + BR935	4.58 ± 0.04 ^{b, c}	2.97 ± 0.01 ^d	244.4 ± 1.2 ^d	83.3 ± 0.7 ^c	327.7 ± 1.5 ^d
Ab-V6 + 0401	4.13 ± 0.3 ^{c, d}	2.05 ± 0.2 ^e	257.1 ± 1.3 ^d	71.0 ± 1.0 ^d	328.1 ± 1.3 ^d
Controle	3.9 ± 0.03 ^d	4.95 ± 0.01 ^b	165.33 ± 0.4 ^e	35.67 ± 0.1 ^e	201.0 ± 0.5 ^e
Consórcios <i>in vitro</i> Cultivar Camarosa					
Tratamentos	Comprimento (cm)		Massa seca (mg)		
	Comprimento parte aérea (CPA)	Comprimento da raiz (CR)	Massa seca parte aérea (MSPA)	Massa seca da raiz (MSR)	Massa total (MT)
Ab-V5 + BR935	5.43 ± 0.01 ^a	5.08 ± 0.02 ^a	362.0 ± 0.6 ^a	120.0 ± 0.6 ^a	482.0 ± 1.1 ^a
Ab-V5 + 0401	5.03 ± 0.09 ^b	4.95 ± 0.01 ^a	332.67 ± 2.0 ^b	118.0 ± 1.0 ^a	450.67 ± 2.2 ^b
BR935 + 0401	4.38 ± 0.01 ^c	2.42 ± 0.03 ^b	318.3 ± 0.8 ^b	97.3 ± 1.1 ^b	415.6 ± 1.0 ^c
Ab-V6 + BR935	4.35 ± 0.03 ^c	2.55 ± 0.04 ^b	281.5 ± 1.2 ^c	82.5 ± 0.3 ^c	364.0 ± 1.3 ^d
Ab-V6 + 0401	3.4 ± 0.01 ^e	1.40 ± 0.03 ^c	225.1 ± 0.6 ^e	70.0 ± 0.5 ^d	295.1 ± 0.9 ^e
Controle	3.93 ± 0.01 ^d	4.82 ± 0.01 ^a	157.28 ± 0.6 ^d	36.5 ± 0.2 ^e	198.67 ± 0.8 ^f

Variáveis fitotécnicas das microplantas das cultivares Oso Grande e Camarosa biotizadas com consórcios após o término do cultivo *in vitro*. Comprimento parte aérea (CPA), Comprimento da raiz (CR), Massa seca parte aérea (MSPA), Massa seca da raiz (MSR), Massa total (MT). Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$).

Fonte: Da autora (2024).

Notou-se que a biotização com os consórcios Ab-V5 + 0401, Ab-V5 + BR935, BR935 + 0401 favoreceu a formação de maior número de microbrotos na cv OG com a formação de 8 a 12 aproximadamente, os consórcios formados com a cepa Ab-V6 tiveram menor formação destes com valores entre 3 a 6 microbrotos, por outro lado na cv CA se verificou que o consórcio Ab-V5 + 0401 foi o que teve maior formação de microbrotos (Figura 4B).

Figura 4 - Microplantas de morangueiro biotizadas com consórcios

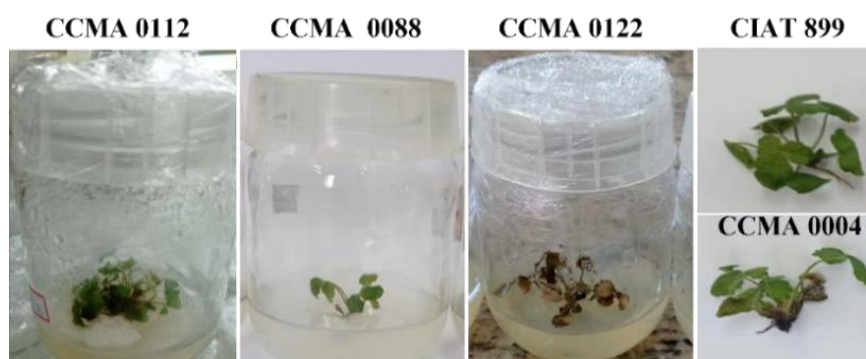


Microplantas de morangueiro biotizadas em consórcios *in vitro*. (A) cultivar Oso Grande e (B) cultivar Camarosa.

Fonte: Da autora (2024).

De modo geral, observou-se que as cepas de Ab-V5 e Ab-V6, o *R. leucaneae* BR935 e o *B. subtilis* CCMA 0401 foram as que apresentaram relação positiva na promoção de crescimento vegetal do morangueiro em condições *in vitro*, tanto na biotização individual quanto em consórcios. Ademais, notou-se que o *S. fredii* BR921 revelou valores próximos ao controle em ambas cultivares, por outro lado, 50% das cepas bacterianas (CIAT 899 *R. tropici*, CCMA 0122 *S. fredii*, CCMA 0088 *B. japonicum*, CCMA 0004 *B. megaterium* e CCMA 0112 *B. amyloliquefaciens*) apresentaram valores inferiores ao controle, limitando o crescimento das microplantas de morangueiro nas condições *in vitro*. Também se observou que a biotização com CCMA 0112 *B. amyloliquefaciens* não foi favorável após 72 h da co- inoculação, devido ao crescimento excessivo da bactéria no meio de cultura MS em ambas cultivares biotizadas (Figura 5).

Figura 5 - Microplantas biotizadas que apresentaram um efeito negativo na promoção de crescimento



Microplantas biotizadas que apresentaram respostas negativas após o processo de co-inoculação. CCMA0112: *B. amyloliquefaciens*; CCMA 0088: *B. japonicum* CCMA0122: *S. fredii*; CIAT 899:*R. tropici*, CCMA004: *B. megaterium*

Fonte: Da autora (2024).

3.4 Quantificação de clorofila

Na cultivar OG, a produção de clorofila *a* clorofila *b* e carotenóides esteve em maior concentração quando biotizadas com o consórcio Ab-V5+ 0401. Também se encontrou que a clorofila *a* teve aumentos no tratamento individual com Ab-V5 e nas microplantas biotizadas com os cinco consórcios quando comparados com o controle. Na clorofila *b* o consórcio Ab-V5+BR935 também se destacou, por último, os carotenóides também aumentaram em todos os tratamentos com os consórcios e no tratamento individual com Ab-V5 (Tabela 7). Na cv CA se encontrou que a clorofila *a* foi aumentada em três tratamentos, na biotização com os consórcios Ab-V5+0401 e Ab-V6+0401, e na biotização individual com Ab-V6. A clorofila *b*

se destacou principalmente nos tratamentos com consórcio Ab-V5+0401 e no tratamento individual com Ab-V5. Nos carotenóides, novamente destacou-se o tratamento com Ab-V5+0401, seguido do Ab-V6+0401, Ab-V6+BR935 e os demais consórcios, os tratamentos individuais com BR935, Ab-V6 e Ab-V5 estiveram logo após com valores próximos ao controle (Tabela 6).

Tabela 6 - Quantificação de clorofilas e carotenóides nas cultivares in vitro

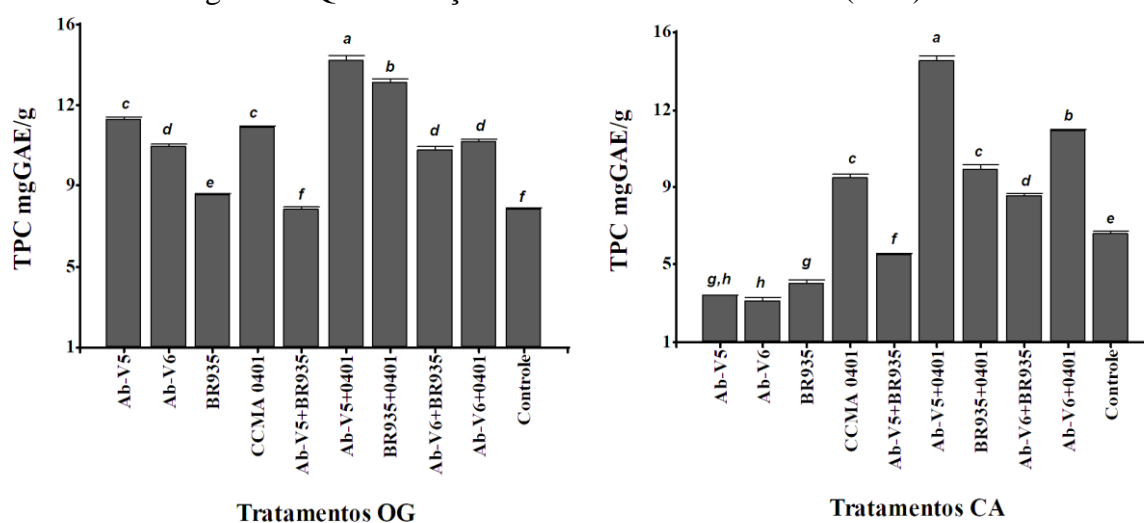
Tratamentos	Cv Oso grande			Cv Camarosa		
	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Carotenóides	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Carotenóides
<i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5	7.61±0.04 ^b	0.85±0.01 ^{c, d, e}	1.12 ±0.01 ^{b, c}	5.24±0.2 ^{c, d, e}	1.24±0.06 ^a	1.09±0.06 ^{b, c}
<i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V6	5.19±0.17 ^e	0.54±0.03 ^f	0.88±0.02 ^{d, e}	6.14±0.02 ^{b, c}	0.85±0.03 ^{c, d}	1.10±0.08 ^{b, c}
<i>Rhizobium leucaneae</i> BR935	3.43±0.21 ^f	0.96±0.06 ^c	0.87±0.06 ^{d, e}	4.86±0.03 ^{d, e, f}	1.13±0.01 ^{a, b, c}	1.15±0.09 ^{b, c}
<i>Bacillus subtilis</i> CCMA 0401	5.95±0.05 ^e	0.65±0.01 ^{c, f}	0.94±0.01 ^{c, d, e}	4.19±0.3 ^f	0.82±0.12 ^d	0.70±0.12 ^d
Ab-V5 + BR935	7.29±0.10 ^{b, c}	1.28±0.04 ^b	1.28±0.01 ^b	4.45±0.1 ^{e, f}	1.14±0.04 ^{a, b}	1.17 ±0.02 ^{b, c}
Ab-V5 + 0401	9.0±0.2 ^a	1.64±0.04 ^a	1.76±0.01 ^a	9.61±0.1 ^a	1.32±0.03 ^a	2.02±0.04 ^a
BR935 + 0401	6.81±0.21 ^{b, c, d}	0.91±0.04 ^{c, d}	1.01±0.02 ^{c, d}	5.58±0.1 ^{c, d}	0.93±0.01 ^{b, c, d}	1.19±0.08 ^{b, c}
Ab-V6 + BR935	7.09±0.37 ^{b, c}	0.95±0.04 ^{c, d}	1.22±0.06 ^b	5.16 ±0.2 ^{d, e}	0.69±0.03 ^d	1.35±0.05 ^b
Ab-V6 + 0401	6.63±0.08 ^{c, d}	0.75±0.01 ^{d, e}	1.11±0.02 ^{b, c}	6.68±0.04 ^b	0.78±0.01 ^d	1.77±0.09 ^a
Controle	5.30 ±0.10 ^e	0.69±0.02 ^{c, f}	0.75±0.01 ^e	5.61±0.1 ^{c, d}	0.87 ±0.02 ^{b, c, d}	1.0±0.02 ^{c, d}

Quantificação de clorofilas e carotenóides nas cultivares Oso grande e Camarosa. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$).

Fonte: Da autora (2024).

3.5 Quantificação do conteúdo total fenólico (TPC)

A cultivar OG apresentou maior acúmulo de conteúdo total fenólico (TPC) na maioria dos tratamentos, tanto em consórcios como na biotização individual quando comparado com a cultivar CA que teve maior acúmulo de TPC quando biotizadas com os consórcios e no tratamento individual com CCMA0401 (Figura 6).

Figura 6 - Quantificação do conteúdo total fenólico (TPC) *in vitro*

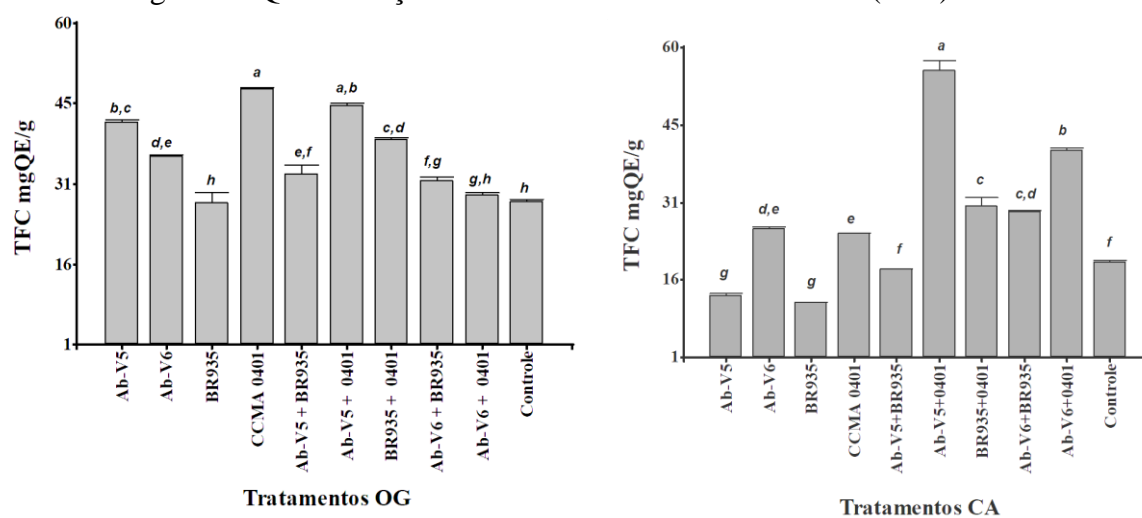
Quantificação do conteúdo total de fenólicos (TPC) nas cultivares Oso Grande e Camarosa. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$).

Fonte: Da autora (2024).

Desta forma, na cultivar OG, o consórcio conformado pelas cepas Ab-V5+0401 demonstrou o maior acúmulo de fenóis, com 14.37 mgGAE/g, seguido pelo BR935+0401 com 13.30 mgGAE/g. Em seguida, destacaram-se os tratamentos de biotização individual com as cepas Ab-V5 (11.59 mgGAE/g) e CCMA 0401 (11.20 mgGAE/g), quando comparados com o controle (7.43 mgGAE/g). Por outra parte, na cv CA, os melhores resultados no acúmulo de conteúdo total fenólico (TPC) foram observados nos consórcios formados pelas cepas Ab-V5+0401 (14.62 mgGAE/g), Ab-V6+0401 (11.24 mgGAE/g). Quanto à biotização individual, a cepa CCMA 0401 e o consórcio BR935+0401 mostraram um acúmulo similar, os demais tratamentos estiveram próximos ou abaixo do controle (6.27 mgGAE/g) (Figura 6).

3.6 Quantificação do conteúdo total de flavonóides (TFC)

Na cv OG, observou-se novamente que tanto os tratamentos individuais quanto os consórcios apresentaram maior acúmulo do conteúdo total de flavonóides (TFC) em comparação com a cultivar CA.

Figura 7 - Quantificação do conteúdo total de flavonóides (TFC) *in vitro*

Quantificação do conteúdo total de flavonóides (TFC) nas cultivares Oso Grande e Camarosa. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$).

Fonte: Da autora (2024).

Na cv OG, o maior acúmulo para o TFC foi obtido com o tratamento individual CCMA 0401 (47.96 mgQE/g), seguido pelo consórcio Ab-V5+0401 (45.03 mgQE/g). Em seguida, destacaram-se o tratamento individual com a cepa Ab-V5 (42.01 mgQE/g) e o consórcio BR935+0401 (38.71 mgQE/g), principalmente. Na cv CA, o consórcio formado por Ab-V5+0401 (55.66 mgQE/g) mostrou o melhor desempenho no acúmulo do conteúdo total de flavonóides (TFC), seguido pelo consórcio Ab-V6+0401 (40.55 mgQE/g), quando comparados com o controle que registrou valores próximos a 19.01 mgQE/g (Figura 7).

4 DISCUSSÃO

A seleção adequada de microrganismos benéficos na cultura de tecidos vegetais (CTV) é crucial para a biotização bem-sucedida das microplantas. Neste contexto, Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (BPCVs), fungos micorrízicos arbusculares (FMA), ou bactérias endofíticas naturalmente presentes nos explantes mantidos em cultivo *in vitro* podem induzir mudanças metabólicas e de desenvolvimento durante a interação (co- inoculação) explante-microrganismo (Kanani *et al.*, 2020; Soumare *et al.*, 2021; Ważny *et al.*, 2024). Essas alterações resultam em respostas fisiológicas ou bioquímicas que modulam o comportamento vegetal, refletindo-se na promoção de crescimento, no acúmulo de metabólitos secundários, na modulação de enzimas antioxidantes, no acúmulo do teor de clorofila, entre outras mudanças positivas ou negativas que possam ocorrer ao longo do co- cultivo (Gianinazzi *et al.*, 2003; Gianinazzi *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2020; Ważny *et al.*, 2024).

Durante o processo de colonização, a bactéria interage com a raiz da microplanta, desencadeando uma resposta vegetal que pode induzir uma quimiotaxia positiva com algumas cepas específicas, essa interação pode permitir uma colonização bem-sucedida, podendo resultar no estabelecimento da bactéria nas áreas internas da raiz. O ingresso bacteriano possivelmente ocorre pelos espaços de emergência das raízes e meristemas radiculares (Compant *et al.*, 2010; Botta *et al.*, 2013). Neste sentido, a formação de biofilme bacteriano pode influenciar significativamente na colonização inicial e na quimiotaxia positiva ou negativa (Rudrappa *et al.*, 2008; Beauregard *et al.*, 2013). No presente estudo, observou-se que 70% das (BPCVs) apresentaram uma formação de biofilme fracamente aderente (+). As bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* mostraram variações na formação de biofilme, CCMA 0401 *B. subtilis* e o CCMA 0004 *B. megaterium* exibiram uma formação de biofilme moderadamente aderente (++) e CCMA0401 apresentou um efeito positivo na promoção de crescimento vegetal, correspondendo ao 10%. Por outro lado, CCMA 0112 *B. amyloliquefaciens* demonstrou uma formação de biofilme fortemente aderente (+++) e após 48h a 72h, encontrou-se um crescimento excessivo após 72 h de co-cultivo em ambas as cultivares, o anterior pode estar relacionado à capacidade superior de *B. amyloliquefaciens* para formar biofilmes robustos, como relatado por Chen *et al.* (2013), o que pode explicar a colonização mais agressiva sob a microplantas e o meio MS.

Nesta pesquisa, avaliou-se o efeito de dez bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCVs) na biotização individual de microplantas de morangueiro. Se encontrou que o 40% das cepas, correspondentes *A. brasilense* Ab-V5, *A. brasilense* Ab-V6, *R. leucaneae* BR935 e *B. subtilis* CCMA 0401, promoveram significativamente o crescimento vegetal das microplantas em ambas as cultivares durante o co-cultivo *in vitro*. Por outro lado, o 60% das bactérias não apresentaram uma colonização positiva o que se refletiu na biomassa total e nos demais parâmetros fitotécnicos avaliados. A biotização também foi avaliada com consórcios bacterianos formados a partir das cepas selecionadas, as quais demonstram um aumento mais expressivo da biomassa da parte aérea, evidenciando efeitos sinérgicos positivos na promoção de crescimento. Assim, a biotização de morangueiro com FMA e BPCVs já tem sido relatada, inicialmente, avaliaram a inoculação com três fungos micorrízicos arbusculares (FMA) de espécies de *Glomus* na micropropagado da cv Senga Sengana, constatando que as três espécies de FMA aumentaram a biomassa comparadas com os controles (Williams *et al.*, 1992), Também tem-se relatos do uso de BPCVs no morangueiro em condições *in vitro*, num

estudo, realizaram a indução de calos e organogênese, com a co-inoculação com *Azomonas insígnia*, achando a presença da bactéria nos espaços intracelulares dos calos regenerados e obtendo a formação novos brotos que subsequentemente foram enraizados, aclimatados e plantados ao ar livre (Preininger *et al.*, 1997). Mais recentemente, utilizaram aquênios de morangueiro que foram expostos a compostos voláteis produzidos por *Arthrobacter agili* UMCV2, encontrando que estimularam sua germinação, além de que também avaliaram o *Bacillus methylotrophicus* M4-96, revelando que induziu a germinação através da produção de compostos difusíveis. Ambas as cepas estimularam o crescimento vegetal nas condições *in vitro*, evidenciando o potencial de diferentes mecanismos bacterianos na promoção do crescimento de morangueiro s. (Hernández-Soberano; Ruíz-Herrera; Valencia-Cantero, 2020). A biotização também tem sido explorada em outras culturas, com *Elaeis guineensis* jacq, onde tem-se relatos do uso de diferentes bactérias incluindo, *Azospirillum brasilense* Sp7 (ATCC 29729), *Bacillus sphaericus* (UPMB10) e *Azospirillum lipoferum* (CCM3863), *Herbaspirillum seropedicae* (Azlin *et al.*, 2007; Lim *et al.*, 2010; 2016;2018;2023; Noor *et al.*, 2013).

Neste contexto, a seleção adequada de inóculos, tanto individuais quanto multimicrobianos, torna-se relevante para identificar as combinações mais adequadas na formulação dos bioinoculantes na CTV (Kanani *et al.*, 2020). Destaca-se que as respostas fisiológicas podem variar entre as cultivares, o que reforça a necessidade de estudos específicos para cada espécie vegetal e combinações de microrganismos (Rouphael *et al.*, 2015; Ważny *et al.*, 2023; Tabacchioni *et al.*, 2021). Nossos resultados mostraram que na cv OG, o consórcio Ab-V5+0401 se destacou principalmente em quase todas as variáveis analisadas. Já na cv CA, os tratamentos compostos pelas cepas Ab-V5+BR935 e Ab-V5+0401 mostraram-se mais promissores nas variáveis fitotécnicas avaliadas. Notavelmente, em ambas as cultivares todas as combinações de consórcios tiveram um efeito significativo no acúmulo da biomassa aérea, e na formação de brotos, principalmente aqueles que continham a cepa Ab-V5.

Por outra parte, as clorofilas e os carotenóides desempenham papéis fundamentais nos processos fotossintéticos e na proteção contra o estresse oxidativo. A clorofila, sendo o principal pigmento fotossintético, é responsável pela absorção de luz solar e sua conversão em energia química, essencial para a produção de carboidratos nas plantas (Pérez-Gálvez *et al.*, 2020). Já os carotenóides, além de auxiliarem na captura e transferência de energia luminosa para a clorofila, possuem propriedades antioxidantes que neutralizam radicais livres e protegem os tecidos vegetais dos danos oxidativos (Lichtenthaler; Buschmann, 2001). Essas propriedades antioxidantes também são reconhecidas por seus potenciais benefícios à saúde

humana, especialmente na prevenção de doenças crônicas, como câncer e doenças cardiovasculares (Pérez-Gálvez *et al.*, 2020; Roca *et al.*, 2014). Nesta pesquisa se encontrou que na quantificação de clorofila *a* clorofila *b* e carotenóides a biotização com os consórcios bacterianos induziu modulações nos acúmulos destes destacando-se principalmente o consórcio Ab-V5+0401 em ambas as cultivares. Além disso, na cultivar OG a clorofila *a* também foi aumentada no tratamento com Ab-V5, e a clorofila *b* também se incrementou no consórcio Ab-V5+BR935, por último, os carotenóides estiveram aumentados em todos os consórcios e no tratamento com Ab-V5. Já na cv CA se observou que além do tratamento Ab-V5+0401 foi o que se destacou nestes parâmetros avaliados, e na clorofila *b* também se refletiu nos tratamentos Ab-V5 e Ab-V5 + BR935, os carotenóides mantiveram maior acúmulo no tratamento Ab-V5+0401, seguido do Ab-V6+0401 e Ab-V6+BR935 os demais tratamentos estiveram próximos ou menor ao controle, o anterior destaca a modulação do sistema fotossintético pela biotização.

Os compostos fenólicos presentes no morangueiro podem influenciar na bioatividade dos extratos, a qualidade, as características sensoriais e organolépticas, assim como também ter efeitos benéficos na saúde (Fierascu *et al.*, 2020; Guiné *et al.*, 2020; Kajdzanoska *et al.*, 2011). Na cv OG, o conteúdo de fenólico total (TPC) revelou que o consórcio Ab-V5+0401 apresentou o maior acúmulo com 14.37 mgGAE/g, seguido pelos tratamentos da biotização com as cepas BR935+0401, Ab-V5 e CCMA 0401, em comparação com o controle. Na cv CA, quatro consórcios tiveram maior influência no acúmulo de TPC, destacando-se novamente o consórcio Ab-V5+0401 (14.62 mgGAE/g), seguido por Ab-V6+0401 (11.24 mgGAE/g), e Ab-V6+BR935 (9.37 mgGAE/g). Na biotização individual, apenas CCMA 0401 (8.95 mgGAE/g) apresentou um acúmulo de TPC superior ao controle (6.27 mgGAE/g). Alguns estudos tem explorado os efeitos da biotização, assim, Dominguez *et al.* (2022), relataram que a biotização com endófitos (*T. asperellum* e *B. subtilis*) em microplantas *M. spicata* foi eficaz na fase de enraizamento, melhorando a sobrevivência das plântulas durante a fase de aclimação com valores entre 95% a 93%. O tratamento com o *T. asperellum*, resultou em maior acúmulo de fenóis (280 mg GAE/100 mg) e reduziu a incidência da doença de *Rhizoctonia* sp em 8 %, enquanto *B. subtilis* reduziu a incidência da doença em 10%. Também tem se relatos de microrganismos endofíticos utilizados na biotização durante a micropropagação como uma alternativa para melhorar a qualidade da cultura além de aumentar o conteúdo de metabólitos especializados, como flavonóides e compostos fenólicos em geral (Villamarín *et al.*, 2019; Quambusch *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2016).

Os flavonóides, importantes metabólitos secundários encontrados em morangueiros, desempenham um papel crucial na defesa da planta e na qualidade nutricional podendo exibir diversos efeitos benéficos, incluindo atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, imunomoduladoras, antimicrobianas, entre outras (Pinto *et al.*, 2008, Pinto *et al.*, 2010; Aaby *et al.*, 2012). Estudos recentes têm demonstrado que a interação planta- BPCVs pode desencadear modulações desses compostos ao atuarem como elicitores estimulando a biossíntese de flavonóides e outros metabólitos secundários (Kumar *et al.*, 2021; Ortiz- Rivera *et al.*, 2021). Nesta pesquisa, observou-se que o conteúdo total de flavonóides na cv OG foi maior no tratamento de biotização individual com a cepa CCMA0401 (47.96 mgQE/g), seguido pelo consórcio Ab-V5+0401 (45.03 mgQE/g). Já na cultivar CA destacou-se novamente o consórcio Ab-V5+0401 (55.66 mgQE/g), seguido do Ab-V6+0401 (40.55 mgQE/g) como os tratamentos que proporcionaram maior acúmulo de (TFC). Esses resultados evidenciam que as BPCVs têm potencial para modular o conteúdo de flavonóides, podendo ser uma estratégia promissora para melhorar aspectos agrônômicos e nutricionais (Chamam *et al.*, 2013; Miotto-Vilanova *et al.*, 2019).

Assim, as BPCVs estudadas nesta pesquisa foram previamente testadas no (LCT/LABIMP-UFLA) num estudo anterior, constatou-se que as duas cepas de *A. brasilense*, Ab-V5, Ab-V6, eram produtoras de auxinas, giberelinas e ácido salicílico, enquanto *B. Subtilis* CCMA 0401 foi descrito como produtor de ACCd, giberelinas, ácido salicílico (Molina *et al.*, 2024). E durante a biotização de duas cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.), observou-se que as cepas *A. brasilense* Ab-V5 e *R. tropici* CIAT 899 aumentaram significativamente pelo menos um parâmetro de crescimento em ambas as cultivares, tanto em condições *in vitro* quanto *ex vitro*. Além disso, foram avaliadas as respostas das melhores bactérias em consórcios. Os resultados indicaram que as combinações mais eficazes foram *A. brasilense* Ab-V5 + *B. megaterium* e *A. brasilense* Ab-V5 + *R. tropici* CIAT 899, as quais apresentaram maior taxa de crescimento *in vitro* e *ex vitro* (Molina *et al.*, 2024).

Nossos resultados, revelaram que as bactérias com maior afinidade foram *A. brasilense* Ab-V5, *B. subtilis* CCMA 0401, *R. leucaneae* BR935 e o *A. brasilense* Ab-V6. Estas cepas mostraram efeitos positivos nos parâmetros fitotécnicos nas condições *in vitro* assim como na formação dos consórcios bacterianos, o que se corrobora com os achados de Backer *et al.* (2018), onde destacaram a importância da compatibilidade entre diferentes cepas bacterianas na formação de consórcios eficientes para a promoção do crescimento vegetal e formulação de bioestimulantes. Por outro lado, se observou que o *B. megaterium* e *R. tropici* CIAT 899 não favoreceram o desenvolvimento da microplantas biotizadas de morangueiro, o

que ressalta a importância da especificidade planta-microrganismo, como apontado por Compant et al. 2019. Pois a eficácia diferencial das cepas bacterianas entre as espécies vegetais pode ser atribuída a diversos fatores, incluindo diferenças na composição dos exsudatos radiculares, na estrutura do sistema radicular e nas condições micro ambientais (Etesami; Maheshwari, 2018). Além disso, as interações específicas entre os genótipos das plantas e as cepas bacterianas podem influenciar significativamente o sucesso da colonização e os efeitos promotores de crescimento (Patel; Saraf, 2017).

Assim, os gêneros *Azospirillum*, *Rhizobium* e *Bacillus* demonstraram capacidade de melhorar a resposta de promoção de crescimento vegetal, além de induzir modulações metabólicas no conteúdo de fenóis e flavonóides nas microplantas durante o co-cultivo *in vitro*. Desta forma, a biotização se configura como uma ferramenta biotecnológica que pode ser usada na fase de multiplicação ou de enraizamento durante o cultivo *in vitro* atuando como bioestimulantes (Nowak, 1998; Orlikowska et al., 2017; Kanani et al., 2020; Soumare et al., 2021). Dentre os próximos desafios destaca-se a necessidade de explorar como a biotização pode-se estabelecer como uma alternativa eficaz para facilitar a adaptação das microplantas às condições *ex vitro*. Esta fase é crítica devido às mudanças abruptas nas condições ambientais, como variações na umidade relativa, intensidade luminosa, disponibilidade de nutrientes (Romano; Martins-Loução, 2003; Hazarika, 2006), e a preparação da microplantas com BPCVs poderia contribuir na adaptação aos novos desafios, não entanto, mais pesquisas são necessárias para otimizar os protocolos de biotização e entender melhor as interações planta-microrganismo durante a transição para o ambiente *ex vitro*.

5 CONCLUSÃO

Para a biotização *in vitro* de microplantas de morangueiro as cepas bacterianas selecionadas como promissoras são *A. brasilense* Ab-V5, *A. brasilense* Ab-V6, *B. subtilis* CCMA 0401 e *R. leucaneae* BR935, tanto individualmente quanto em consórcio. As cepas selecionadas possibilitam modulações fitotécnicas e metabólicas que influenciam o desenvolvimento vegetal de propágulos de morangueiro durante a micropropagação.

REFERÊNCIAS

- AABY, K. et al. Phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits: Composition in 27 cultivars and changes during ripening. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 86-97, 2012.
- ABDALLA, N. et al. An Academic and Technical Overview on Plant Micropropagation Challenges. **Horticulturae**, v. 8, n. 8, p. 677, ago. 2022.
- AJIJAH, N.; FIODOR, A.; PANDEY, A. K.; RANA, A.; PRANAW, K. Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) with Biofilm-Forming Ability: A Multifaceted Agent for Sustainable Agriculture. **Diversity**, v. 15, n. 1, p. 112, 2023. DOI: 10.3390/d15010112.
- ANDRADE, G. et al. Plant-endophytic bacteria interactions associated with root and leaf microbiomes of *Cattleya walkeriana* and their effect on plant growth. **Scientia Horticulturae**, v. 309, p. 111656, 1 fev. 2023.
- ANTUNES, L. E. C. et al. **Morangueiros: os desafios da produção brasileira**. 2023.
- ARAÚJO, R. C. et al. Acclimatization of *Musa* spp. seedlings using endophytic *Bacillus* spp and *Buttiauxella agrestis* strains. **Microbiological Research**, v. 248, p. 1-12, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126750>
- ARAÚJO, R. C. et al. Association of growth-promoting bacteria and hydroponic system aiming at reducing the time of production of banana seedlings. **Archives of Agronomy and Soil Science**, 2022. <https://doi.org/10.1080/03650340.2022.2078965>
- ARIZA, M. T. et al. Strawberry Achenes Are an Important Source of Bioactive Compounds for Human Health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 7, p. 1103, 11 jul. 2016.
- ARIZA, M.T.; REBOREDO-RODRÍGUEZ, P.; CERVANTES, L.; SORIA, C.; MARTÍNEZ-FERRI, E.; GONZÁLEZ-BARREIRO, C.; CANCHO-GRANDE, B.; BATTINO, M.; SIMAL-GÁNDARA, J. Bioaccessibility and potential bioavailability of phenolic compounds from achenes as a new target for strawberry breeding programs. **Food Chemistry**, v. 248, p. 155-165, 2018. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.11.105.
- ARSLAN, E.; AKKAYA, Ö. Biotization of *Arabidopsis thaliana* with *Pseudomonas putida* and assessment of its positive effect on *in vitro* growth. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 56, 2 jan. 2020.
- ARYA, R. et al. Fertilizer adaptive bacteria *Acidovorax valerianellae* and *Sinorhizobium fredii* in integrated nutrient management of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.). **South African Journal of Botany**, Current and Future Directions in Endophyte Research. v. 134, p. 84–90, 1 nov. 2020.
- AZLIN, C. et al. Effect of plant growth-promoting rhizobacteria on root formation and growth of tissue cultured oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 549-554, 2007.

BABALOLA, O. O. Beneficial bacteria of agricultural importance. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 11, p. 1559–1570, nov. 2010.

BACKER, R. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1473, 2018.

BALSANELLI, E. et al. Molecular adaptations of *Erbspirillum seropedicae* during colonization of the maize rhizosphere. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 8, p. 2343–2356, 2016.

BASSON, A.; FLEMMING, L. A.; CHENIA, H. Y. Evaluation of Adherence, Hydrophobicity, Aggregation, and Biofilm Development of *Flavobacterium johnsoniae*-Like Isolates. **Microbial Ecology**, v. 55, n. 1, p. 1–14, 1 jan. 2008.

BEAUREGARD, P. B. et al. *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 17, p. E1621-E1630, 2013.

BHATT, I. Micropropagation of Indian Wild Strawberry. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 1 jan. 2000.

BLANCO, E. et al. **Selección de un consorcio microbiano promotor del crecimiento de plántulas de cebolla en condiciones de umbráculo** [Selection of a growth promoter microbial consortium in onion seedlings under shade-house conditions]. v. 38, p. 301–321, 1 abr. 2021.

BOTTA, A. L. et al. *In vitro* and *in vivo* inoculation of four endophytic bacteria on *Lycopersicon esculentum*. **New Biotechnology, Biotechnology for the Bio and Green Economy**. v. 30, n. 6, p. 666–674, 25 set. 2013.

BOXUS, P. H. The production of strawberry plants by *in vitro* micro-propagation. **Journal of Horticultural Science**, v. 49, n. 3, p. 209–210, 1 jan. 1974.

BOXUS, P. Micropropagation of Strawberry via Axillary Shoot Proliferation. Em: HALL, R. D. (Ed.). **Plant Cell Culture Protocols**. Methods In Molecular Biology™. Totowa, NJ: Humana Press, 1999. p. 103–114.

CARDOSO, O. et al. Potencial anti- *Helicobacter pylori* de *Agrimonia eupatoria* L. e *Fragaria vesca*. **Journal of Functional Foods**, v. 44, p. 299–303, 1 maio 2018.

CARVALHO, J. M. F. C.; SILVA, M. M. DE A.; MEDEIROS, M. J. L. E. **Fatores inerentes à micropropagação**. 2006.

CASTRO, M. R. DA C. B. E et al. A Novelty System for Biotization of Plant Microshoots and Collection of Natural Compounds. **Methods and Protocols**, v. 2, n. 1, p. 5, 7 jan. 2019.

CASTRO-RESTREPO, D. et al. Biotization of Endophytes *Trichoderma asperellum* and *Bacillus subtilis* in *Mentha spicata* Microplants to Promote Growth, Pathogen Tolerance and Specialized Plant Metabolites. **Plants**, v. 11, n. 11, p. 1474, jan. 2022a.

CAVALCANTI, V. P. et al. Yeasts and *Bacillus* spp. as potential biocontrol agents of *Sclerotinia sclerotiorum* in garlic. **Scientia Horticulturae**, v. 261, p. 108931, 5 fev. 2020.

CHANDRAN, H. et al. Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. **Biotechnology Reports** (Amsterdam, Netherlands), v. 26, p. e00450, jun. 2020.

CHANDRAN, H.; MEENA, M.; SWAPNIL, P. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria as a Green Alternative for Sustainable Agriculture. **Sustainability**, v. 13, n. 19, p. 10986, jan. 2021.

CHANG, C. C. et al. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, n. 3, p. 178-182, 2002.

CHEN, Y. et al. Comparative analysis of the genes involved in the biofilm formation of *Bacillus amyloliquefaciens*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 131-140, 2013.

COMPANT, S. et al. A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. **Journal of Advanced Research**, v. 19, p. 29-37, 2019.

COMPANT, S. et al. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 669-678, 2010.

DI RIENZO, J. A., CASANOVES, F., BALZARINI, M. G., GONZALEZ, L., TABLADA, M., & ROBLEDO, C. W. (2020). **InfoStat versión 2018**. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.

DIAS, A. C. F. et al. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 189–195, 1 fev. 2009.

DOMINGUEZ, M. I. et al. Biotization of Endophytes *Trichoderma asperellum* and *Bacillus subtilis* in *Mentha spicata* Microplants to Promote Growth, Pathogen Tolerance and Specialized Plant Metabolites. **Plants**, v. 11, n. 11, p. 1474, 2022.
<https://doi.org/10.3390/plants11111474>

EL HAMDOUNI, E. M.; LAMARTI, A.; BADOUC, A. *In vitro* germination of the achenes of Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) cvs Chandler and Tudla. **Bulletin-Societe de Pharmacie de Bordeaux**, v. 140, n. 1/4, p. 31–42, 2001.

ESPINOZA, R. et al. Biotization and *in vitro* plant cell cultures: plant endophyte strategy in response to heavy metals knowledge in assisted **phytoremediation**. p. 27–36. 2021

ETESAMI, H.; MAHESHWARI, D. K. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 156, p. 225-246, 2018.

FERREIRA, Daniel Furtado. **Sisvar: sistema de análise de variância**. Versão 5.8 [software]. Lavras: UFLA, 2023.

FIERASCU, R. C. et al. Fragaria Genus: Chemical Composition and Biological Activities. **Molecules**, v. 25, n. 3, p. 498, 23 jan. 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25030498>

FLORES-FÉLIX, J. D. et al. Rhizobium and Phyllobacterium bacterial inoculants increase bioactive compounds and quality of strawberries cultivated in field conditions. **Food Research International** (Ottawa, Ont.), v. 111, p. 416–422, set. 2018.

FUKAMI, J.; CEREZINI, P.; HUNGRIA, M. Azospirillum: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 73, 4 maio 2018.

FUMAGALLI, M. et al. Strawberry tannins inhibit IL-8 secretion in a cell model of gastric inflammation. **Pharmacological Research**, v. 111, p. 703–712, set. 2016.

GASPARRINI, M. et al. Anti-inflammatory effect of strawberry extract against LPS-induced stress in RAW 264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, v. 102, p. 1–10, abr. 2017.

GIANINAZZI, S. et al. Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. **Mycorrhiza**, v. 20, p. 519-530, 2010. DOI: 10.1007/s00572-010-0333-3.

GIANINAZZI, S. et al. Biotization of microplants for improved performance. **Acta Horticulturae**, v. 625, p. 165-172, 2003. DOI: 10.17660/ActaHortic.2003.625.17.

GOSWAMI, D. et al. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, n. 1, p. 1127500, 2016.

GRAY, R. N. T., Dennis J. (ED.). *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology*. Boca Raton: CRC Press, 2010.

GUINE, R. P. F. et al. Evaluation of phenolic and antioxidant properties of strawberry as a function of extraction conditions. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 23, e2019142, 2020. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.14219>

GUO, L. et al. Developmental regulation of stolon and rhizome. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 59, p. 101970, fev. 2021.

HADDADI, F. et al. Micropropagation of Strawberry cv. Camarosa: Prolific Shoot Regeneration from *In Vitro* Shoot Tips Using Thidiazuron with N6-benzylamino-purine. **HortScience: a publication of the American Society for Horticultural Science**, v. 45, 1 mar. 2010.

HANHINEVA, K.; KOKKO, H.; KÄRENLAMPI, S. Shoot Regeneration from Leaf Explants of Five Strawberry (*Fragaria x ananassa*) Cultivars in Temporary Immersion Bioreactor System. **In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant**, v. 41, n. 6, p. 826–831, 2005.

HAYAT, S. et al. Role of proline under changing environments: a review. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, n. 11, p. 1456-1466, 2012.

HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, v. 108, n. 2, p. 105–120, 10 abr. 2006.

HERNÁNDEZ-SOBERANO, C.; RUÍZ-HERRERA, L. F.; VALENCIA-CANTERO, E. Endophytic bacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 and *Bacillus methylotrophicus* M4-96 stimulate achene germination, *in vitro* growth, and greenhouse yield of strawberry (*Fragaria × ananassa*). **Scientia Horticulturae**, v. 261, p. 109005, 5 fev. 2020.

HUANG, M. et al. Protective effects of non-extractable phenolics from strawberry against inflammation and colon cancer *in vitro*. **Food Chemistry**, v. 374, p. 131759, 16 abr. 2022.

KAJDZANOSKA, M.; PETRESKA, J.; STEFOVA, M. Comparison of different extraction solvent mixtures for characterization of phenolic compounds in strawberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 10, p. 5272-5278, 2011.
<https://doi.org/10.1021/jf2007826>

KANANI, P.; MODI, A.; KUMAR, A. 15 - Biotization of endophytes in micropropagation: A helpful enemy. Em: KUMAR, A.; SINGH, V. K. (Eds.). *Microbial Endophytes*. Woodhead Publishing Series in Food Science, **Technology and Nutrition**. Woodhead Publishing, 2020. p. 357–379.

KANANI, P.; MODI, A.; KUMAR, A. Biotization of endophytes in micropropagation: A helpful enemy. Em: **Microbial Endophytes**. p. 357–379. 2020.

KARIM, R. et al. Varietal Improvement of Strawberry (*Fragaria x ananassa* Dutch.) Through Somaclonal Variation Using *In Vitro* Techniques. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 17, p. 977–986, 1 jul. 2015.

KARIMI, E. et al. Biofilm forming rhizobacteria affect the physiological and biochemical responses of wheat to drought. **AMB Express**, v. 12, p. 93, 14 jul. 2022.

KAVI KISHOR, P. B. et al. Role of proline in cell wall synthesis and plant development and its implications in plant ontogeny. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 544, 2015. doi: 10.3389/fpls.2015.00544

KOUR, D. et al. Microbial biofertilizers: Bioresources and eco-friendly technologies for agricultural and environmental sustainability. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 23, p. 101487, 2020.

KRASOVA, Y. V. et al. Lipopolysaccharide and flagellin of *Azospirillum brasilense* Sp7 influence callus morphogenesis and plant regeneration in wheat. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 4, p. 62, 24 fev. 2022.

KUMAR, A. et al. Microbial elicitation of secondary metabolites using plant-microbe interactions. *Journal of Applied Microbiology*, v. 130, n. 6, p. 1959-1972, 2021.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Extraction of photosynthetic tissues: chlorophylls and carotenoids. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, v. 1, p. F4.2.1-F4.2.6, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0402s01>

- LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Extraction of photosynthetic tissues: chlorophylls and carotenoids. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, v. 1, p. F4.2.1-F4.2.6, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0402s01>.
- LIM, J. H. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria for biostimulation and biocontrol in horticultural crops. **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 61, n. 5, p. 719-736, 2020.
- LIM, K. A.; SHAMSUDDIN, Z. H.; HO, C. L. Transcriptomic changes in the root of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) upon inoculation with *Bacillus sphaericus* UPMB10. **Tree Genetics & Genomes**, v. 6, n. 5, p. 793-800, 2010. doi: 10.1007/s11295-010-0292-z
- LIM, S.-L. et al. Biotization of *in vitro* oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) and its plant-microbe interactions. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, 2023a.
- LIM, S-L. et al. Biotization of *in vitro* calli and embryogenic calli of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) with diazotrophic bacteria *Herbaspirillum seropedicae* (Z78). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 127, n. 2, p. 251-262, 2016.
- LIM, S-L. et al. Biotization of *in vitro* oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) and its plant-microbe interactions. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1150309, 2023. doi: 10.3389/fpls.2023.1150309
- LIM, S-L. et al. Growth and biochemical profiling of artificially associated micropropagated oil palm plantlets with *Herbaspirillum seropedicae*. **Journal of Plant Interactions**, v. 13, n. 1, p. 173-181, 2018. doi: 10.1080/17429145.2018.1451564
- MADUMALI, H.; ABEYTHILAKARATHNA, P.; H. SERAN, T. Rooting performance of *in vitro* microshoots of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) as influenced by plant growth regulators. **AGRIEAST: Journal of Agricultural Sciences**, v. 15, p. 69, 28 dez. 2021.
- MASCIARELLI, O.; LLANES, A.; LUNA, V. A new PGPR co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* enhances soybean nodulation. **Microbiological Research**, v. 169, n. 7-8, p. 609-615, 2014.
- MATTIOLI R, COSTANTINO P, TROVATO M. Proline accumulation in plants: not only stress. **Plant Signal Behav.** 2009 Nov;4(11):1016-8. doi: 10.4161/psb.4.11.9797. Epub 2009 Nov 12. PMID: 20009553; PMCID: PMC2819507.
- MEMARI-TABRIZI, E. F.; YOUSEFPOUR-DOKHANIEH, A.; BABASHPOUR-ASI, M. Foliar-applied silicon nanoparticles mitigate cadmium stress through physio-chemical changes to improve growth, antioxidant capacity, and essential oil profile of summer savory (*Satureja hortensis* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 165, p. 71-79, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.04.040>.
- MEZZETTI B, GIAMPIERI F, ZHANG Y-T, ZHONG C-F. Status of strawberry breeding programs and cultivation systems. **Journal of Berry Research**. v 8, n. p.205-221. 2018. <https://doi.org/10.3233/JBR-180314>

MOLINA et al., **Impacto de isolados e consórcios bacterianos no crescimento e resposta da batata (*Solanum tuberosum* L.) ao estresse térmico *in vitro* e *in vivo***. Teses. Universidade Federal de Lavras. 2023.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.

NEHRA, N. S.; STUSHNOFF, C.; KARTHA, K. K. Regeneration of plants from immature leaf-derived callus of strawberry (*Fragaria* × *ananassa*). **Plant Science**, v. 66, n. 1, p. 119–126, 1 jan. 1990.

NOOR, A. S. et al. Influence of indole-3-acetic acid (IAA) produced by diazotrophic bacteria on root development and growth of *in vitro* oil palm shoots (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Journal of Oil Palm Research**, v. 25, n. 1, p. 100-107, 2013.

NOWAK, J. **Benefits of *in vitro* biotization of plant tissue cultures with microbial inoculants**. Benefits of *in vitro* biotization of plant tissue cultures with microbial inoculants, v. 34, n. 2, p. 122–130, 1998.

NOWAK, J. et al. Behaviour of plant material issued from *in vitro* tuberization. **Potato Research**, v. 42, n. 3, p. 505–519, 1 set. 1999.

NOWICKA, A. et al. Comparison of polyphenol content and antioxidant capacity of strawberry fruit from 90 cultivars of *Fragaria* × *ananassa* Duch. **Food Chemistry**, v. 270, p. 32–46, 1 jan. 2019.

O'TOOLE, G. A. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. **Journal of Visualized Experiments** : JoVE, n. 47, p. 2437, 30 jan. 2011.

OMAR, G. F. et al. Somatic embryo-like structures of strawberry regenerated *in vitro* on media supplemented with 2,4-D and BAP. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 51, n. 9, p. 739–745, set. 2013.

ORTIZ-RIVERA, Y. et al. Effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) crop: a review. **Scientia Horticulturae**, v. 283, p. 110035, 2021.

PANG, W. Q. et al. Establishment of an efficient micropropagation protocol for Cameron Highlands White Strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) using a light emitting diode (LED) system. **South African Journal of Botany**, v. 157, p. 189–200, jun. 2023.

PATEL, T.; SARAF, M. Biosynthesis of phytohormones from novel rhizobacterial isolates and their *in vitro* plant growth-promoting efficacy. **Journal of Plant Interactions**, v. 12, n. 1, p. 480-487, 2017.

PEDRAZA, R. O. et al. Chapter 6 - Azospirillum. Em: AMARESAN, N. et al. (Eds.). **Beneficial Microbes in Agro-Ecology**. Academic Press, 2020. p. 73–105.

PEREIRA, E. et al. Effects of gamma irradiation on cytotoxicity and phenolic compounds of *Thymus vulgaris* L. and *Mentha piperita* L. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 370-377, 2016.

PÉREZ-GÁLVEZ, A.; VIERA, I.; ROCA, M. Carotenoids and Chlorophylls as Antioxidants. **Antioxidants**, v. 9, n. 6, p. 505, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antiox9060505>.

PINTO, M.; LAJOLO, F.; GENOVESE, M. Bioactive compounds and quantification of total ellagic acid in strawberries (*Fragaria × ananassa* Duch.). **Food Chemistry**, v. 107, n. 4, p. 1629-1635, 2008.

PINTO, S. et al. Evaluation of antiproliferative, anti-type 2 diabetes, and antihypertension potential of ellagitannins from strawberries (*Fragaria × ananassa* Duch.) using *in vitro* models. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 5, p. 1027-1035, 2010.

PREININGER, É. et al. *In vitro* establishment of nitrogen-fixing strawberry (*Fragaria × ananassa*) via artificial symbiosis with *Azomonas insignis*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 33, n. 3, p. 190–194, 1 jul. 1997.

QUAMBUSCH, M.; WINKELMANN, T. Bacterial endophytes in plant tissue culture: Mode of action, detection, and control. In: LOYOLA-VARGAS, V.; OCHOA-ALEJO, N. (eds) **Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology**, v. 1815. Humana Press, New York, NY, 2018. p. 69-88.

RATHER, G. A. et al. Chapter 17 - Tissue culture: A perpetual source for the conservation of medicinally important endangered plant species. Em: CHANDRA RAI, A. et al. (Eds.). **Advances in Plant Tissue Culture. Academic Press**, 2022. p. 373–393.

READ, P.; PREECE, J. Cloning: Plants - Micropropagation/Tissue Culture. Em: **Encyclopedia of Agriculture and Food Systems**. 2014 p. 317–336.

ROCA, M. et al. Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease. **Nutrients**, v. 6, n. 2, p. 466-488, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu6020466>.

ROMANO, A.; MARTINS-LOUÇÃO, M. A. Water loss and morphological modifications in leaves during acclimatization of cork oak micropropagated plantlets. **Acta Horticulturae**, v. 616, p. 439-442, 2003.

ROUPHAEL, Y. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi act as biostimulants in horticultural crops. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 91-108, 2015.

RUDRAPPA, T. et al. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. **Plant Physiology**, v. 148, n. 3, p. 1547-1556, 2008.

SAAD, A. I. M. et al. Plant Tissue Culture Media. Em: Recent Advances in Plant *in vitro* Culture. **IntechOpen**, 2012.

SAEEDI, S. A. et al. Growth, photosynthetic function, and stomatal characteristics of Persian walnut explants *in vitro* under different light spectra. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, 17 nov. 2023.

SILVA, L. I. DA et al. Fertilizer of the Future: Beneficial Bacteria Promote Strawberry Growth and Yield and May Reduce the Need for Chemical Fertilizer. **Agronomy**, v. 12, n. 10, p. 2465, out. 2022.

SIMIRGIOTIS, M. J. et al. Cytotoxic chalcones and antioxidants from the fruits of *Syzygium samarangense* (Wax Jambu). **Food Chemistry**, v. 107, n. 2, p. 813–819, mar. 2008.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144–158, 1965.

SOUMARE A, DIÉDHIYOU AG, ARORA NK, TAWFEEQ AL-ANILK, NGOM M, FALL S, HAFIDI M, OUHDOUCH Y, KOUISNI L, SY MO. Potential Role and Utilization of Plant Growth Promoting Microbes in Plant Tissue Culture. **Front Microbiol.** 2021 Mar 29;12:649878. doi: 10.3389/fmicb.2021.649878. PMID: 33854489; PMCID: PMC8039301.

SOUMARE, A. et al. Potential Role and Utilization of Plant Growth Promoting Microbes in Plant Tissue Culture. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 649878, 29 mar. 2021.

STEPANOVIĆ, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175–179, abr. 2000.

TABACCHIONI, S. et al. Identification of Beneficial Microbial Consortia and Bioactive Compounds with Potential as Plant Biostimulants for a Sustainable Agriculture. **Microorganisms**, v. 9, n. 2, p. 426, 19 fev. 2021.

TROVATO, M.; FORLANI, G.; SIGNORELLI, S.; FUNCK, D. Proline metabolism and its functions in development and stress tolerance. In *Osmoprotectant-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants: Recent Advances and Future Perspectives*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2019; pp. 41–72.

VAN DE VELDE, F. et al. Anti-inflammatory and wound healing properties of polyphenolic extracts from strawberry and blackberry fruits. **Food Research International** (Ottawa, Ont.), v. 121, p. 453–462, jul. 2019.

VILLAMARÍN-GALLEGOS, D. et al. *Trichoderma asperellum*, an inoculant for the production of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* Bertoni plants micropropagated in a temporary immersion bioreactor. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 19, n. 3, p. 1153–1161, 2020.

VINE, S. J. Improved Culture of Apical Tissues for Production of Virus-Free Strawberries. **Journal of Horticultural Science**, v. 43, n. 3, p. 293–297, 1 jan. 1968.

WANG, M.-R. et al. *In Vitro* Micrografting of Horticultural Plants: Method Development and the Use for Micropropagation. **Horticulturae**, v. 8, n. 7, p. 576, jul. 2022.

WAŻNY, R. et al. Bacteria Associated with Spores of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Improve the Effectiveness of Fungal Inocula for Red Raspberry Biotization. **Microbial Ecology**, v. 87, n. 1, p. 50, 11 mar. 2024.

WAŻNY, R. et al. Biotization of highbush blueberry with ericoid mycorrhizal and endophytic fungi improves plant growth and vitality. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, p. 4775-4786, 2022. DOI: 10.1007/s00253-022-12019-5.

WILLIAMS, S. et al. Effects of fertilizers and arbuscular mycorrhizal fungi on the post-vitro growth of micropropagated strawberry. **Agronomy**, v. 12, n. 10, p. 851–857, 1992.

YILDIRIM, A. B.; TURKER, A. U. Effects of regeneration enhancers on micropropagation of *Fragaria vesca* L. and phenolic content comparison of field-grown and *in vitro*-grown plant materials by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (LC–ESI-MS/MS). **Scientia Horticulturae**, v. 169, p. 169–178, abr. 2014.

ARTIGO 2 - Benefícios da biotização e re-inoculação *ex vitro* com bactérias promotoras de crescimento vegetal em mudas de morangueiro em casa de vegetação

Ana Milena Gómez Sepúlveda¹, Ederson da Conceição Jesus², Yulimar Castro Molina¹, Luna Queiroz Carvalho³, Gracielle Vidal² Moacir Pasqual³, Joyce Dória Rodrigues³.

¹ Departamento de Biologia, Programa Microbiologia agrícola, Lavras DBI, Brasil, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, Caixa Postal 37200-900, Brasil.

² Embrapa Agrobiologia, Rodovia BR-465, Km 7, Seropédica 23897-970, RJ, Brasil

³ Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, Lavras, MG 37200-900, Brasil.

E-mails: milena.biotec@outlook.com, ederson.jesus@embrapa.br, yulimarcastromolina@gmail.com
luna.carvalho@estudante.ufla.br, graciellevidal@hotmail.com, verabio@gmail.com, mpasqual@ufla.br,
joyce.doria@ufla.br

RESUMO

O uso da cultura de tecidos vegetais (CTV) permite a obtenção de explantes de uma planta matriz em um ambiente controlado de laboratório, garantindo condições ideais para o desenvolvimento inicial. O morangueiro, uma fruta de alto valor nutricional, já tem sido amplamente explorado em micropropagação *in vitro*. Contudo, uma das principais limitações enfrentadas pelas microplantas é a adaptação às condições *ex vitro*. Nesse contexto, o uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCVs) surge como uma alternativa promissora para restabelecer microrganismos benéficos nas mudas micropropagadas e melhorar seu desempenho. Neste estudo, foram caracterizadas dez cepas bacterianas quanto à sua capacidade de fixação biológica de nitrogênio, solubilização de nutrientes (fósforo, potássio, cálcio e zinco), produção de enzimas hidrolíticas (amilases, celulases, proteases, lipases e quitinases), sideróforos e cianeto de hidrogênio. Avaliou-se também a resposta *ex vitro* de duas cultivares de morangueiro, „Oso Grande“ (OG) e „Camarosa“ (CA), biotizadas com inóculos individuais ou consórcios de BPCVs dos gêneros *Azospirillum*, *Bacillus* e *Rhizobium*. Os resultados mostraram que todas as cepas fixaram nitrogênio biologicamente e solubilizaram fosfatos, enquanto 90% solubilizaram potássio, 40% cálcio e 50% zinco. Além disso, todas as cepas produziram ácidos orgânicos, com destaque para o gênero *Bacillus*, que também apresentou alta produção de enzimas hidrolíticas, sideróforos e HCN. A biotização e re-inoculação das microplantas em condições *ex vitro* aumentaram significativamente a taxa de sobrevivência das plântulas e, em alguns casos, promoveram o acúmulo de biomassa, modulando os teores de clorofilas, carotenoides, fenóis e flavonoides. Na cultivar OG, as cepas Ab-V5 e CCMA 0401 promoveram maior acúmulo de biomassa total, tanto na biotização quanto na re-inoculação, com destaque para os consórcios envolvendo Ab-V5. Já na cultivar CA, a cepa Ab-V5 foi a mais eficaz em ambas as condições, com o consórcio Ab-V5+0401 apresentando resultados promissores durante a re-inoculação. Assim, o uso de BPCVs demonstra grande potencial como ferramenta eficaz na cultura de tecidos vegetais, auxiliando na adaptação das microplantas às condições *ex vitro* e favorecendo o restabelecimento da microbiota benéfica.

Palavras-chave: Micropropagação; *Fragaria* × *ananassa* Duch; BPCV; Solubilização de nutrientes; Bioinoculantes.

ABSTRACT

The use of plant tissue culture (PTC) enables the production of explants from a mother plant under controlled laboratory conditions, ensuring optimal development. Strawberries, a fruit with high nutritional value, have been extensively explored for *in vitro* micropropagation. However, one of the main challenges faced by microplants is their adaptation to *ex vitro* conditions. In this context, the use of plant growth-promoting bacteria (PGPB) emerges as a promising alternative to restore beneficial microorganisms in micropropagated seedlings and enhance their performance. In this study, ten bacterial strains were characterized for their ability to fix nitrogen biologically, solubilize nutrients (phosphorus, potassium, calcium, and zinc), produce hydrolytic enzymes (amylases, cellulases, proteases, lipases, and chitinases), siderophores, and hydrogen cyanide (HCN). The *ex vitro* response of two strawberry cultivars, „Oso Grande“ (OG) and „Camarosa“ (CA), biotized with individual inoculants or PGPB consortia of the genera *Azospirillum*, *Bacillus*, and *Rhizobium*, was also evaluated. Results showed that all strains performed biological nitrogen fixation and phosphate solubilization, while 90% solubilized potassium, 40% calcium, and 50% zinc. Additionally, all strains produced organic acids, with the genus *Bacillus* standing out for its high production of hydrolytic enzymes, siderophores, and HCN. Biotization and re-inoculation of microplants under *ex vitro* conditions significantly increased seedling survival rates and, in some cases, promoted biomass accumulation while modulating chlorophyll, carotenoid, phenol, and flavonoid levels. In the OG cultivar, the strains Ab-V5 and CCMA 0401 promoted greater total biomass accumulation during both biotization and re-inoculation, with consortia involving Ab-V5 also showing promising results. For the CA cultivar, the strain Ab-V5 was the most effective under both conditions, with the Ab-V5+0401 consortium demonstrating notable results during re-inoculation. Thus, the use of PGPB shows great potential as an effective tool in plant tissue culture, aiding in the adaptation of microplants to *ex vitro* conditions and supporting the restoration of beneficial microbiota.

Keywords: Micropropagation, *Fragaria × ananassa* Duch, PGPB, Nutrient solubilization, Bioinoculants.

1 INTRODUÇÃO

O morangueiro (*Fragaria × ananassa* Duch.) pertencente à família *Rosaceae*, é uma planta de grande interesse mundial por produzir frutas de alto valor nutricional, é reconhecida por suas propriedades organolépticas e por conter quantidades significativas de compostos bioativos, incluindo fenóis, flavonoides, antocianinas, entre outros compostos que oferecem diversos benefícios à saúde (Aaby *et al.*, 2012; Giampieri *et al.*, 2014; Fierascu *et al.*, 2020). Atualmente, China é o principal produtor de morangueiro, 3.389.620 t, e o Brasil é o nono com 197.000 t anuais (Antunes *et al.*, 2023).

A produção *in vitro* foi descrita por Boxus (Boxus, 1999, 1974), estabelecendo as bases para o desenvolvimento de protocolos de micropropagação, que permite obter uma produção em larga escala de microplantas de alta qualidade fitossanitária, em um período de

tempo relativamente curto e em espaços controlados (Debnath; Teixeira Da Silva, 2007; Abdalla *et al.*, 2022). Uma abordagem atualmente utilizada na Cultura de Tecidos Vegetais (CTV) é a biotização, que implica a inoculação de explantes vegetais com microrganismos benéficos durante alguma das fases de cultivo *in vitro*, visando a estimular o crescimento vegetal, bem como facilitar a transição para as condições *ex vitro* (Nowak, 1998; Read; Preece, 2014; Castiglione *et al.*, 2021; Saeedi *et al.*, 2023).

Assim, as Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (BPCV) podem melhorar significativamente o desenvolvimento das plantas através de diversos mecanismos diretos e indiretos (Esitken *et al.*, 2010; Glick, 2012; Sharma *et al.*, 2013; Gouda *et al.*, 2018; Chandra; Chandra; Tripathi, 2021), dentre os mecanismos diretos tem-se o efeito benéfico que possam ter na promoção de crescimento e desenvolvimento das plantas, incluindo a fixação biológica de nitrogênio (FBN) (Sánchez; Ospina; Montoya, 2017), a solubilização e disponibilização de nutrientes essenciais como o fósforo (P) (Lelapalli *et al.*, 2021; Sánchez; Ospina; Montoya, 2017), potássio (K) (Aleksandrov; Blagodyr"; Il'ev, 1967; Boubekri *et al.*, 2021; Kumar Meena *et al.*, 2015; Meena *et al.*, 2016; Rogers; Bennett, 2004; Soumare; Sarr; Diédhiou, 2023) cálcio (Ca) (White; Broadley, 2003; Supanjani *et al.*, 2006) e o zinco (Zn) (Kamran *et al.*, 2017).

Por outra parte, a produção de fitohormônios pelas BPCV também é muito importante, pois pode influenciar na modulação destes nas plantas, algumas BPCV sintetizam auxinas, que são fitohormônios fundamentais para o crescimento e desenvolvimento vegetal (Grossmann, 2010; Halliday). As giberelinas (GA) podem estimular respostas de alongamento celular, divisão celular e diferenciação em plantas (Lang, 1956; Radley, 1956), o ácido salicílico (AS) é um fitohormônio fenólico que atua na regulação do crescimento vegetal na transdução de sinais, tanto na mediação de doenças quanto na mediação dos estresses bióticos e abióticos (Khan *et al.*, 2014; Ali *et al.*, 2018; Kang; Li; Guo, 2014).

Dentre os mecanismos indiretos das BPCV se incluem a produção de enzimas hidrolíticas que auxiliam na degradação da matéria orgânica e na liberação de nutrientes (Gouda *et al.*, 2018; Ferreira; Soares; Soares, 2019). A produção de sideróforos que facilitam a captação de ferro pelas plantas, especialmente em condições de baixa disponibilidade deste elemento (Bellenger *et al.*, 2008; Braud *et al.*, 2009a, 2009b Ahmed; Holmström, 2014). A síntese de cianeto de hidrogênio (HCN) que pode atuar como um agente de biocontrole contra patógenos (Bakker; Schippers, 1987; Flury *et al.*, 2016; Sehwat; Sindhu; Glick, 2022; Rijavec; Lapanje, 2016). Algumas bactérias BPCV são portadoras da enzima 1- aminociclopropano 1-carboxilico deaminase (ACCD), responsável pela clivagem do precursor

de etileno vegetal, ACC, em amônia α -cetobutirato, isso pode diminuir os níveis de etileno nas plantas. (Honma; Shimomura, 1978; Glick; Penrose; Li, 1998; Glick *et al.*, 2007a, b; Glick, 2012, 2014). Assim, a inoculação de plantas com BPCV pode ser uma estratégia eficaz na diminuição do uso massivo de fertilizantes e agroquímicos, embora os mecanismos associados ao uso de bactérias na promoção do crescimento vegetal ainda precisam ser mais explorados. (Ferreira *et al.*, 2024)

Desta forma, a biotização poderia ajudar no desenvolvimento do vegetal, através da preparação e adaptação do sistema radicular, ou pelo acúmulo de biomassa na parte aérea e raiz, possibilitando melhor adaptação para as condições *ex vitro* onde se estabelecerão novas interações planta-substrato-microrganismos (Chandran *et al.*, 2020; Gray, 2010; Rather *et al.*, 2022b; Read; Preece, 2014; Saad *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2022; Hazarika, 2006; Saeedi *et al.*, 2023). Nesta pesquisa, foram explorados alguns destes mecanismos de ação em dez BPCV, como foram a fixação biológica de nitrogênio, a solubilização de fosfato, potássio, cálcio e zinco, produção de ácidos ou bases, produção de enzimas hidrolíticas, amilase, celulase, protease, lipase e quitinases, a produção de sideróforos e HCN, assim como também se avaliou o efeito benéfico da biotização e re-inoculação de plântulas de morangueiro nas condições *ex vitro* a fim de determinar a porcentagem de sobrevivência, promoção de crescimento vegetal, o acúmulo de clorofilas, carotenóides, fenóis e flavonóides em ambas cultivares de morangueiro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e local experimental

Foram utilizadas plantas de duas cultivares de morangueiro, Oso Grande (OG) e Camarosa (CA), cedidas pela Multiplanta Tecnologia Vegetal Ltda. Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais/Laboratório de Bioprodutos e Interações Planta Microrganismo (LCT/LABIMP-UFLA) do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG. Para o cultivo *in vitro*, utilizaram-se frascos de 200 mL contendo 50 mL do meio basal MS (Murashige; Skoog, 1962) conforme o protocolo adaptado por Boxus (1974). O pH do meio foi ajustado para 5.7 antes da autoclavagem, que foi realizada por 20 min a 121 °C 15 psi. As microplantas foram mantidas por aproximadamente 30 \pm 3 dias em uma sala de crescimento, sob condições controladas de iluminação artificial e temperatura. A iluminação foi fornecida por lâmpadas

de LED brancas (6400 K– $\lambda = 525$ nm), com irradiância média de $49.4 \mu\text{Mol m}_2\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h. A temperatura foi mantida em 25 ± 2 °C (Araújo *et al.* 2021a, b). Posteriormente as microplantas foram subcultivadas em meio MS sem regulador de crescimento.

2.2 Cepas bacterianas

As bactérias utilizadas foram cedidas pela Coleção de Cultura da Microbiologia Agrícola (CCMA/UFLA), do Laboratório de Microbiologia das Fermentações do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), e pelo Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner da Embrapa Agrobiologia, Brasil (CCBD). Inicialmente, as bactérias (Tabela 7) foram caracterizadas quanto à capacidade de fixar nitrogênio, solubilizar fosfatos, potássio, cálcio, zinco, liberar ácidos ou bases, produzir enzimas hidrolíticas (amilase, celulasas, proteases, lipases e quitinases), sintetizar sideróforos e cianeto de hidrogênio (HCN). Em estudos anteriores, as bactérias já haviam sido caracterizadas quanto a produção de fitohormônios, ácido índol acético (AIA), ácido salicílico (AS), giberelinas (GA) e a enzima da ACC deaminase, bem como na biotização de *Solanum tuberosum* L (Molina *et al.*, 2024).

Tabela 7 - Cepas bacterianas utilizadas nos testes bioquímicos

Código	Cepas bacterianas
Ab-V5 (CCMA1291)	<i>Azospirillum brasilense</i>
Ab-V6 (CNPSo 2084)	<i>Azospirillum brasilense</i>
CIAT 899	<i>Rhizobium tropici</i>
BR935	<i>Rhizobium leucanae</i>
BR921	<i>Sinorhizobium fredii</i>
CCMA0122	<i>Sinorhizobium fredii</i>
CCMA 0088	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
CCMA0401	<i>Bacillus subtilis</i>
CCMA0004	<i>Bacillus megaterium</i>
CCMA0112	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>

Códigos das BPCVs cedidas pela Coleção de Cultura da Microbiologia Agrícola (CCMA/UFLA e pelo Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner da Embrapa Agrobiologia, Brasil (CCBD). As duas cepas de *Azospirillum brasilense* foram nomeadas a partir daqui como: Ab-V5 e Ab-V6

Fonte: Da autora (2024).

2.3 Preparação do inóculo para aos testes de caracterização bioquímica

O inóculo bacteriano foi preparado a partir de suspensões celulares obtidas de um cultivo de cada cepa em 7 mL de CN (Caldo Nutriente), mantidos sob agitação a 120 rpm por 48 h a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Após o período de incubação, as culturas foram centrifugadas por 10 minutos (min) a $1.788 \times g$ (Kasvi K14-0815^a). As células obtidas foram lavadas duas vezes com água destilada estéril, e ajustadas na concentração $1.5 \times 10^8 \text{UFC mL}^{-1}$ utilizando a escala de McFarland.

2.3.1 Fixação biológica de nitrogênio

As bactérias foram cultivadas em tubos de vidro contendo 10 mL de meio NFB (Döbereiner *et al.*, 1995; Kuss *et al.*, 2007) composto por 5 g L^{-1} de ácido málico, 0.5 g L^{-1} K_2HPO_4 , 0.2 g L^{-1} MgSO_4 , 0.1 g L^{-1} NaCl , 0.02 g L^{-1} $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 mL de solução de vitaminas (10 mg biotina, 20 mg piridoxina, em 100 mL de água destilada), 2 mL da solução de macronutrientes ($0.2 \text{ g NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $0.3 \text{ g MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $0.28 \text{ g H}_3\text{BO}_3$, $0.008 \text{ g CuSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$, $0.024 \text{ g ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$, em 200 mL de água destilada), 4 mL da solução FeEDTA 1.64 %, 2 mL azul de bromotimol (0.5% em 0.2 N NaOH), 4.5 g L^{-1} KOH, 1.75 g L^{-1} e pH 6.8 ± 0.2 . As culturas foram incubadas de 48 a 72 horas (h) a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ em B.O.D (Biochemical Oxygen Demand). A capacidade de fixação de nitrogênio pelas bactérias foi determinada com base na formação da película na superfície do meio.

2.3.2 Solubilização de fosfato

A solubilização de fosfato inorgânico foi avaliada em placas de Petri contendo meio NBRIP (National Botanical Research Institute's Phosphate) (Nautiyal, 1999; Tejera-Hernández; Heydrich-Pérez; Rojas-Badía, 2013) composto por 10 g L^{-1} de glicose, 5 g L^{-1} $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5 g L^{-1} $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 0.25 g L^{-1} $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g L^{-1} KCl, 0.1 g L^{-1} $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 15 g L^{-1} de ágar. O meio foi esterilizado em autoclave. Três placas por cepa bacteriana foram inoculadas com $10 \mu\text{L}$ de cada suspensão celular em três pontos equidistantes e incubadas 24 a 96 h a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ em B.O.D. A solubilização do fosfato foi determinada pela observação do halo translúcido ao redor das colônias. O índice de solubilização (IS) foi calculado pela razão entre o diâmetro do halo em milímetro (mm) e o diâmetro da colônia (mm). A capacidade de solubilização de fosfato $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ pelas cepas foi classificada como baixa solubilização

(IS<2), média solubilização (IS<4) e alta solubilização (IS≥4) (Berraquero; Baya; Cormenzana, 1976; Chagas Junior *et al.*, 2010).

2.3.3 Solubilização de potássio

A solubilização de potássio (K) foi avaliada utilizando o meio ágar Aleksandrov (Aleksandrov *et al.*, 1967), composto por (5 g L⁻¹ de glicose, 0.5 g L⁻¹ MgSO₄, 0.005 g L⁻¹ FeCl₃, 0.1 g L⁻¹ CaCO₃, 2 g L⁻¹ Ca₃(PO₄)₂, 2 g L⁻¹, 2.0 g L⁻¹, de alumínio silicatos de potássio, e com a adição de 0.125 g L⁻¹ de azul de bromotimol e 15 g L⁻¹ de ágar (Rajawat *et al.*, 2016). O pH foi ajustado para 7.0± 0.2 e o meio foi esterilizado em autoclave. Três placas por cepa bacteriana foram inoculadas com 10 µL de cada suspensão celular em três pontos equidistantes e incubadas em B.O.D por 72 a 96 h a 28 ± 2°C. A solubilização de potássio pelas bactérias foi observada pela mudança da cor do meio de azul para amarelo. O índice de solubilização (IS) foi calculado usando a fórmula IS = diâmetro do Halo (mm) / diâmetro da Colônia (mm) (Berraquero; Baya; Cormenzana, 1976; Chagas Junior *et al.*, 2010; Rajawat *et al.*, 2016).

2.3.4 Solubilização de cálcio

A solubilização de cálcio foi avaliada em placas de Petri contendo o meio calcita (Nautiyal *et al.*, 2000; Rana *et al.*, 2015), composto por 10 g L⁻¹ de dextrose; 5 g L⁻¹ de CaCO₃; 0,5 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄; 0.2 g L⁻¹ de KCl; 1 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O; 5 g L⁻¹ de extrato de levedura; 15 g L⁻¹ de ágar. O pH ajustado para 7.0 ± 0.2, o meio foi esterilizado em autoclave. Três placas por cepa bacteriana foram inoculadas com 10 µL de cada suspensão celular em três pontos equidistantes e incubadas em B.O.D a 28 ± 2°C por 5 a 7 dias. A solubilização de cálcio pelas bactérias foi observada pela produção de halos translúcidos ao redor das colônias. O índice de atividade solubilizante de calcita foi determinado (CSAI) pela fórmula CSAI=, diâmetro da zona clara (CZD)/diâmetro da colônia (Dc) (Rana *et al.*, 2015; Khangahi *et al.*, 2018; Yaghoubi Khangahi *et al.*, 2021).

2.3.5 Solubilização do zinco

A solubilização do zinco foi feita em placas de Petri contendo o meio composto por: 10 g L⁻¹ de glicose, 1 g L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 0.2 g L⁻¹ KCL, 0.1 g L⁻¹ K₂HPO₄, 0.2 g L⁻¹ MgSO₄, 0.1

% de óxido de zinco (ZnO), 15 g L⁻¹ ágar (Khanghahi *et al.*, 2018). O meio foi esterilizado em autoclave. Três placas por cada cepa bacteriana foram inoculadas com 10 µL de cada suspensão celular em três pontos equidistantes e incubadas em B.O.D por 5 a 7 dias a 28±2°C. A eficiência de solubilização de Zn (ZnE) foi calculada pela fórmula: $ZnE = (HZ/C) \times 100$, onde HZ é o diâmetro da zona do halo de solubilização de ZnO e, C o diâmetro da colônia (Khanghahi *et al.*, 2018; Yaghoubi Khanghahi *et al.*, 2021).

2.3.6 Acidificação do Meio de Cultura

Os testes foram realizados em placas de Petri contendo o meio de cultura ELMABT constituído por 1 g L⁻¹ de K₂HPO₄, 0.18 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 0.2 g L⁻¹ de NaCl, 9 g L⁻¹ de manitol, 1,5 g L⁻¹ de extrato de levedura, 5 mL de solução de azul de bromotimol e 15 g L⁻¹ de ágar (Vincent, 1970). Três placas por cepa bacteriana foram inoculadas com 10 µL da suspensão celular em três pontos equidistantes e incubados em B.O.D a 28 ± 2°C por 48 a 96 h. A cor do meio em pH 7.0 é verde, se o microrganismo cultivado causa a acidificação, o meio torna-se amarelo ao redor da colônia, indicando a produção de ácido orgânico pela bactéria, se ele adquire uma coloração azulada, indica alcalinização do meio ágar (Vincent., 1970; Silva *et al.*, 2022).

2.4 Produção de enzimas hidrolíticas

A atividade da amilase foi avaliada em placas de Petri contendo Ágar Nutriente (AN) suplementado com 0.2 % de amido, com pH ajustado para 6.0 ± 0.2, (Carrim; Barbosa; Vieira, 2006; Rana, 2014). Três placas por cada cepa bacteriana foram inoculadas com 10 µL da suspensão celular em três pontos equidistantes e incubadas em B.O.D a 28±2°C por 4 a 7 dias. Após o período de incubação, adicionou-se iodo de Gram 0.3 % para avaliação da formação de um halo claro ao redor da colônia. O índice enzimático (IE) foi determinado pela razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia (Hankin; Anagnostakis, 1975; Hankin; Zucker; Sands, 1971).

A produção de celulasas foi avaliada em placas de Petri contendo Meio Mínimo Mineral, composto por 0.4% (NH₄)₂SO₄, 0.6% NaCl, 0.1% K₂HPO₄, 0.01% MgSO₄, 0.01% CaCl₂ 0.5% de carboximetilcelulose (CMC) (Merck, Alemanha) e 2% de ágar (Kasana *et al.*, 2008; Mahdi *et al.*, 2022). Três placas por cepa bacteriana foram inoculadas com 10 µL da suspensão celular em três pontos equidistantes e incubados em B.O.D a 28±2°C por 4 a 7

dias. A atividade enzimática foi evidenciada pela formação de halo claro em torno da colônia após 20 min da adição de solução de vermelho do Congo a 1% (Labo Chemie, Mumbai, Índia) (Liang *et al.*, 2014). O índice enzimático (IE) foi determinado pela razão entre o diâmetro do halo de degradação de CMC e o diâmetro da colônia (Carrim; Barbosa; Vieira, 2006; Hankin; Anagnostakis, 1975; Hankin; Zucker; Sands, 1971).

A atividade de protease foi avaliada em placas de Petri contendo o meio Skim Milk Agar, composto por 5 g L⁻¹ Caseína, 1 g L⁻¹ glicose, 2.5 g L⁻¹ de extrato de levedura e 15 g L⁻¹ de ágar com a adição de 7% de leite desnatado (Mamarasulov *et al.*, 2022; Ntabo *et al.*, 2018). Três placas por cepa bacteriana foram inoculadas com 10 µL da suspensão celular em três pontos equidistantes e incubados por 48 a 72 h em B.O.D a 28 ± 2°C. A atividade proteolítica foi evidenciada pela presença de halos transparentes ao redor das colônias bacterianas. O índice enzimático (IE) foi determinado pela razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia (Carrim; Barbosa; Vieira, 2006; Hankin; Anagnostakis, 1975; Hankin; Zucker; Sands, 1971).

A atividade da lipase foi avaliada em placas de Petri contendo AN adicionado de 0.1 g L⁻¹, CaCl₂H₂O, com pH ajustado a 6.0 ± 0. 2 e suplementado com 20 mL de Tween 80 após a autoclavagem, previamente filtrado (membrana 0.22 µm) (Dogan; Taskin, 2021; Hankin; Anagnostakis, 1975; Sierra, 1957). Três placas por cepa bacteriana foram inoculadas com 10 µL da suspensão celular em três pontos equidistantes e incubado em B.O.D a 28±2 °C por 4 dias. As cepas que apresentaram zona clara ao redor das colônias foram consideradas positivas para a lipase. O índice enzimático (IE) foi determinado pela razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia (Carrim; Barbosa; Vieira, 2006; Hankin; Anagnostakis, 1975; Hankin; Zucker; Sands, 1971).

A produção de quitinases foi avaliada com base na metodologia já estabelecida por Roberts e Selitrennikoff (1988). A Quitina coloidal (Sigma) foi preparada previamente, utilizando 40 g L⁻¹ de quitina em 400 mL de HCl concentrado, mantida em agitação constante a 150 rpm por 24 h. Em seguida, foram adicionados 2 L de água destilada estéril fria, agitados por 2 horas e filtrados, permitindo a obtenção da quitina coloidal. O meio de cultura foi preparado com 0.3 g L⁻¹ MgSO₄, 3 g L⁻¹ NH₄(SO₄)₂, 2 g L⁻¹ K₂HPO₄, 1 g L⁻¹ de ácido cítrico, suplementado com 4.5 g L⁻¹ de quitina coloidal, e 15 g L⁻¹ de ágar. Três placas por cepa bacteriana foram inoculadas com 10µL da suspensão celular em três pontos equidistantes e incubados em B.O.D a 28 ± 2°C por 15±3 dias. As cepas que apresentaram zona opaca ao redor das colônias foram avaliadas como positivas para quitinases. O índice enzimático (IE)

foi determinado pela razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia (Carrim; Barbosa; Vieira, 2006; Hankin; Anagnostakis, 1975; Hankin; Zucker; Sands, 1971).

2.5 Produção de sideróforos em placa

A produção de sideróforos pelas cepas bacterianas foi avaliada seguindo a metodologia de preparo do meio B -King- Chromium azurol Sulfonato (CAS) modificado (Louden; Haarmann; Lynne, 2011; Schwyn; Neilands, 1987). O meio de cultura foi constituído por 20 g L⁻¹ de peptona; 1.5 g L⁻¹ de K₂HPO₄; 1,5 g L⁻¹ MgSO₄.7H₂O; 15 mL de glicerol e 15 g L⁻¹ de ágar, com pH ajustado para 7.0 ± 0.2. A solução CAS foi preparada com duas soluções. A: (72.9 mg de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HDTMA) em 40 mL de H₂O destilada), e solução B (60.5 mg de azurol sulfonato de cromo em 50 mL de H₂O deionizada, mais 10 mL de uma solução 1mM de FeCl₃.6H₂O em HCl 10 mM). As soluções foram autoclavadas separadamente. Após a esterilização, o meio de cultura e as soluções foram misturadas na proporção de 9:1, respectivamente e vertido nas placas de Petri, A produção de sideróforos foi avaliada pela observação de halos amarelados ou alaranjados ao redor do inóculo após a inoculação.

2.5.1 Quantificação da produção de sideróforos em meio líquido

A quantificação da produção do sideróforos foi realizada utilizando o método espectrofotométrico por meio do ensaio Chrome Azurol sulfonate (CAS) (Louden; Haarmann; Lynne, 2011; Schwyn; Neilands, 1987). Cada cepa bacteriana foi inoculada em 7 mL de meio líquido King-B, sendo retiradas alíquotas às 72, 168, 240 e 336 h. Essas alíquotas do sobrenadante foram adicionadas na microplaca juntamente com a solução CAS em relação 1:1 sendo mantido em temperatura ambiente por 20 min. Em seguida, foi feita a leitura da densidade óptica em 630 nm no espectrofotômetro (Thermo Scientific™ Multiskan™) (Tortora; Díaz-Ricci; Pedraza, 2011). A percentagem de Unidade de Sideróforos (% S.U) foi estimada usando a fórmula: $[(Ar-As) / Ar] * 100$, onde Ar é a absorbância de referência (meio não inoculado + solução de ensaio CAS) e As, é a absorbância da amostra (sobrenadante livre de células + solução de ensaio CAS).

2.6 Produção de cianeto de hidrogênio (HCN) em placa

A produção do HCN pelas cepas bacterianas foi determinada com as metodologias descritas por Castric (1975) e Abd El-Rahman et al. (2019). As cepas foram inoculadas em meio King's suplementado com 4.4gL^{-1} de glicina. Tiras de papel filtro Whatman n°.1 foram embebidos numa solução de carbonato de sódio a 2% e ácido pícrico a 0.5 %, e colocadas no topo de cada tampa de cada placa de Petri. As placas foram incubadas na B.O.D a $28\pm 2^\circ\text{C}$ por 4 dias. A mudança da cor amarela do papel filtro para castanho claro, indica menor produção de HCN (+), marrom, indica produção média (++), vermelho tijolo, indica alta produção (+++) e vermelho escuro, indica muito alta (++++) (Bakker; Schippers, 1987).

A quantificação da produção de HCN pelas cepas bacterianas foi realizada a partir de sua inoculação em caldo King's suplementado com 4.4gL^{-1} de glicina, uma tira de papel filtro Whatman n°.1 (10 x 0.5 cm) foi mergulhada na solução de carbonato de sódio a 2% e de ácido pícrico a 0.5% e fixada no topo de cada tubo. Os tubos foram selados com parafilme e levados a 140 rpm por 4 dias a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. As tiras de papel filtro foram mergulhadas em 10 mL de água destilada e a absorvância foi lida no espectrofotômetro (Thermo Scientific™ Multiskan™) a 625 nm. As análises de cada cepa bacteriana foram feitas em triplicata (Abd El-Rahman *et al.*, 2019; Reetha; Pavani; Mohan, 2014).

2.7 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Posteriormente, realizou-se análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey com um nível de significância de $p < 0.05$ utilizando os softwares Infostat (Di Rienzo et al., 2020) e Sisvar v 5.8 (Ferreira, 2023).

2.8 Biotização

Os experimentos de biotização foram conduzidos no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e no Laboratório de Bioprodutos e Interações Planta Microrganismo (LCT/LABIMP-UFLA), ambos vinculados ao Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As BPCV foram previamente caracterizadas bioquimicamente e testadas na biotização, permitindo a seleção das cepas *A. brasilense* Ab- V5, Ab-V6, *B. subtilis* CCMA 0401, e *R. leucaneae* BR935 como os mais promissores para a biotização individual. Posteriormente, esses gêneros foram avaliados quanto à formação de

consórcios bacterianos durante a biotização *in vitro*. Com base nesses resultados, os tratamentos foram definidos para os testes realizados na casa de vegetação (Tabela 8).

Tabela 8 - Tratamentos utilizados na casa de vegetação

Tratamentos		
Código	Tratamentos	Cepas bacterianas
Ab-V5	T1	<i>Azospirillum brasilense</i>
Ab-V6	T2	<i>Azospirillum brasilense</i>
BR935	T3	<i>Rhizobium leucaneae</i>
CCMA 0401	T4	<i>Bacillus subtilis</i>
Ab-V5 + BR935	T5	<i>A. brasilense</i> + <i>R. leucaneae</i>
Ab-V5 + 0401	T6	<i>A. brasilense</i> + <i>B. subtilis</i>
BR935 + 0401	T7	<i>R. leucaneae</i> + <i>B. subtilis</i>
Ab-V6 + BR935	T8	<i>A. brasilense</i> + <i>R. leucaneae</i>
Ab-V6 + 0401	T9	<i>A. brasilense</i> + <i>B. subtilis</i>
Controle	T10	Sem bactéria, (H ₂ O destilada estéril)

Tratamentos com BPCV utilizados na biotização e re-inoculação de microplantas de morangueiro cultivadas *in vitro* e levadas para a casa de vegetação.

Fonte: Da autora (2024).

Para a biotização, utilizaram-se microplantas de morangueiro das cultivares Oso Grande (OG) e Camarosa (CA) com as seguintes dimensões: 2 a 2.5 cm de comprimento, com 6 a 8 folhas e 3 a 5 mm de raiz, as microplantas foram transferidas individualmente para frascos de 200 mL contendo 50 mL do meio básico Murashige & Skoog (MS) (Murashige; Skoog, 1962). Após uma semana de adaptação na sala de crescimento, as microplantas foram transferidas para uma capela de fluxo laminar, onde foram aplicados 50 µL da suspensão bacteriana previamente preparada, com concentração de 1.5×10^8 UFC mL⁻¹. A suspensão foi pipetada na base do caule-raiz de cada microplanta, resultando em uma concentração bacteriana de aproximadamente 10^6 células por microplanta (Recuento UFC).

A formação dos consórcios bacterianos foi realizada a partir de suspensões bacterianas preparadas individualmente, que foram misturadas na proporção 1:1 e mantidas em agitação por 20 min a 100 rpm, em temperatura ambiente, para homogeneização (Blanco *et al.*, 2021). Após a biotização, as microplantas foram mantidas por aproximadamente 30 ± 3 dias em uma sala de crescimento, com iluminação artificial, fornecida por lâmpadas de LED brancas (6400 K- $\lambda = 525$ nm) e irradiância média de $49.4 \mu\text{Mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. O fotoperíodo foi de 16 h diárias, com temperatura controlada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (Araújo *et al.*, 2021a, b). Foi estabelecido um delineamento inteiramente casualizado com dez tratamentos (quatro cepas e cinco consórcios) e o tratamento controle, sem inoculação) e quatro repetições. Cada tratamento foi composto por 24 mudas (seis mudas por repetição) para ambas as cultivares Oso grande e Camarosa (Tabela 2).

Após 30 ± 3 dias da biotização, as mudas do morangueiro foram transferidas para vasos contendo uma mistura de substrato na proporção 6:4 de substrato comercial Tropstrato HT Hortaliças e areia, previamente esterilizada por três dias consecutivos, durante uma hora diária. As mudas foram então levadas para a casa de vegetação, mantida a uma temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$ durante o dia e $16\pm 2^\circ\text{C}$ durante a noite. No início da adaptação utilizou-se um plástico de polipropileno perfurado, removido por 2 h a cada 24 h, e sendo mantido por 96 com o objetivo de ajudar a manter a umidade e facilitar a transição das condições *in vitro* para as condições *ex vitro*, auxiliando assim na adaptação ao novo ambiente.

As mudas transplantadas foram divididas em dois grupos: o primeiro grupo foi composto pelas mudas biotizadas (A), enquanto o segundo grupo incluiu mudas submetidas a uma segunda re-inoculação (B), realizada pela adição de três mililitros de cada inóculo sete dias após o transplante para as condições *ex vitro*. As mudas foram regadas a cada dois dias e fertilizadas uma vez por semana com 10 mL de uma solução de Hoagland, na metade da potência, para os tratamentos experimentais (Sylvia; Jarstfer, 1992). O tratamento controle foi fertilizado com 10 mL de uma solução de Hoagland com adubação completa (Hoagland; Arnon, 1950). A taxa de sobrevivência foi avaliada após 25 dias, e as variáveis fitotécnicas foram mensuradas após 60 dias nas condições *ex vitro*. Também se realizou a quantificação de clorofilas, carotenóides, fenóis e flavonóides. Os dados obtidos foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Posteriormente, foi realizada análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey com um nível de significância de $p < 0.05$ utilizando os softwares Infostat (Di Rienzo et al., 2020). Sisvar v 5.8 (Ferreira, 2023).

2.9 Quantificação de clorofilas e carotenóides

A quantificação de clorofilas e carotenóides foi realizada a partir de 0.1 g de folhas ressuspensas em 10 mL de acetona a 80%, mantidas no escuro por 24 horas. Após a filtragem dos extratos, as leituras de absorvância foram realizadas em 663.2 nm, 646.8 nm e 470 nm utilizando um espectrofotômetro (Thermo Scientific™ Multiskan™). Os cálculos das concentrações da clorofila ($\mu\text{g/g}$ de matéria fresca foliar), seguiram as seguintes equações (Lichtenthaler, 1987; Lichtenthaler, Buschmann, 2001):

$$\begin{aligned} \text{Clorofila } a: & 12.25 \times A_{663.2} - 2.79 \times A_{646.8} \\ \text{Clorofila } b: & 21.50 \times A_{646.8} - 5.10 \times A_{663.2} \\ \text{Carotenóides:} & (1000 \times A_{470} - 1.82 \times C_a - 85.02 \times C_b) / 198 \end{aligned}$$

2.10 Obtenção dos extratos hidro-metanólicos para a quantificação de fenóis e flavonoides

Foi preparado um extrato hidro-metanólico a partir de metanol: água (80:20, v/v) acidificado com HCl a 0.1%. Dez mililitros da solução foram adicionados 0.2 g de matéria seca de folhas e mantidos em agitação à temperatura ambiente na escuridão por 24 h. Em seguida, foram centrifugados a 855 x g (Kasvi K14-0815^a) por 15 min, e os sobrenadantes foram recuperados e armazenados a -80 até análise (Ariza *et al.*, 2016; Ariza *et al.*, 2018). Os extratos foram utilizados para a quantificação do conteúdo fenólico total (TPC) e o conteúdo total de flavonóides (TFC).

2.11 Quantificação do conteúdo fenólico total (TPC)

A quantificação de fenóis foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu (FC), com modificações (SINGLETON., 1965). Onde 100 µL dos extratos hidro-metanólicos foram misturados com 500 µL do reagente FC a 10% e incubados por 3 min. Em seguida, adicionaram-se 400 µL do CH₃CO₂Na (7 M), e foram novamente incubados em temperatura ambiente e no escuro por 2 horas. A absorbância foi medida a 760 nm usando o espectrofotômetro (Thermo Scientific™ Multiskan™). A curva de calibração foi realizada a partir de uma solução stock de 100 µg/mL de ácido gálico, os dados foram expressado como mgGAE/g, miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de matéria seca (Ariza *et al.*, 2016; Ariza *et al.*, 2018; Simirgiotis *et al.*, 2008).

2.12 Quantificação do conteúdo total de flavonóides (TFC)

O TFC foi determinado de acordo com a metodologia proposta (Ariza *et al.*, 2016) com modificações. Foram misturados 250 µL dos extratos hidro-metanólicos com 1.25 mL de água MilliQ e adicionados com 75 µL de solução de NaNO₂ a 5%. Após incubação de 6 min, foram adicionados com 150 µL de solução de AlCl₃·6H₂O a 10%, e 500 µL de NaOH a 1 M. O volume final foi ajustado para 2.5 mL com água MilliQ, e a absorbância foi mensurada a

420 nm usando um espectrofotômetro (Thermo Scientific™ Multiskan™). A curva de calibração foi realizada a partir de uma solução stock de 100 µg/mL de quercetina, e os resultados foram expressos em mgQE/g, miligramas de equivalentes de quercetina por grama de matéria seca (Chang *et al.*, 2002; Memari-Tabrizi *et al.*, 2021).

2.13 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Posteriormente, foi realizada análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey com um nível de significância de $p < 0.05$ utilizando os softwares Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2020) e Sisvar v 5.8 (Ferreira, 2023).

3 RESULTADOS

3.1 Testes de Fixação Biológica de nitrogênio (FBN), solubilização de fosfatos, potássio, cálcio, zinco e acidificação/alcalinização do meio

Dez cepas bacterianas foram testadas para avaliar sua capacidade de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), o índice de solubilização (IS) de fosfatos, potássio, cálcio, bem como a eficiência de solubilização do zinco (ZnE), conforme apresentado na Tabela 9. Todos os isolados bacterianos (100%) demonstraram a capacidade de realizar a FBN e solubilizar de fosfatos, 90% solubilizaram potássio. Enquanto a solubilização de cálcio somente foi realizada por *A. brasilense* Ab-V6, *R. leucaneae* BR935, *B. japonicum* CCMA 0088, e *S. fredii* CCMA 0122, todas com um IS baixo ($IS < 2$). Quanto à eficiência de solubilização do zinco (ZnE), 50% das cepas demonstraram alta eficiência, destacando-se *B. japonicum* CCMA 0088, *S. fredii* CCMA 0122, ambas as cepas de *Azospirillum* (Ab-V5, Ab-V6) e *B. subtilis* CCMA0401. Adicionalmente, todas as bactérias tiveram a produção de ácidos no meio ELMABT.

Tabela 9 - Fixação Biológica de nitrogênio, índice de solubilização (IS) e acidificação ou alcalinização em meio sólido pelas BPCV

Microrganismos	Fixação Biológica de Nitrogênio	Solubilização de fosfatos (IS)	Solubilização de potássio (IS)	Índice de Atividade Solubilizante de Calcita (CSAI)	Eficiência de Solubilização de Zn (ZnE) %	Ácidos ou alcalinização Meio ELMABT
<i>A. brasilense</i> Ab-V5	+	1.43 ± 0.02 ^{d, e}	3.10±0.2 ^d	0±0.0 ^c	262±0.3 ^c	Amarelo
<i>A. brasilense</i> Ab-V6	+	2.43±0.01 ^c	7.07±0.1 ^a	2.0±0.09 ^a	245±0.4 ^c	Amarelo
<i>R. tropici</i> CIAT 899	+	1.60±0.03 ^d	0±0.0 ^f	0±0.0 ^c	0±0.0 ^d	Amarelo
<i>R. leucaneae</i> BR935	+	1.2±0.01 ^f	3.67±0.2 ^d	1.47±0.1 ^b	0±0.0 ^d	Amarelo
<i>S. fredii</i> BR921	+	1.2±0.01 ^{e, f}	1.43±0.1 ^e	0±0.0 ^c	0±0.0 ^d	Amarelo
<i>S. fredii</i> CCMA 0122	+	3.57±0.05 ^a	5.87±0.2 ^{b, c}	1.27±0.02 ^b	329±0.4 ^b	Amarelo
<i>B. japonicum</i> CCMA 0088	+	3.27±0.1 ^b	7.53±0.05 ^a	1.4±0.06 ^b	418±0.4 ^a	Amarelo
<i>B. subtilis</i> CCMA 0401	+	3.07±0.02 ^b	5.13±0.1 ^c	0±0.0 ^c	255±0.7 ^c	Amarelo
<i>B. megaterium</i> CCMA 0004	+	3.77±0.06 ^a	6.63±0.1 ^{a, b}	0±0.0 ^c	0±0.0 ^d	Amarelo
<i>B. amyloliquefaciens</i> CCMA 0112	+	1.7±0.03 ^d	3.17±0.2 ^d	0±0.0 ^c	0±0.0 ^d	Amarelo

Testes de Fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfatos, potássio, cálcio, zinco e produção de ácidos ou bases no meio de cultura. Positivo: (+). Índice de solubilização (IS): baixo (IS<2), médio (IS<4) e alto (IS≥4). Valores na tabela com diferentes letras indicam diferença estatisticamente significativa (P<0.05). Amarelo: produção de ácidos.

Fonte: Da autora (2024).

3.2 Produção de enzimas hidrolíticas pelas BPCV

As cepas de *B. subtilis* CCMA e *B. megaterium* CCMA 0004 produziram as cinco enzimas testadas (amilases, celulasas, proteases, lipases e quitinases), embora com baixo índice enzimático (IE<2). Por outro lado, a cepa *B. amyloliquefaciens* CCMA 0112 foi positiva para quatro enzimas, exceto quitinases, enquanto *R. tropici* CIAT 899 foi negativo apenas para celulasas. Também se observou que as duas cepas de *Azospirillum* foram positivas apenas para proteases, e *R. leucaneae* BR935 demonstrou atividade para proteases e quitinases (Tabela 10).

Tabela 10 - Produção de enzimas hidrolíticas pelas BPCV

Microrganismos	Amilases (IE)	Celulases (IE)	Proteases (IE)	Lipases (IE)	Quitinasas (IE)
<i>A. brasilense</i> Ab-V5	0±0.0 ^b	0±0.0 ^c	1.09±0.01 ^b	0±0.0 ^c	0±0.0 ^d
<i>A. brasilense</i> Ab-V6	0±0.00 ^b	0±0.0 ^c	1.17±0.04 ^b	0±0.0 ^c	0±0.0 ^d
<i>R. tropici</i> CIAT 899	1.46±0.04 ^a	0±0.0 ^c	1.13±0.01 ^b	1.57±0.05 ^a	1.34±0.05 ^{b,c}
<i>R. leucaneae</i> BR935	0±0.0 ^b	0±0.0 ^c	1.79±0.08 ^a	0±0.0 ^c	1.57±0.04 ^a
<i>S. fredii</i> BR921	0±0.0 ^b	0±0.0 ^c	0±0.0 ^c	0±0.0 ^c	0±0.0 ^d
<i>S. fredii</i> CCMA 0122	0±0.0 ^b	0±0.0 ^c	0±0.0 ^c	0±0.0 ^c	0±0.0 ^d
<i>B. japonicum</i> CCMA 0088	0±0.0 ^b	0±0.0 ^c	0±0.0 ^c	0±0.0 ^c	0±0.0 ^d
<i>B. subtilis</i> CCMA 0401	1.39±0.03 ^a	1.4±0.04 ^{a,b}	1.14±0.01 ^b	1.22±0.04 ^a	1.26±0.04 ^c
<i>B. megaterium</i> CCMA 0004	1.32±0.07 ^a	1.28±0.09 ^b	1.65±0.1 ^a	1.43±0.1 ^a	1.49±0.04 ^{a,b}
<i>B. amyloliquefaciens</i> CCMA 0112	1.31±0.03 ^a	1.68±0.13 ^a	1.62±0.01 ^a	1.28±0.03 ^a	0±0.0 ^d

Determinação do Índice enzimático (IE) na produção de enzimas hidrolíticas. classificado como: baixo (IE<2), médio (IE<4) e alto (IE≥4). Valores na tabela com diferentes letras indicam diferença estatisticamente significativa (P<0.05).

Fonte: Da autora (2024).

3.3 Produção de sideróforos

A produção de sideróforos foi avaliada em placa (Tabela 11) e em meio líquido (Figura 1). As três cepas do gênero *Bacillus*, juntamente com *S. fredii* BR921 e *R. tropici* CIAT 899, iniciaram a produção de sideróforos após 1 semana. As duas cepas de *Azospirillum* demonstraram leve produção somente após duas semanas de cultivo. A Figura 8 ilustra a produção de sideróforos em placa por *B. amyloliquefaciens* CCMA 0112 e *Bacillus megaterium* CCMA 0004.

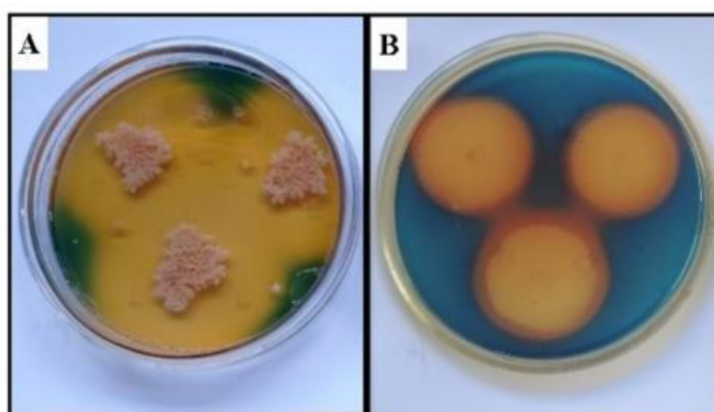
Tabela 11 - Produção de sideróforos qualitativamente

Microorganismos	Produção de sideróforos em placa	
	1 semana	2 semanas
<i>A. brasilense</i> Ab-V5	-	+
<i>A. brasilense</i> Ab-V6	-	+
<i>R. tropici</i> CIAT 899	+	+
<i>R. leucaneae</i> BR935	-	-
<i>S. fredii</i> BR921	+	+
<i>S. fredii</i> CCMA 0122	-	-
<i>B. japonicum</i> CCMA 0088	-	-
<i>B. subtilis</i> CCMA 0401	+	+
<i>B. megaterium</i> CCMA 0004	+	+
<i>B. amyloliquefaciens</i> CCMA 0112	+	+

Produção de sideróforos em meio sólido. Positivo: (+); Negativo (-)

Fonte: Da autora (2024).

Figura 8 - Produção de sideróforos em placa meio B-king-CAS



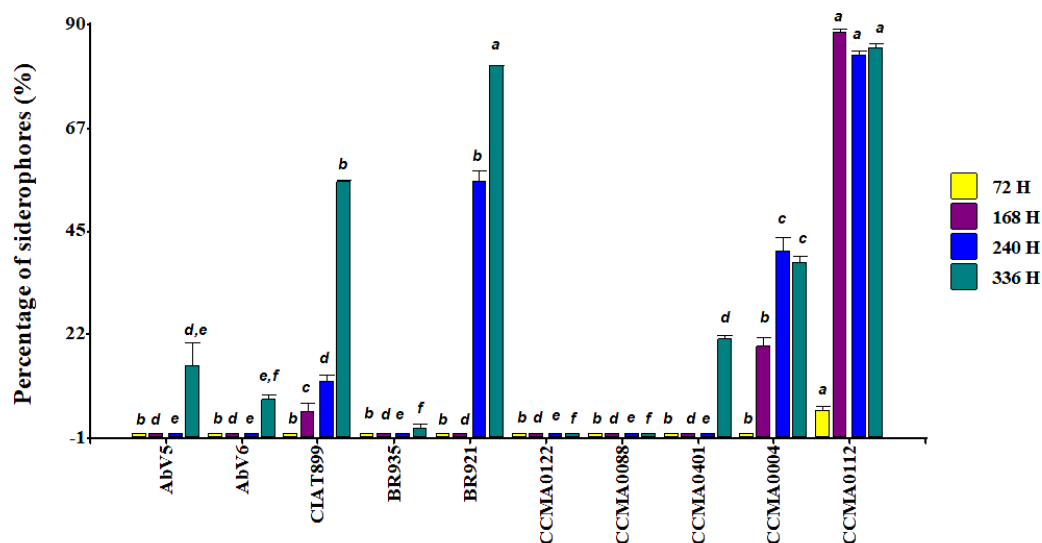
Produção de sideróforos em meio sólido Chrome Azurol Sulfonate (CAS) (A) *B. amyloliquefaciens* CCMA 0112; (B) *Bacillus megaterium* CCMA 0004

Fonte: Da autora (2024).

3.3.1 Quantificação da produção de sideróforos

A quantificação dos sideróforos em meio líquido revelou um padrão similar ao observado no teste em placas (Figura 9).

Figura 9 - Produção de sideróforos em meio líquido



Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB)

Produção de sideróforos em % porcentagem relatadas após 72, 168, 240, 336 horas. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$).

Fonte: Da autora (2024).

Onde *B. amyloliquefaciens* CCMA 0112 foi o maior produtor, com uma taxa de produção de 84.87%, seguido por *S. fredii* BR921 (80.91%), *R. tropici* CIAT 899 (55.43%), *B. megaterium* CCMA 0004 (37.71%) e *B. subtilis* CCMA 0401 (20.88%). As cepas de *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 apresentaram valores inferiores a 15%, iniciando após 336 h de cultivo. Já *R. leucaneae* BR935, *S. fredii* CCMA 0122 e o *B. japonicum* CCMA 0088 foram negativos para a produção de sideróforos em ambas as condições avaliadas.

3.4 Produção de cianeto de hidrogênio (HCN)

A produção de HCN foi determinada pelo método do ácido pícrico, testando-se as BPCV em placas e em meio líquido (Tabela 12). No teste em placa, *B. megaterium* CCMA 0004 e *B. subtilis* CCMA 0401 foram as maiores produtoras de HCN, seguidas por *R. tropici* CIAT 899 e *B. japonicum* CCMA 0088, que apresentaram produção moderada. As demais cepas foram negativas. Na quantificação em meio líquido, observou-se um padrão similar, com *B. megaterium* CCMA 0004 e o *B. subtilis* CCMA 0401, destacando-se como as maiores produtoras de HCN.

Tabela 12 - Produção qualitativa e quantitativa de HCN

Microrganismos	HCN em placa	Quantificação de HCN
<i>A. brasilense</i> Ab-V5	-	0.047 ± 0.001 ^f
<i>A. brasilense</i> Ab-V6	-	0.047 ± 0.004 ^f
<i>R. tropici</i> CIAT 899	+	0.08 ± 0.002 ^{b, c}
<i>R. leucaneae</i> BR935	-	0.049 ± 0.001 ^f
<i>S. fredii</i> BR921	-	0.061 ± 0.002 ^{d, e}
<i>S. fredii</i> CCMA 0122	-	0.054 ± 0.001 ^{e, f}
<i>B. japonicum</i> CCMA 0088	+	0.072 ± 0.002 ^{c, d}
<i>B. subtilis</i> CCMA 0401	++	0.089 ± 0.001 ^{a, b}
<i>B. megaterium</i> CCMA 0004	+++	0.092 ± 0.002 ^a
<i>B. amyloliquefaciens</i> CCMA0112	-	0.049 ± 0.001 ^f
Controle	-	0.001 ± 0.001 ^f

Teste de produção de HCN em placa e em meio líquido. Negativo: (-); Positivo: (+); Nível de produção pela cor: castanho claro/menor produção (+); marrom/ produção média (+ +); vermelho tijolo/ alta produção (+ + +); vermelho escuro/ produção muito alta (+ + + +). Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$).

Fonte: Da autora (2024).

3.5 Porcentagem de sobrevivência após a biotização e re-inoculação em condições *ex vitro*

A taxa de sobrevivência das cultivares Oso Grande OG e Camarosa CA foi avaliada após 25 dias na casa de vegetação. Nos tratamentos individuais, foi observada uma taxa de sobrevivência de 100% em ambas as condições, biotização e re-inoculação. Nos tratamentos com consórcios, a resposta foi variada com algumas associações alcançando 100% de sobrevivência, enquanto outras apresentaram taxas similares ao controle 87.5% (Tabela 13).

Tabela 13 - Percentagem de sobrevivência

Tratamentos	Inoculações	Cultivar Oso Grande (%)		Cultivar Camarosa (%)	
		A	B	A	B
T1	<i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5	100	100	100	100
T2	<i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V6	100	100	100	100
T3	<i>Rhizobium leucaneae</i> BR935	100	100	100	100
T4	<i>Bacillus subtilis</i> CCMA 0401	100	100	100	100
T5	Ab-V5 + BR935	100	100	100	87.5
T6	Ab-V5 + 0401	95.8	100	100	100
T7	BR935 + 0401	100	100	100	87.5
T8	Ab-V6 + BR935	100	100	87.5	87.5
T9	Ab-V6 + 0401	87.5	87.5	87.5	100
T10	Controle Sem bactéria, (H ₂ O destilada estéril)	87.5	87.5	87.5	87.5

Percentagem de sobrevivência das microplantas de morangueiro das cultivares Oso Grande e Camarosa. (A): biotização; (B): Re-inoculação em condições *ex vitro*.

Fonte: Da autora (2024).

3.6 Cultivar Oso Grande (OG) na casa de vegetação

Na biotização da cultivar OG (A), diferentes respostas foram observadas nos parâmetros de comprimento. No comprimento parte aérea (CPA), três tratamentos tiveram maior crescimento, onde se incluíram o consórcio Ab-V6+BR935, com 13.15 cm, seguido do tratamento com Ab-V5, com 12.65 cm e o CCMA 0401, com 12.98 cm. No comprimento da raiz (CR) os consórcios BR935+0401, Ab-V5+0401, Ab-V6+BR935 foram os que se destacaram, com 23.20 cm, 21.21 cm e 20.38 cm, respectivamente, enquanto os demais tratamentos tiveram desempenho semelhante ou inferior ao controle. Na massa seca da parte aérea (MSPA), a biotização com o CCMA 0401 mostrou um aumento de 2.38 vezes em relação ao controle, seguida pelo tratamento com Ab-V5 que apresentou de 1.6 vezes. Os demais tratamentos tiveram valores próximos ao controle. Na massa seca da raiz (MSR), destacaram-se CCMA 0401, Ab-V5 e o consórcio Ab-V5+0401, nos valores de na massa total (MT) destacaram-se o CCMA 0401, Ab-V5 com maior acúmulo (Tabela 14).

Tabela 14 - Variáveis fitotécnicas da cultivar Oso Grande na casa de vegetação
Cv Oso Grande (OG) após biotização e re-inoculação em condições *ex vitro*

Tratamentos	Comprimento (cm)			Massa seca (g)			
	Comprimento parte aérea (CPA)	Comprimento da raiz (CR)	Diâmetro foliar (DF)	Massa seca parte aérea (MSPA)	Massa seca da raiz (MSR)	Massa total (MT)	
Biotização (A)	Ab-V5	12.65 ± 0.2 ^a	13.06 ± 0.17 ^f	11.74 ± 0.1 ^c	1.57 ± 0.08 ^b	0.80 ± 0.03 ^{a, b}	2.37 ± 0.06 ^b
	Ab-V6	9.24 ± 0.12 ^{d, e}	13.18 ± 0.2 ^f	11.63 ± 0.1 ^c	1.01 ± 0.05 ^c	0.50 ± 0.03 ^{e, f}	1.51 ± 0.03 ^d
	BR935	10.44 ± 0.19 ^{b, c}	16.64 ± 0.2 ^e	11.75 ± 0.3 ^c	0.94 ± 0.04 ^c	0.68 ± 0.02 ^{b, c, d}	1.62 ± 0.05 ^{c, d}
	CCMA 0401	12.98 ± 0.2 ^a	15.06 ± 0.2 ^e	14.01 ± 0.2 ^a	2.34 ± 0.06 ^a	0.87 ± 0.03 ^a	3.21 ± 0.06 ^a
	Ab-V5 + BR935	10.89 ± 0.19 ^b	18.89 ± 0.2 ^c	11.84 ± 0.4 ^c	0.94 ± 0.04 ^c	0.55 ± 0.03 ^{d, e}	1.49 ± 0.02 ^d
	Ab-V5 + 0401	10.13 ± 0.08 ^{b, c}	21.21 ± 0.3 ^b	10.24 ± 0.13 ^d	1.03 ± 0.02 ^c	0.80 ± 0.02 ^{a, b}	1.83 ± 0.03 ^c
	BR935 + 0401	9.80 ± 0.13 ^{c, d}	23.10 ± 0.3 ^a	9.93 ± 0.12 ^{d, e}	1.07 ± 0.03 ^c	0.58 ± 0.03 ^{c, d, e}	1.65 ± 0.03 ^{c, d}
	Ab-V6 + BR935	13.15 ± 0.17 ^a	20.38 ± 0.3 ^b	13.56 ± 0.2 ^{a, b}	1.14 ± 0.04 ^c	0.63 ± 0.03 ^{c, d, e}	1.77 ± 0.04 ^c
	Ab-V6 + 0401	8.5 ± 0.12 ^e	16.38 ± 0.1 ^d	8.80 ± 0.13 ^e	0.43 ± 0.02 ^d	0.37 ± 0.03 ^f	0.80 ± 0.04 ^e
Controle A	10.28 ± 0.2 ^{b, c}	18.72 ± 0.2 ^c	12.65 ± 0.19 ^{b, c}	0.98 ± 0.02 ^c	0.70 ± 0.03 ^{b, c}	1.68 ± 0.04 ^{c, d}	
Biotização + Re-inoculação (B)	Ab-V5	13.43 ± 0.19 ^a	15.65 ± 0.23 ^{d, e}	13.55 ± 0.3 ^{a, b}	1.98 ± 0.04 ^a	1.04 ± 0.04 ^a	3.02 ± 0.04 ^a
	Ab-V6	9.93 ± 0.2 ^e	11.41 ± 0.19 ^f	10.48 ± 0.3 ^d	0.81 ± 0.04 ^{d, e}	0.40 ± 0.02 ^d	1.21 ± 0.05 ^f
	BR935	10.08 ± 0.11 ^e	16.08 ± 0.2 ^{d, e}	11.98 ± 0.19 ^c	0.64 ± 0.04 ^e	0.43 ± 0.02 ^{c, d}	1.07 ± 0.04 ^f
	CCMA 0401	13.39 ± 0.16 ^a	14.74 ± 0.2 ^e	13.41 ± 0.14 ^{a, b}	2.14 ± 0.08 ^a	1.10 ± 0.06 ^a	3.24 ± 0.09 ^a
	Ab-V5 + BR935	11.90 ± 0.09 ^{b, c}	25.3 ± 0.8 ^a	12.78 ± 0.16 ^{b, c}	1.62 ± 0.03 ^b	0.75 ± 0.02 ^b	2.37 ± 0.04 ^b
	Ab-V5 + 0401	13.25 ± 0.2 ^a	22.58 ± 0.3 ^b	14.13 ± 0.24 ^a	1.34 ± 0.04 ^c	0.99 ± 0.07 ^a	2.33 ± 0.07 ^{b, c}
	BR935 + 0401	10.7 ± 0.2 ^{d, e}	23.49 ± 0.4 ^{a, b}	13.03 ± 0.2 ^{a, b, c}	1.43 ± 0.02 ^{b, c}	0.61 ± 0.03 ^{b, c}	2.04 ± 0.09 ^{c, d}
	Ab-V6 + BR935	12.74 ± 0.17 ^{a, b}	17.48 ± 0.3 ^{c, d}	13.46 ± 0.14 ^{a, b}	1.33 ± 0.04 ^c	0.54 ± 0.02 ^{c, d}	1.87 ± 0.05 ^{d, e}
	Ab-V6 + 0401	10.40 ± 0.2 ^e	18.34 ± 0.2 ^c	9.98 ± 0.3 ^d	0.88 ± 0.03 ^d	0.36 ± 0.03 ^d	1.24 ± 0.06 ^f
Controle B	11.54 ± 0.4 ^{c, d}	18.01 ± 0.2 ^c	12.51 ± 0.19 ^{b, c}	0.96 ± 0.05 ^d	0.75 ± 0.04 ^b	1.71 ± 0.08 ^e	

Variáveis fitotécnicas das cultivares Oso Grande biotizadas individualmente e em consórcios que foram transplantadas para a casa de vegetação. (A) Biotizadas; (B) Re-inoculadas Comprimento parte aérea (CPA), Comprimento da raiz (CR), Massa seca parte aérea (MSPA), Massa seca da raiz (MSR), Massa total (MT). Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$).

Fonte: Da autora (2024).

Na re-inoculação da cultivar OG, observou-se novamente que os tratamentos com Ab-V5 e CCMA 0401, junto com os consórcios Ab-V5+0401 e o Ab-V6+BR935, tiveram a maior influência no comprimento da parte aérea (CPA). Para o comprimento da raiz (CR), os consórcios Ab-V5+BR935, BR935+0401 e Ab-V5+0401 apresentaram os maiores comprimentos. Na MSPA, os tratamentos com CCMA 0401, Ab-V5, Ab-V5+BR935, BR935+0401, Ab-V5+0401, Ab-V6+ BR935 se destacaram nesse parâmetro. Para a MSR, destacaram-se novamente Ab-V5, CCMA 0401 e o consórcio Ab-V5+0401. Por último, a MT mostrou que a re-inoculação favoreceu este parâmetro, especialmente com as cepas Ab-V5, CCMA 0401, e os consórcios Ab-V5+BR935, Ab-V5+0401, BR935+0401 que foram reintroduzidos (Tabela 14). A produção de estolões na cultivar OG tanto nos tratamentos biotizados quanto os tratamentos re-inoculados com Ab-V5, CCMA 0401 e o consórcio Ab-V5+0401, este último, somente na re-inoculação, apresentaram entre 3 a 4 estolões, os demais tratamentos tiveram produções próximas ao controle que teve ente 1 a 2 estolões.

3.7 Quantificação de clorofila e carotenóides na cultivar OG

Na cultivar OG, a quantificação de clorofila *a* durante a biotização indicou que os consórcios Ab-V5+0401 e Ab-V6+BR935 promoveram maior acúmulo, enquanto os demais tratamentos apresentaram valores próximos ou abaixo do controle. Para a clorofila *b* e carotenóides, os tratamentos Ab-V5+0401 e Ab-V6+ BR935 e *Bacillus subtilis* CCMA 0401 foram os que apresentaram maiores acúmulos. Na re-inoculação da cv OG, os consórcios Ab-V5+0401, Ab-V6+BR935 e Ab-V5+BR935 demonstraram os maiores níveis de clorofila *a* e na clorofila *b* e nos carotenóides (Tabela 15).

Tabela 15 - Concentração de clorofilas e carotenóides na cultivar Oso Grande

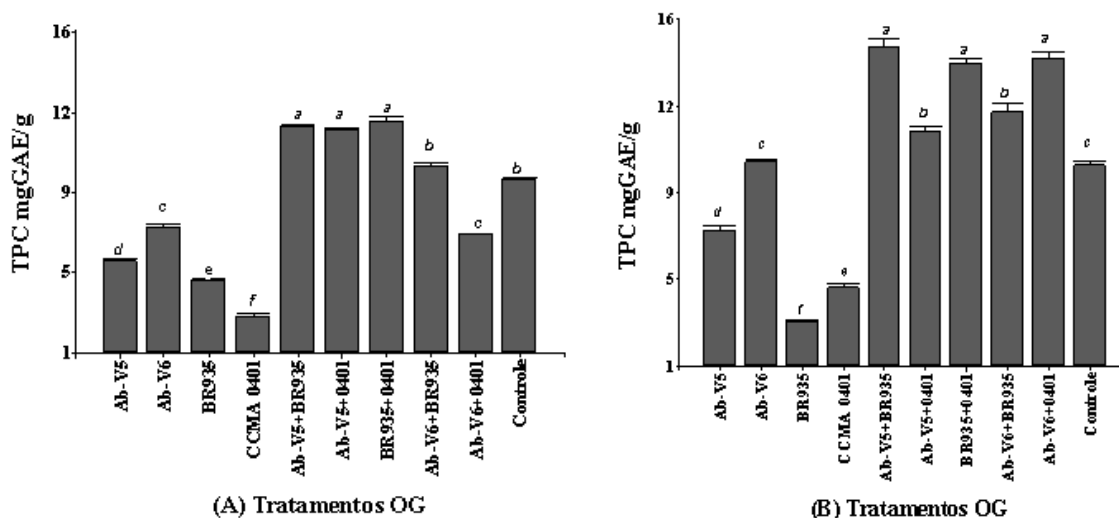
Tratamentos Cv OG	(A) Biotização			(B) Re-inoculação		
	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Carotenóides	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Carotenóides
<i>Azospirillum brasiliense</i> Ab-V5	4.67±0.11 ^d _e	1.25±0.03 ^c	0.78 ±0.02 ^f	6.45±0.06 ^d	1.69±0.03 ^e	1.07±0.08 ^g
<i>Azospirillum brasiliense</i> Ab-V6	5.11±0.24 ^d	1.36±0.3 ^c	0.70±0.04 ^f	6.35±0.06 ^d	0.95±0.03 ^f	0.80±0.01 ^h
<i>Rhizobium leucaneae</i> BR935	3.72±0.03 ^e	0.96±0.01 ^c	0.65±0.05 ^f	5.37±0.05 ^d	2.54±0.03 ^c _d	1.45±0.01 ^f
<i>Bacillus subtilis</i> CCMA 0401	10.16±0.4 ^b	3.92±0.17 ^a	2.48±0.11 ^c	10.63±0.1 ^c	3.70±0.09 ^b	2.42±0.02 ^{c, d}
Ab-V5 + BR935	8.48±0.38 ^c	2.06 ±0.11 ^b	1.60±0.07 ^d	13.65±0.1 ^b	3.55±0.02 ^b	3.02±0.04 ^b
Ab-V5 + 0401	14.22±0.1 ^a	3.67±0.05 ^a	2.77±0.08 ^b	15.42±0.4 ^a	4.33±0.12 ^a	3.46±0.06 ^a
BR935 + 0401	8.80±0.1 ^c	2.08 ±0.04 ^b	1.83 ±0.03 ^d	11.88±0.1 ^c	2.84±0.03 ^c	2.58±0.02 ^c
Ab-V6 + BR935	13.80±0.08 ^a	3.90±0.03 ^a	3.28 ±0.02 ^a	15.18±0.6 ^a	4.68±0.2 ^a	3.08±0.11 ^b
Ab-V6 + 0401	10.37±0.1 ^b	2.02 ±0.02 ^b	1.18±0.02 ^e	10.57±0.1 ^c	2.46±0.03 ^c _d	2.32 ±0.03 ^d
Controle	10.87±0.1 ^b	2.29±0.04 _b	1.72±0.02 ^d	10.90±0.1 ^c	2.27±0.04 ^d	1.73±0.02 ^e

Quantificação dos teores clorofilas e carotenóides na cultivar Oso Grande. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$).

Fonte: Da autora (2024).

O conteúdo total de fenóis (TPC) nas plantas biotizadas (Figura 10 A) mostrou que três tratamentos em consórcios com a cepa Ab-V5 apresentaram maior concentração, com valores entre 11.85 mgGAE/g e 11.44 mgGAE/g, quando comparados ao controle (9.11 mgGAE/g) e os tratamentos individuais (variando de 6.89 mgGAE/g a 2.75 mgGAE/g). Nas plantas re-inoculadas (Figura 10 B), o acúmulo de TPC, também foi maior nos consórcios, destacando-se Ab-V5+BR935, BR935+0401, e Ab-V6+0401, os tratamentos individuais que tiveram valores entre 2.93mgGAE/g a 9.84 mgGAE/g, e o controle esteve com valores de 9.68 mgGAE/g.

Figura 10 - TPC em mudas biotizadas (A) e em mudas e re-inoculadas (B)



Quantificação do Conteúdo de Fenóis Totais (TPC) na cultivar Oso Grande. (A) Biotizadas; (B) Re- inoculadas. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$).

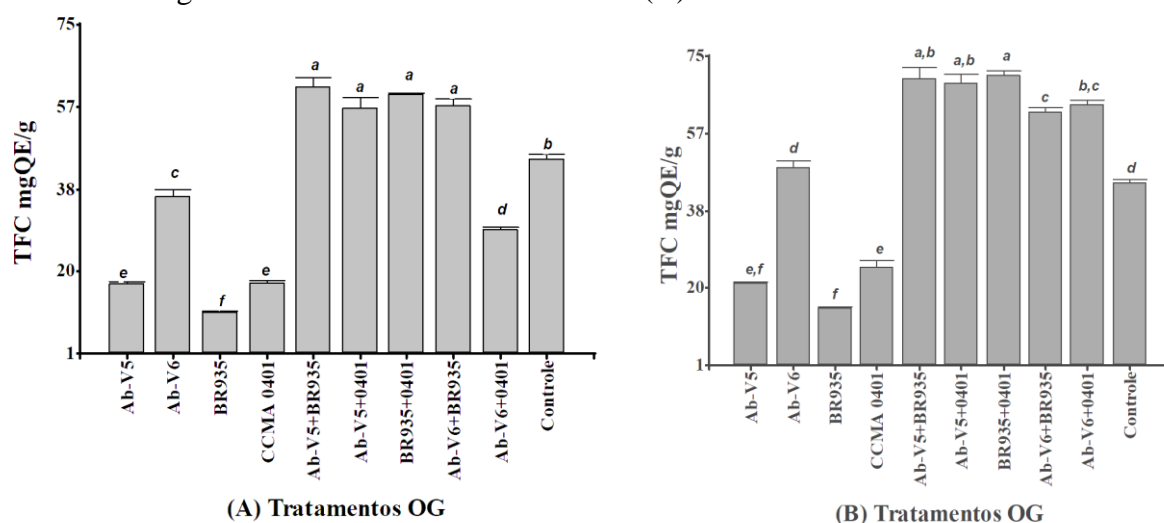
Fonte: Da autora (2024).

3.8 Quantificação de flavonóides na cultivar OG

A quantificação do conteúdo total flavonóides (TFC) na cultivar OG mostrou que nos tratamentos biotizados, Figura 11A, revelou que as associações bacterianas estimularam também e esse parametro quando comparados com a biotizacao individual, onde quatro tratamentos em consórcios apresentaram maior acúmulo, com valores entre 60.91 mgQE/g e 56.12 mgQE/g, sem apresentar diferenças significativas entre eles.

O controle apresentou 44.87 mgQE/g, enquanto os tratamentos individuais tiveram valores menores, variando de 10.31 mgQE/g a 36.19 mgQE/g. Na re-inoculação, também se encontrou que os consórcios foram os que mais influenciaram no acúmulo do TFC, assim os cinco consórcios tiveram acúmulos entre 61.62 mgQE/g a 70.47 mgQE/g. Logo após esteve o tratamento individual com Ab-V6 que apresentou 48.35 mgQE/g, seguido do controle que registrou 44.61 mgQE/g. Os demais tratamentos individuais apresentaram menores acúmulos de TFC (Figura 11 B).

Figura 11 - TFC em mudas biotizadas (A) e em mudas e re-inoculadas



Quantificação do Conteúdo de Flavonóides Totais (TFC) na cultivar Oso Grande. (A) Biotizadas; (B) Re-inoculadas Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$).

Fonte: Da autora (2024).

3.9 Cultivar Camarosa (CA) na casa de vegetação

As mudas biotizadas da cultivar Camarosa (CA) não tiveram diferenças significativas entre os tratamentos no CPA e o controle. No entanto, o CR mostrou variações: os consórcios BR935+0401 teve um crescimento de 27.35 cm, seguido do Ab-V5+BR935 com 20.06 cm, BR935 com 19.10 cm e Ab-V5+0401 com 18.83 cm, destacando-se em relação aos demais tratamentos. Na MSPA, os tratamentos Ab-V5, Ab-V5+0401 apresentaram o maior acúmulo de biomassa, os tratamentos Ab-V5+BR935, BR935+0401, e BR935 tiveram valores próximos ao controle. Na MSR não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, e por último, o tratamento com Ab-V5 destacou-se no acúmulo de massa total (Tabela 16).

Tabela 16 - Variáveis fitotécnicas da cultivar Camarosa na casa de vegetação

		Comprimento (cm)			Massa seca (g)		
Tratamentos		Comprimento parte aérea (CPA)	Comprimento da raiz (CR)	Diâmetro foliar (DF)	Massa seca parte aérea	Massa seca da raiz	Massa total (MT)
					(MSPA)	(MSR)	
Biotização (A)	Ab-V5	10.78 ± 0.2 ^{b, c, d}	18.11 ± 0.6 ^{b, c, d}	12.5 ± 0.2 ^{b, c, d}	1.38 ± 0.04 ^a	0.79 ± 0.04 ^a	2.17 ± 0.04 ^a
	Ab-V6	9.75 ± 0.3 ^{d, e}	14.38 ± 0.3 ^f	11.25 ± 0.2 ^d	0.70 ± 0.04 ^{d, e}	0.37 ± 0.03 ^c	1.07 ± 0.05 ^c
	BR935	12.00 ± 0.1 ^a	19.10 ± 0.3 ^{b, c}	12.30 ± 0.2 ^{b, c, d}	0.96 ± 0.07 ^{b, c}	0.59 ± 0.06 ^{a, b}	1.55 ± 0.08 ^b
	CCMA 0401	11.13 ± 0.2 ^{a, b, c}	15.83 ± 0.4 ^{e, f}	12.44 ± 0.2 ^{b, c, d}	0.91 ± 0.04 ^{b, c, d}	0.63 ± 0.05 ^a	1.54 ± 0.07 ^b
	Ab-V5 + BR935	11.86 ± 0.3 ^{a, b}	20.06 ± 0.5 ^b	12.86 ± 0.3 ^{a, b, c}	0.99 ± 0.03 ^{b, c}	0.77 ± 0.03 ^a	1.76 ± 0.07 ^b
	Ab-V5 + 0401	12.29 ± 0.2 ^a	18.83 ± 0.2 ^{b, c}	13.96 ± 0.2 ^a	1.15 ± 0.06 ^{a, b}	0.66 ± 0.03 ^a	1.81 ± 0.05 ^b
	BR935 + 0401	10.34 ± 0.2 ^{c, d, e}	27.35 ± 0.6 ^a	13.70 ± 0.4 ^b	1.0 ± 0.06 ^{b, c}	0.71 ± 0.04 ^a	1.71 ± 0.08 ^b
	Ab-V6 + BR935	9.54 ± 0.1 ^e	17.69 ± 0.4 ^{c, d, e}	9.10 ± 0.4 ^e	0.62 ± 0.03 ^e	0.36 ± 0.03 ^c	0.98 ± 0.05 ^c
	Ab-V6 + 0401	9.80 ± 0.1 ^{d, e}	15.53 ± 0.1 ^f	12.21 ± 0.4 ^{c, d}	0.79 ± 0.03 ^{d, e}	0.39 ± 0.01 ^{b, c}	1.18 ± 0.02 ^c
	Controle A	11.15 ± 0.3 ^{a, b, c}	16.28 ± 0.2 ^{d, e, f}	12.75 ± 0.3 ^{a, b, c}	0.88 ± 0.03 ^{c, d}	0.65 ± 0.07 ^a	1.53 ± 0.08 ^b
Biotização + Re-inoculação (B)	Ab-V5	13.03 ± 0.3 ^a	14.56 ± 0.2 ^{d, e}	14.14 ± 0.2 ^a	1.48 ± 0.05 ^a	0.75 ± 0.04 ^a	2.23 ± 0.07 ^a
	Ab-V6	10.26 ± 0.3 ^{b, c, d}	12.83 ± 0.3 ^e	10.31 ± 0.3 ^e	0.52 ± 0.04 ^e	0.41 ± 0.03 ^{c, d}	0.93 ± 0.05 ^{c, d}
	BR935	11.73 ± 0.2 ^{a, b}	14.01 ± 0.2 ^{d, e}	11.25 ± 0.1 ^{d, e}	0.94 ± 0.05 ^{b, c}	0.68 ± 0.04 ^{a, b}	1.62 ± 0.08 ^b
	CCMA 0401	10.33 ± 0.1 ^{b, c, d}	14.59 ± 0.5 ^{d, e}	12.16 ± 0.7 ^{c, d}	0.76 ± 0.05 ^{c, d}	0.41 ± 0.02 ^{c, d}	1.17 ± 0.06 ^c
	Ab-V5 + BR935	12.30 ± 0.3 ^b	14.85 ± 0.4 ^{d, e}	13.53 ± 0.2 ^{a, b}	0.91 ± 0.04 ^{b, c}	0.62 ± 0.05 ^{a, b}	1.52 ± 0.06 ^b
	Ab-V5 + 0401	12.83 ± 0.2 ^a	17.91 ± 0.3 ^c	10.61 ± 0.3 ^e	1.36 ± 0.03 ^a	0.72 ± 0.03 ^{a, b}	2.08 ± 0.05 ^a
	BR935 + 0401	10.29 ± 1.2 ^{b, c, d}	19.25 ± 1.3 ^b	8.58 ± 0.1 ^f	0.62 ± 0.04 ^{d, e}	0.20 ± 0.02 ^d	0.82 ± 0.05 ^d
	Ab-V6 + BR935	9.04 ± 0.1 ^{c, d}	19.63 ± 0.3 ^b	8.43 ± 0.2 ^f	0.51 ± 0.03 ^e	0.36 ± 0.03 ^d	0.87 ± 0.04 ^d
	Ab-V6 + 0401	8.89 ± 0.1 ^d	27.71 ± 0.6 ^a	10.24 ± 0.1 ^e	1.09 ± 0.02 ^b	0.55 ± 0.01 ^{b, c}	1.64 ± 0.04 ^b
	Controle B	11.25 ± 0.3 ^{a, b, c}	16.15 ± 0.2 ^{c, d}	12.63 ± 0.3 ^{b, c}	0.84 ± 0.04 ^c	0.66 ± 0.05 ^{a, b}	1.50 ± 0.06 ^b

Variáveis fitotécnicas das cultivares Camarosa biotizadas individualmente e em consórcios que foram transplantadas para a casa de vegetação. (A) Biotizadas; (B) Re-inoculadas Comprimento parte aérea (CPA), Comprimento da raiz (CR), Massa seca parte aérea (MSPA), Massa seca da raiz (MSR), Massa total (MT). Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$).

Fonte: Da autora (2024).

Durante a re-inoculação na cultivar CA, o tratamento com Ab-V5 foi o que mais influenciou o CPA, sem embargo não teve diferenças significativas quando comparado com o controle. O consórcio Ab-V6+0401 apresentou maior CR, com 27.71 cm, seguido dos tratamentos com Ab-V6+BR935 e BR935+0401. Na MSPA, os tratamentos Ab-V5, Ab-V5+0401, Ab-V6+0401 mostraram maior acúmulo. Enquanto no MSR não houve diferença significativa, mas a MT incrementou com os tratamentos Ab-V5 e Ab-V5 + 0401. Finalmente, a produção de estolões na cultivar CA foi menor que a cultivar OG, onde encontrou-se uma produção similar entre os tratamentos e o controle, com produções entre 1-2 estolões.

3.10 Quantificação de clorofila na cultivar CA

Na cultivar CA a biotização (A) revelou que o tratamento com Ab-V5 apresentou o maior acúmulo de clorofila *a* com 14.24 µg/g, seguido por Ab-V6+BR935 com 12.90 µg/g. Na clorofila *b* seis tratamentos mostraram aumento, e os carotenóides foram incrementados em cinco tratamentos (Tabela 17). Na re-inoculação (B), todos os cinco consórcios promoveram aumento dos níveis de clorofila *a* clorofila *b* e carotenóides em comparação ao controle.

Tabela 17 - Concentração de clorofilas e carotenóides na cultivar Camarosa

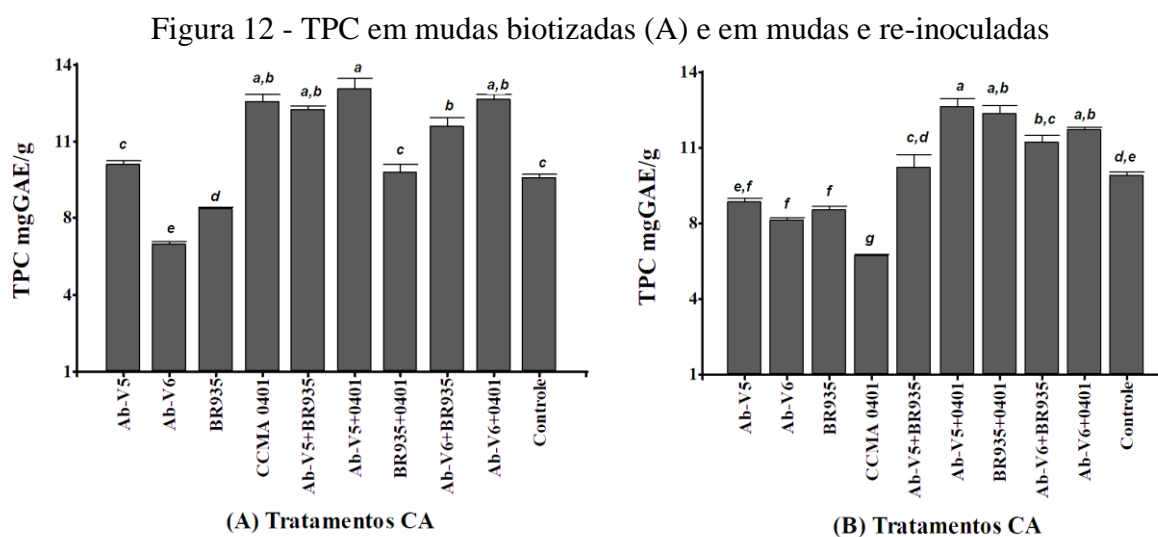
Tratamentos Cv Camarosa	(A) Biotização			(B) Re-inoculação		
	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Carotenóides	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Carotenóides
<i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5	14.24±0.38 ^a	3.11±0.12 ^a	1.92±0.04 ^f	9.42±0.19 ^d	1.83±0.04 ^c _d	1.29±0.02 ^e
<i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V6	9.15±0.19 ^{e, f}	1.93±0.04 ^e	1.15±0.02 ^g	7.82±0.28 ^d	1.62±0.07 ^d	1.15±0.04 ^{e, f}
<i>Rhizobium leucaneae</i> BR935	7.89 ±0.22 ^f	1.26±0.03 ^d	0.97±0.02 ^g	8.26±0.12 ^d	1.24±0.01 ^d	1.06 ±0.01 ^{e, f}
<i>Bacillus subtilis</i> CCMA 0401	11.70±0.23 ^{b, c}	3.07±0.05 ^a	2.65±0.06 ^{b, c}	7.79±0.12 ^d	1.58±0.03 ^d	0.79 ±0.01 ^f
Ab-V5+BR935	10.30±0.26 ^{d, e}	1.93±0.07 ^b	2.30±0.04 ^{d, e}	16.97 ±0.5 ^a	4.77±0.16 ^a	3.45±0.10 ^a
Ab-V5+0401	10.72±0.37 ^{c, d}	3.47±0.19 ^a	2.42±0.07 ^{c, d, e}	14.66±0.22 ^{b, c}	3.81±0.19 ^b	2.23±0.08 ^{c, d}
BR935+0401	11.81±0.12 ^{b, c}	3.32±0.04 ^a	2.47±0.02 ^{c, d}	16.44±0.7 ^{a, b}	4.15±0.25 ^{a, b}	2.99±0.13 ^b
Ab-V6+BR935	12.90±0.20 ^b	3.42±0.08 ^a	2.94±0.04 ^a	16.71±0.3 ^a	4.28±0.96 ^{a, b}	2.04±0.06 ^b
Ab-V6+0401	11.94±0.20 ^{b, c}	3.42±0.06 ^a	2.75±0.04 ^{a, b}	13.08±0.5 ^c	3.76±0.17 ^b	2.52±0.01 ^c
Controle	9.48±0.20 ^{d, e}	2.59±0.05 ^b	2.22±0.05 ^e	9.22±0.06 ^d	2.40±0.13 ^c	2.04±0.01 ^d

Quantificação dos teores clorofilas e carotenóides na cultivar Camarosa. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$).

Fonte: Da autora (2024).

3.11 Quantificação de Fenóis na cultivar Camarosa

Na biotização da cultivar CA (Figura 12A), o tratamento com Ab-V5+0401 teve o maior acúmulo de TPC, com 12.97 mgGAE/g, seguido por Ab-V6+0401, CCMA0401 e Ab-V5+BR935, sem diferenças significativas entre eles. Já o Ab-V6 BR935 apresentou 11.37 mgGAE/g, os demais tratamentos apresentaram valores similares ou inferiores ao controle (9.19 mgGAE/g).



Quantificação do Conteúdo de Fenóis Totais (TPC) na cultivar Camarosa. (A) Biotizadas; (B) Re-inoculadas Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$).

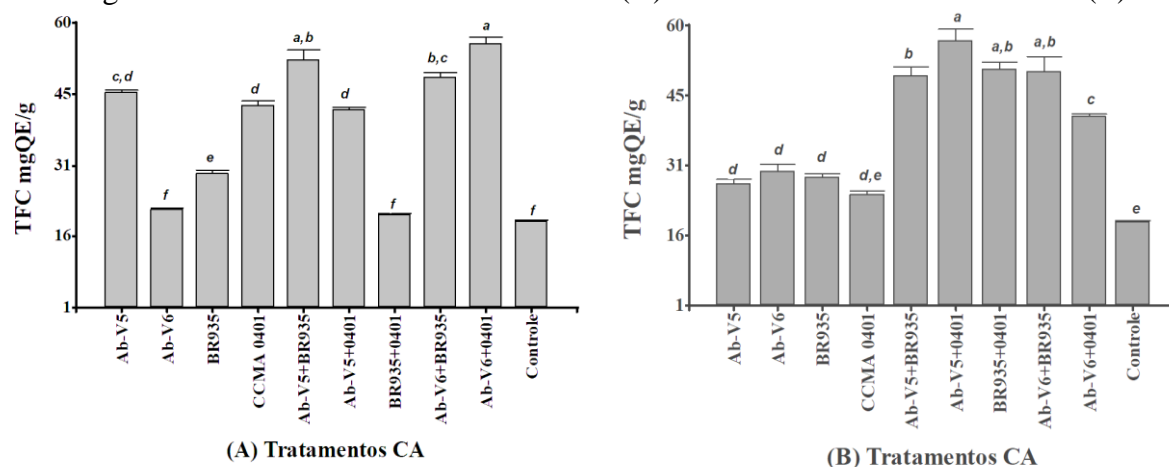
Fonte: Da autora (2024).

Nas plantas re-inoculadas da cultivar CA (Figura 12B), o conteúdo de TPC mostrou que o consórcio Ab-V5+0401 foi o que mais se destacou e teve um acúmulo similar à biotização com 12.55 mgGAE/g, seguido por BR935+0401 e Ab-V6+0401. Os consórcios Ab-V6+BR935 e o Ab-V5+BR935 apresentaram 9.91 mgGAE/g e 9.59 mgGAE/g, respectivamente. O controle e os tratamentos individuais tiveram menor acúmulo em comparação aos tratamentos em consórcios. Por último, tanto a biotização quanto a re-inoculação tiveram uma produção TPC em concentrações similares.

3.12 Quantificação de flavonóides na cultivar CA

A quantificação de flavonóides da cultivar CA se observa na figura 13A para as mudas biotizadas e a Figura 13B representa as mudas re-inoculadas.

Figura 13 - TFC em mudas biotizadas CA (A) e em mudas e re-inoculadas CA (B)



Quantificação do Conteúdo de Flavonóides Totais (TFC) na cultivar Camarosa. (A) Biotizadas; (B) Re-inoculadas Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$).

Fonte: Da autora (2024).

Na biotização da cultivar CA (Figura 13A), o acúmulo de flavonóides TFC foi maior nos tratamentos Ab-V6+0401 (55.81 mgQE/g), Ab-V5+BR935 (52.31 mgQE/g), e Ab-V6+BR935 (48.68 mgQE/g). Em seguida, estiveram os tratamentos Ab-V5 (45.64 mgQE/g), CCMA 0401 (42.97 mgQE/g) e Ab-V5+0401 (42.02 mgQE/g), enquanto os demais tratamentos variaram entre 28.78 mgQE/g a 20.35 mgQE/g, e o controle teve valores de 18.84 mgQE/g. Na re-inoculação da cultivar CA (Figura 6B), todos os consórcios apresentaram aumento no acúmulo de TFC, com destaque para Ab-V5+0401 (56.94 mgQE/g). Os outros consórcios variaram entre 50.75 mgQE/g e 40.95 mgQE/g. Enquanto os tratamentos individuais, tiveram menores acúmulos (entre 29.33 mgQE/g e 24.44 mgQE/g) que os consórcios, por último, se encontrou o controle com menor acúmulo de TFC.

4 DISCUSSÃO

O objetivo inicial deste estudo foi realizar a caracterização bioquímica de dez cepas bacterianas quanto à sua capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN), solubilização de fosfato, potássio, cálcio e zinco, produção de enzimas hidrolíticas (amilases, celulase, protease, lipases e quitinases), além da produção de sideróforos e cianeto de hidrogênio HCN. Também foi investigado o desempenho da biotização e a re-inoculação das quatro cepas bacterianas mais eficientes, bem como seus consórcios, na adaptação de mudas de morangueiro *in vitro* às condições *ex vitro*. Esta pesquisa destaca a importância do uso de BPCV como uma alternativa biotecnológica promissora para a cultura de tecidos vegetais

(CTV) (Soumare *et al.*, 2021). A seleção adequada de bactérias compatíveis com as mudas *in vitro* é essencial, pois a compressão das interações benéficas entre essas bactérias e os explantes na condição *in vitro* é fundamental para maximizar os benefícios dessa associação, que podem resultar em mudanças positivas no desenvolvimento das plantas, facilitando sua adaptação ao ambiente (Gianinazzi *et al.*, 2003; Ważny *et al.*, 2024).

Os resultados indicaram que 100% das cepas analisadas foram capazes de realizar a FBN e solubilizar fosfatos. Além disso, 90% das cepas solubilizaram potássio, 40% foram capazes de solubilizar cálcio, 50% solubilizaram o zinco, e todas apresentaram a produção de ácidos orgânicos. Assim, as BPCV exercem um papel importante na nutrição vegetal ao promover a solubilização e disponibilização de nutrientes essenciais. Estudos mostram que algumas BPCV são eficientes na solubilização de compostos como o fósforo insolúvel, principalmente através da produção de ácidos orgânicos que diminuem o pH do solo, facilitando a liberação desse nutriente para as plantas (Chen *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2013). Nesta pesquisa, observou-se que todas as cepas avaliadas solubilizaram o fosfato e produziram ácidos orgânicos. Adicionalmente, as BPCV também contribuem para a fixação biológica de nitrogênio, convertendo o nitrogênio atmosférico em formas assimiláveis pelas plantas, como amônia, essencial para o crescimento vegetal (Rees *et al.*, 2005; De Bruijn, 2015). Desta forma, a aplicação de BPCV pode ser uma estratégia que podem contribuir para o aumento da produtividade agrícola ao otimizar o manejo de nutrientes, uma vez que pode reduzir a dependência de fertilizantes promovendo uma agricultura mais sustentável (Vejan *et al.*, 2016; Orozco-Mosqueda, 2021).

Além disso, as BPCV podem sintetizar enzimas hidrolíticas, que facilitam a degradação de compostos orgânicos no solo, melhorando a disponibilidade de nutrientes para as plantas (Vessey, 2003; Glick, 2012). Neste estudo, as enzimas amilases, celulasas, proteases e lipases foram predominantemente produzidas pelas três cepas do gênero *Bacillus*. Esse gênero é amplamente conhecido pela produção de várias enzimas hidrolíticas, que tem aplicações diretas tanto na nutrição das plantas quanto no controle biológico de fitopatógenos. Enzimas como as quitinases, por exemplo, têm ação hidrolítica direta sobre certos patógenos contribuindo para o controle biológico (Raaijmakers *et al.*, 2002). Nesta pesquisa verificou-se que as cepas produtoras de quitinases incluíram *B. megaterium* CCMA 0004, *B. subtilis* CCMA 0401, *R. leucaneae* BR935 e *R. tropici* CIAT 899. Assim, a ação conjunta dessas bactérias na rizosfera poderia contribuir na fertilidade do solo e no controle biológico das culturas agrícolas.

Algumas BPCV são conhecidas pela capacidade de produzir sideróforos, moléculas orgânicas de baixo peso molecular cuja principal função é capturar e transportar ferro em condições de baixa disponibilidade. O ferro é um elemento essencial para diversos processos biológicos, como a fotossíntese e a respiração, tanto em microrganismos quanto em plantas (Marschner; Crowley; Rengel, 2011; Pahari *et al.*, 2017). Dessa forma, os sideróforos produzidos pelas BPCV desempenham um papel crucial ao aumentar a disponibilidade de ferro para as plantas, melhorando o seu crescimento e produtividade (Timofeva *et al.*, 2022). Além disso, também podem contribuir na supressão de patógenos ao competir com eles pela disponibilidade do ferro, conferindo uma função indireta de biocontrole (Crowley, 2006; Rajkumar *et al.*, 2010). Nesta pesquisa, verificou-se que as cepas produtoras de sideróforos foram *B. amyloliquefaciens* CCMA 0112 com 84.87%, *Sinorhizobium fredii* BR921 com 80.91%, *R. tropici* CIAT 899 com 55.43%, *B. megaterium* CCMA 0004 com 37.71%, e *Bacillus subtilis* CCMA 0401 com 20.88%. Estudos anteriores descreveram a produção de sideróforos pelo gênero *Bacillus*, destacando a produção de catecolatos sob condições de deficiência de ferro (Patel *et al.*, 2009). Cepas de *B. subtilis* também foram relatadas por sua ação de biocontrole contra *Fusarium* e por promoverem o crescimento em plantas de pimenta (Yu *et al.*, 2011). Ademais, os gêneros como *Rhizobium* e *Sinorhizobium* também são descritos na produção de sideróforos (Datta; Chakrabarty, 2014).

Por outro lado, a produção de cianeto de hidrogênio (HCN) também foi avaliada neste estudo, sendo observada a maior concentração nas cepas *B. megaterium* CCMA 0004, *B. subtilis* CCMA 0401, *R. tropici* CIAT 899 e *B. japonicum* CCMA 0088, em ambas as condições avaliadas, tanto em placa quanto em meio líquido. O HCN é um metabólito secundário volátil produzido a partir do aminoácido da glicina, que pode ser liberado pelos exsudatos radiculares (Blumer; Haas, 2000; Andrade *et al.*, 2020). A produção de HCN já foi relatada em gêneros como *Pseudomonas* spp. (Ahmad; Ahmad; Khan, 2008; Anand *et al.*, 2020; Michelsen; Stougaard, 2012), e *Bacillus* spp (Abd El-Rahman *et al.*, 2019). O HCN também é reconhecido por seu papel na inibição do crescimento de certos patógenos e nematóides, tornando-o uma ferramenta valiosa na promoção do crescimento das plantas e no biocontrole de doenças (Ramette *et al.*, 2003). Estudos anteriores identificaram a *P. chlororaphis* como uma das melhores produtoras de HCN, com valor máximo de absorvância de 0.047 (Abd El-Rahman *et al.*, 2019), os resultados deste estudo indicam que as BPCV analisadas apresentaram produção de HCN similares ou superiores.

As dez cepas bacterianas aqui estudadas também foram previamente avaliadas no LCT/LABIMP-UFLA, onde foram caracterizadas quanto à produção de ácido índol acético

(AIA), giberelinas (GA) ácido salicílico (AS) e a enzima aminociclopropano-1-carboxílico deaminase (ACCD). Observando-se que a maior produção de AIA ocorreu após 144h pelo *B. japonicum* CCMA 0088, seguido das cepas dos gêneros *Azospirillum* e *Sinorhizobium*. As giberelinas foram produzidas principalmente pelas duas cepas de *Azospirillum* após 144 horas. A produção de ácido salicílico destacou *A. brasilense* Ab-V5 foi o principal produtor, seguido do *B. megaterium*, *B. subtilis*, e *A. brasilense* Ab-V6. A quantificação da ACCD revelou o gênero *Bacillus* como principal produtor. Estes estudos também relataram o efeito destas cepas na biotização de duas cultivares de batata (*Solanum tuberosum* L.), observando que *A. brasilense* Ab-V5, *R. tropici* CIAT 899, *A. brasilense* Ab-V5+B. *megaterium* aumentaram significativamente pelo menos um parâmetro de crescimento em ambas as cultivares e sob condições *in vitro* e *ex vitro* (Molina *et al.*, 2024). Assim, destacasse que nesta pesquisa a cepa *A. brasilense* Ab-V5 e algumas de suas combinações foram relevantes na promoção de crescimento, podendo também ser possibilitado pela produção de AIA e giberelinas.

Ademais, no LCT/LABIMP-UFLA, também foi previamente avaliada a biotização de microplantas de morangueiro das cultivares OG e CA com as mesmas cepas bacterianas permitindo a seleção dos melhores gêneros: *Azospirillum*, Ab-V5 e Ab-V6, *B. subtilis* CCMA 0401 e o *R. leucaneae* BR935, que foram utilizados na formação de consórcios bacterianos encontrando-se também uma resposta positiva durante a biotização *in vitro*, desta forma, este estudo é a continuação do Artigo 1, onde microplantas de morangueiro foram biotizadas em condições *in vitro*. Da mesma forma que influenciaram na melhora de alguns dos parâmetros fitotécnicos, fotossintéticos e bioquímicos, apresentando mudanças no acúmulo de fenóis e flavonóides, quando comparados com o controle, que foi fertilizado com solução de Hoagland completa enquanto que os tratamentos biotizados e re-inoculados foram fertilizados com uma solução Hoagland reduzida, demonstrando assim o potencial das BPCV na redução do consumo de fertilizantes, e se estabelecendo como uma alternativa eficaz para a formulação de bioinoculantes individuais ou em consorciações.

Observou-se que na cultivar OG, durante a biotização (A) os tratamentos com *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e *Bacillus subtilis* CCMA 0401 se destacaram no acúmulo da biomassa total (MT). Durante a re-inoculação (B) da cultivar OG, houve um incremento da biomassa total nos tratamentos individuais com Ab-V5 e CCMA 0401, além dos consórcios formados por Ab-V5+BR935, Ab-V5+0401 e BR935+0401. Em relação ao acúmulo de clorofilas e carotenóides, observou-se que, nas duas condições avaliadas, a clorofila *a* clorofila *b* e carotenóides se acumularam principalmente nos consórcios Ab-V5+0401 e Ab-

V6+BR935. A quantificação de fenóis TPC durante a biotização (A) revelou maiores concentrações nos três tratamentos em consórcios que incluíam a cepa Ab-V5. Nos tratamentos re-inoculados (B) destacaram-se os consórcios Ab-V5+BR935, BR935+0401 e Ab-V6+040, assim se observou que em ambas as condições avaliadas os consórcios estimularam o maior acúmulo de TPC na cultivar OG. Por fim, o acúmulo de flavonóides totais TFC durante a biotização (A) revelou que quatro dos cinco consórcios se destacaram nesse parâmetro, enquanto, na re-inoculação (B), todos os cinco consórcios apresentaram maior acúmulo, neste sentido observou-se que os consórcios bacterianos induziram maiores mudanças nos perfis destes metabolitos secundários, relatos anteriores já têm destacado a modulação de fenóis, flavonoides em plantas quando inoculadas com BPCV (Chamam *et al.*, 2013; Miotto-Vilanova *et al.*, 2019).

Estudos anteriores também indicam que algumas BPCV promovem o aumento da produção de clorofilas e carotenóides em morangueiros, melhorando a fotossíntese e o desenvolvimento das plantas, esse benefício ocorre principalmente pela capacidade das BPCV de aumentar a disponibilidade de nutrientes essenciais, como nitrogênio, ferro e magnésio, que são elementos fundamentais na biossíntese de clorofila (Eşitken *et al.*, 2010; Guerrero- Molina *et al.*, 2014). Desta forma, as BPCV podem induzir diversos estímulos sobre a micoplântula, e a seleção adequada é fundamental para o desenvolvimento das interações benéficas, assim, as BPCV compatíveis podem ser útil no sucesso das fases de endurecimento aclimação das plântulas *in vitro* durante a passagem para as condições *ex vitro* (Orlikowska *et al.*, 2017).

Na cultivar CA, observou-se que, durante a biotização (A) a cepa Ab-V5 promoveu um aumento na MT assim como também na re-inoculação (B), onde Ab-V5 e o consórcio Ab-V5+0401 apresentaram maior acúmulo de biomassa total. Além disso, durante a biotização (A), o tratamento com Ab-V5 apresentou maior acúmulo na clorofila *a*, enquanto a clorofila *b* foi aumentada em quatro consórcios e nos tratamentos individuais com Ab-V5 e CCMA0401. Na re-inoculação (B), os cinco consórcios aumentaram o acúmulo da clorofila *a* clorofila *b* e carotenóides. Enquanto a quantificação TPC revelou que, durante a biotização (A), os tratamentos Ab-V5+0401, Ab-V6+0401, CCMA0401 e Ab-V5+ BR935 apresentaram maiores concentrações de fenóis, também se observou que na re-inoculação (B), destacou-se novamente o consórcio Ab-V5+0401, seguido de BR935+0401, Ab-V6+0401, Ab-V6+BR935 e Ab-V5+BR935. O acúmulo de flavonóides, TFC, também foi superior em cinco tratamentos durante a biotização (A): Ab-V6+0401, Ab-V5+BR935, Ab-V6+BR935, Ab-V5, CCMA 0401

e Ab-V5+0401, e por último, durante a re-inoculação (B), todos os consórcios mostraram maior acúmulo, destacando-se o tratamento Ab-V5+0401.

Os resultados sugerem que a biotização e na re-inoculação da cultivar OG com *A. brasilense* Ab-V5 e *B. subtilis* CCMA 0401 bem como a re-inoculação destas mesmas cepas influenciaram principalmente nas características relacionadas ao crescimento vegetativo, já a combinação em consórcios bacterianos estimularam em maior medida a produção de fenóis e flavonóides, assim dependendo do interesse agrícola, o uso destas BPCV poderia ser eficaz como bioinoculantes, ou bioestimulantes do metabolismo de fenóis e flavonóides. Assim, a formação de multi-estirpes bacterianas poderia representar uma estratégia útil para aumentar a eficiência destes compostos (Chamam *et al.*, 2013; Miotto-Vilanova *et al.*, 2019), e a seleção de consórcios é fundamental, uma vez que o contato físico, a sinalização química, a troca metabólica são interações relevantes entre as cepas, desta forma, a formação de misturas com alta diversidade funcional pode melhorar as probabilidade de sucesso dos inoculantes, evitando seu rápido declínio no solo, que dependerão de quão funcionais, complementares e sinérgicas sejam as associações microbianas (Bargaz *et al.*, 2018; Tabacchioni *et al.*, 2021).

Desta forma, destaca-se o uso destes gêneros bacterianos no cultivo de morangueiro em condições *ex vitro*. Existem relatos prévios sobre a utilização de cepas de *B. subtilis* NA-108, que foi produtor de AIA e exerceu maior influência no crescimento do morangueiro, resultando em um aumento de 43.5% no peso seco da raiz e 77% aumento no peso seco da parte aérea quando comparado com controles não tratados (De Melo Pereira *et al.*, 2012). Em outro estudo testaram a capacidade biofertilizante de *Azospirillum brasilense* Ab-V5, *Bacillus megaterium* e *Brevibacillus fluminis*, previamente caracterizados como solubilizadores de fósforo, potássio e produtores de AIA. Os resultados mostraram diferentes efeitos da inoculação na melhoria das propriedades fisiológicas e morfoanatômicas de mudas de morangueiro. A inoculação individual e a formação de consórcios nesta pesquisa foram relevantes para compreender as interações entre a planta e os microrganismos nas condições *ex vitro*, assim alguns estudos também relatam que a inoculação, isolada ou em mistura, melhorou a condutância estomática, a transpiração foliar e a concentração interna de CO₂ na combinação de *A. brasilense* Ab-V5+ *B. fluminis*. Além disso, os teores foliares de nitrogênio e magnésio aumentaram com *A. brasilense* Ab-V5+ *B. megaterium*. A inoculação estimulou o crescimento da copa, o alongamento das raízes e a área foliar, permitindo uma redução do 70% na demanda de fertilizantes utilizados no cultivo de morangueiros (Silva *et al.*, 2022). Desta forma, nesta pesquisa também se encontrou uma diminuição do consumo de fertilizantes, uma vez que os tratamentos foram fornecidos com soluções reduzidas.

Assim, o efeito de diferentes frequências de aplicação de *A. brasilense* Ab-V5 também foi estudado em mudas de morangueiro da cultivar Pircinque provenientes de cultivo *in vitro*, que foram aclimatadas, e mantidas em casa de vegetação. Observou-se que a inoculação a cada 15 dias melhorou características fitotécnicas e fisiológicas. Inoculações únicas também promoveram aumentos significativos no comprimento das raízes e na biomassa seca, sugerindo que o uso de *Azospirillum* poderia ajudar na redução da demanda por fertilizantes (De Oliveira *et al.*, 2024). Ademais, o uso de cepas bacterianas, PEPV15 e PEPV16, pertencentes aos gêneros *Phyllobacterium* e *Rhizobium*, respectivamente, foram analisados em condições de microcosmos, demonstrando que essas cepas foram capazes de promover o crescimento do morangueiro e aumentar significativamente o teor de ácido cítrico, vitamina C (ácido ascórbico). Esses estudos destacam o potencial dessas bactérias como uma prática agrônômica eficaz para melhorar o teor de vários compostos bioativos em morangueiros (Flores-Félix *et al.*, 2018). Dessa forma, o uso de BPCV pode ser uma abordagem eficaz para melhorar a nutrição vegetal, o desenvolvimento, bem como ajudar na resistência das plantas a diferentes estresses ambientais (Esitken *et al.*, 2010). Nesta pesquisa destaca-se o potencial das BPCV na biotização de microplantas de morangueiro como uma alternativa eficaz na transição das condições *in vitro* para *ex vitro*. Estudos futuros, serão essenciais para explorar ainda mais a aplicação dessas bactérias no controle biológico, e na tolerância a estresses ambientais, e assim gerar estratégias que possam contribuir para uma agricultura mais sustentável e resiliente.

5 CONCLUSÃO

A caracterização bioquímica das BPCV mostrou perfis metabólicos variados entre as cepas testadas, com destaque para a fixação biológica de nitrogênio (FNB) e a solubilização de fosfatos em 100% das cepas, solubilização de potássio em 90%, cálcio em 40% e zinco em 50%, além da produção de ácidos orgânicos por todas as cepas. O gênero *Bacillus* destacou na produção de enzimas hidrolíticas, sideróforos e HCN. A cepa *A. brasilense* Ab-V5 apresentou FNB, solubilização de fosfato, potássio e zinco, bem como a produção de proteases. *B. subtilis* CCMA 0401 demonstrou FNB e solubilização de fosfato, potássio e zinco, além da produção de enzimas hidrolíticas (amilase, celulase, protease, lipases e quitinases), sideróforos e HCN. *R. leucaneae* BR935 foi capaz de realizar a FNB, solubilizar fosfato, potássio e cálcio, e produzir quitinases e proteases. Nas mudas biotizadas da cultivar OG, Ab-V5 e CCMA 0401 proporcionaram maior acúmulo de biomassa total. Na re-inoculação, os

tratamentos com Ab-V5, CCMA 0401 e os consórcios Ab-V5+BR935, Ab-V5+0401, BR935+0401 mostraram-se eficazes, sendo que os consórcios induziram maior acúmulo de fenóis e flavonoides em ambas as condições avaliadas. Na cultivar CA, a cepa Ab-V5 se destacou no acúmulo da biomassa total em ambas as condições, e o consórcio Ab-V5+0401 mostrou-se eficaz durante a re-inoculação. O acúmulo de fenóis e flavonóides foi aumentado principalmente pelos consórcios, embora alguns tratamentos individuais também tenham sido eficazes. Desta forma, destaca-se o uso das BPCV na biotização de morangueiro como uma alternativa promissora para aumentar a sobrevivência, modular características fisiológicas e bioquímicas, e reduzir a necessidade de fertilizantes e pesticidas químicos.

REFERÊNCIAS

- AABY, K. et al. Phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) fruits: Composition in 27 cultivars and changes during ripening. **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 86-97, 2012.
- ABD EL-RAHMAN, A. F. et al. Influence of hydrogen cyanide-producing rhizobacteria in controlling the crown gall and root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 29, n. 1, p. 41, 26 jun. 2019.
- ABDALLA, N. et al. An Academic and Technical Overview on Plant Micropropagation Challenges. **Horticulturae**, v. 8, n. 8, p. 677, ago. 2022.
- AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M. S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**, v. 163, n. 2, p. 173–181, 2008.
- AHMED, E.; HOLMSTRÖM, S. J. M. Siderophores in environmental research: roles and applications. **Microbial Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 196-208, 2014.
- ALEKSANDROV, V. G. et al. The effect of phosphorus-dissolving bacteria on the phosphorus uptake by plant. **Microbiologiya**, v. 36, p. 952-956, 1967.
- ALEKSANDROV, V. G.; BLAGODYR“, R. N.; IL“EV, I. P. Phosphorus acid isolation from apatite produced by silicate bacteria. **Mikrobiolohichni Zhurnal**, v. 29, n. 2, p. 111–114, 1967.
- ANAND, A. et al. Contribution of Hydrogen Cyanide to the Antagonistic Activity of Pseudomonas Strains Against Phytophthora infestans. **Microorganisms**, v. 8, n. 8, p. 1144, 28 jul. 2020.
- ANDRADE, F. J. et al. The role of HCN-producing bacteria in biological control and plant growth promotion. **Microbial Ecology**, v. 79, n. 4, p. 1238-1248, 2020.

ANTUNES, L. E. C. et al. **Morangueiros: os desafios da produção brasileira**. 2023.

ARAÚJO, R. C. et al. Acclimatization of *Musa* spp. seedlings using endophytic *Bacillus* spp and *Buttiauxella agrestis* strains. **Microbiological Research**, v. 248, p. 1-12, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126750>

ARAÚJO, R. C. et al. Association of growth-promoting bacteria and hydroponic system aiming at reducing the time of production of banana seedlings. **Archives of Agronomy and Soil Science**, 2022. <https://doi.org/10.1080/03650340.2022.2078965>

ARIZA, M. T.; REBOREDO-RODRÍGUEZ, P.; CERVANTES, L.; SORIA, C.; MARTÍNEZ-FERRI, E.; GONZÁLEZ-BARREIRO, C.; CANCHO-GRANDE, B.; BATTINO, M.; SIMAL-GÁNDARA, J. Bioaccessibility and potential bioavailability of phenolic compounds from achenes as a new target for strawberry breeding programs. **Food Chemistry**, v. 257, p. 284-292, 2018. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.11.105.

ARIZA, M. T.; REBOREDO-RODRÍGUEZ, P.; MAZZONI, L.; FORBES-HERNÁNDEZ, T. Y.; GIAMPIERI, F.; AFRIN, S.; GASPARINI, M.; SORIA, C.; MARTÍNEZ-FERRI, E.; BATTINO, M.; MEZZETTI, B. Strawberry achenes are an important source of bioactive compounds for human health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 7, p. 1103, 2016. DOI: 10.3390/ijms17071103.

BAKKER, A. W.; SCHIPPERS, B. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* SPP-mediated plant growth-stimulation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, n. 4, p. 451–457, 1 jan. 1987.

BARGAZ, A. et al. Soil Microbial Resources for Improving Fertilizers Efficiency in an Integrated Plant Nutrient Management System. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 31 jul. 2018.

BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**, v. 39, n. 1, p. 205–207, 1 ago. 1973.

BELLENGER, J. P. et al. Uptake of molybdenum and vanadium by a nitrogen-fixing soil bacterium using siderophores. **Nature Geoscience**, v. 1, n. 4, p. 243–246, abr. 2008.

BERRAQUERO, F. R.; BAYA, A. M.; CORMENZANA, A. R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, v. 17, n. 4, p. 399-406, 1976.

BLANCO, E. et al. **Selección de un consorcio microbiano promotor del crecimiento de plántulas de cebolla en condiciones de umbráculo** [Selection of a growth promoter microbial consortium in onion seedlings under shade-house conditions]. v. 38, p. 301–321, 1 abr. 2021.

BLUMER, C.; HAAS, D. Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. **Archives of Microbiology**, v. 173, n. 3, p. 170-177, 2000.

BOUBEKRI, K. et al. The Screening of Potassium- and Phosphate-Solubilizing *Actinobacteria* and the Assessment of Their Ability to Promote Wheat Growth Parameters. **Microorganisms**, v. 9, n. 3, p. 470, 25 fev. 2021.

BOXUS, P. H. The production of strawberry plants by *in vitro* micro-propagation. **Journal of Horticultural Science**, v. 49, n. 3, p. 209–210, 1 jan. 1974.

BOXUS, P. Micropropagation of Strawberry via Axillary Shoot Proliferation. Em: HALL, R. D. (Ed.). **Plant Cell Culture Protocols**. Methods In Molecular Biology™. Totowa, NJ: Humana Press, 1999. p. 103–114.

BRAUD, A. et al. Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacteria. **Chemosphere**, v. 74, n. 2, p. 280–286, jan. 2009a.

BRAUD, A. et al. New insights into the metal specificity of the *Pseudomonas aeruginosa* pyoverdine-iron uptake pathway. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 1079–1091, maio 2009b.

CARRIM, A. J. I.; BARBOSA, E. C.; VIEIRA, J. D. G. Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 3, p. 353–359, maio 2006.

CASTIGLIONE, A. M. et al. Microbial Biostimulants as Response to Modern Agriculture Needs: Composition, Role and Application of These Innovative Products. **Plants**, v. 10, n. 8, p. 1533, 27 jul. 2021.

CASTRIC, P. A. Hydrogen cyanide, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 613–618, maio 1975.

CHAGAS JUNIOR, A. F. et al. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia1. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 32, n. 2, p. 359–366, 29 abr. 2010.

CHANDRA, A.; CHANDRA, P.; TRIPATHI, P. Whole genome sequence insight of two plant growth-promoting bacteria (*B. subtilis* BS87 and *B. megaterium* BM89) isolated and characterized from sugarcane rhizosphere depicting better crop yield potentiality. **Microbiological Research**, v. 247, p. 126733, jun. 2021.

CHANDRAN, H. et al. Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. **Biotechnology Reports (Amsterdam, Netherlands)**, v. 26, p. e00450, jun. 2020.

CHANG, C. C. et al. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, n. 3, p. 178–182, 2002.

CHAMAM, Amel et al. Plant secondary metabolite profiling evidences strain-dependent effect in the *Azospirillum-Oryza sativa* association. **Phytochemistry**, v. 87, p. 65–77, 2013.

CHEN, Y. P.; REKHA, P. D.; ARUN, A. B.; SHEN, F. T.; LAI, W. A.; YOUNG, C. C. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Applied Soil Ecology**, v. 34, n. 1, p. 33–41, 2006. DOI: 10.1016/j.apsoil.2005.12.002.

CROWLEY, D. E. Microbial siderophores in the plant rhizosphere. In: **Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms**. Springer, Dordrecht, 2006. p. 169-198.

DATTA, B.; CHAKRABARTTY, P. K. Siderophore biosynthesis genes of *Rhizobium* sp. isolated from *Cicer arietinum* L. **3 Biotech**, v. 4, n. 4, p. 391–401, ago. 2014.

DAVIES, P. J. **Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology**. Springer Science & Business Media, 2013.

DE BRUIJN, F. Biological nitrogen fixation. In: LUGTENBERG, B. (Ed.). **Principles of Plant-Microbe Interactions**. Cham: Springer, 2015.

DE MELO PEREIRA, G. V. et al. A multiphasic approach for the identification of endophytic bacterial in strawberry fruit and their potential for plant growth promotion. **Microbial Ecology**, v. 63, n. 2, p. 405–417, fev. 2012.

DE MOURA, G. G. D. et al. The Friend Within: Endophytic Bacteria as a Tool for Sustainability in Strawberry Crops. **Microorganisms**, v. 10, n. 12, p. 2341, dez. 2022.

DE OLIVEIRA, J. et al. Efficient *in vitro* plantlet development and acclimatization of *Cattleya elongata* Barb. Rodr., a Brazilian endemic and neglected species. **South African Journal of Botany**, v. 141, p. 77–82, 1 set. 2021.

DEBNATH, S. C.; TEIXEIRA DA SILVA, J. A. Strawberry culture *in vitro*: applications in genetic transformation and biotechnology. Fruit, **Vegetable and Cereal Science and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 1-12, 2007.

DESIRE, M. H. et al. Enzymes and qualitative phytochemical screening of endophytic fungi isolated from *Lantana camara* Linn. Leaves. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, v. 2, n. 6, p. 001–006, 27 dez. 2014.

DI RIENZO, J. A., CASANOVES, F., BALZARINI, M. G., GONZALEZ, L., TABLADA, M., & ROBLEDO, C. W. (2020). **InfoStat versión 2018**. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.

DÖBEREINER, J. et al. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: **EMBRAPA-SPI**, 1995.

DOGAN, G.; TASKIN, B. Hydrolytic Enzymes Producing Bacterial Endophytes of Some *Poaceae* Plants. **Polish Journal of Microbiology**, v. 70, n. 3, p. 297–304, set. 2021.

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

ESITKEN, A. et al. Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. **Scientia Horticulturae**, v. 124, n. 1, p. 62-66, 2010.

FERREIRA, C. M. H.; SOARES, H. M. V. M.; SOARES, E. V. Promising bacterial genera for

agricultural practices: An insight on plant growth-promoting properties and microbial safety aspects. **Science of The Total Environment**, v. 682, p. 779–799, 10 set. 2019.

FERREIRA, M. J. et al. Engineering the Rhizosphere Microbiome with Plant Growth Promoting Bacteria for Modulation of the Plant Metabolome. *Plants*, v. 13, n. 16, p. 2309, 2024.

FERREIRA, D. F. **Sisvar: sistema de análise de variância**. Versão 5.8 [software]. Lavras: UFLA, 2023.

FIERASCU, R. C. et al. Fragaria Genus: Chemical Composition and Biological Activities. **Molecules**, v. 25, n. 3, p. 498, 23 jan. 2020.

FLORES-FÉLIX, J. D. et al. *Rhizobium* and *Phyllobacterium* bacterial inoculants increase bioactive compounds and quality of strawberries cultivated in field conditions. **Food Research International (Ottawa, Ont.)**, v. 111, p. 416–422, set. 2018.

FLURY, P. et al. Insect pathogenicity in plant-beneficial pseudomonads: phylogenetic distribution and comparative genomics. **The ISME journal**, v. 10, n. 10, p. 2527–2542, out. 2016.

FUKAMI, J.; CEREZINI, P.; HUNGRIA, M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 73, 4 maio 2018.

GIAMPIERI, F. et al. Polyphenol-rich strawberry extract protects human dermal fibroblasts against hydrogen peroxide oxidative damage and improves mitochondrial functionality. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 19, n. 6, p. 7798–7816, 11 jun. 2014.

GIANINAZZI, S.; OUBAHA, L.; CHAHBANDAR, M.; BLAL, B.; LEMOINE, M.-C. Biotization of microplants for improved performance. **Acta Horticulturae**, v. 625, p. 165–172, 2003.

GIANINAZZI, S.; SCHUEPP, H.; BRUINSMA, M. **Mycorrhizal Technology in Agriculture: From Genes to Bioproducts**. Basel: Springer, 2003.

GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 30–39, 20 jan. 2014.

GLICK, B. R. et al. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. Em: BAKKER, P. A. H. M. et al. (Eds.). **New Perspectives and Approaches in Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Research**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007a. p. 329–339.

GLICK, B. R. et al. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, n. 3, p. 329–339, 1 nov. 2007b.

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, v. 2012, p. e963401, 11 out. 2012.

- GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 963401, 2012.
- GLICK, B. R.; PENROSE, D. M.; LI, J. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. **Journal of Theoretical Biology**, v. 190, n. 1, p. 63–68, 7 jan. 1998.
- GLICK, Bernard R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 1-15, 2012.
- GOUDA, S. et al. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. **Microbiological Research**, v. 206, p. 131-140, 2018.
- GRAY, R. N. T., Dennis J. (ED.). **Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology**. Boca Raton: CRC Press, 2010.
- GROSSMANN, K. Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. **Pest Management Science**, v. 66, n. 2, p. 113–120, fev. 2010.
- GUERRERO-MOLINA, M. F.; LOVAISA, N. C.; SALAZAR, S. M.; DÍAZ-RICCI, J. C.; PEDRAZA, R. O. Elemental composition of strawberry plants inoculated with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* REC3, assessed with scanning electron microscopy and energy dispersive X-ray analysis. **Plant Biology**, v. 16, n. 5, p. 1014-1024, 2013.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597–607, 1 maio 1975.
- HANKIN, L.; ZUCKER, M.; SANDS, D. C. Improved Solid Medium for the Detection and Enumeration of Pectolytic Bacteria. **Applied Microbiology**, v. 22, n. 2, p. 205–209, ago. 1971.
- HAZARIKA, B. N. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. **Scientia Horticulturae**, v. 108, n. 2, p. 105–120, 10 abr. 2006.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **Circular. California Agricultural Experiment Station**, v. 347, n. 2nd edit, 1950.
- HONMA, M.; SHIMOMURA, T. Metabolism of 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic Acid. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 42, n. 10, p. 1825–1831, 1 out. 1978.
- KAMRAN, S. et al. Contribution of Zinc Solubilizing Bacteria in Growth Promotion and Zinc Content of Wheat. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.
- KANG, G.; LI, G.; GUO, T. Molecular mechanism of salicylic acid-induced abiotic stress tolerance in higher plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, n. 9, p. 2287–2297, 1 set. 2014.

KANG, S.-M. et al. *Bacillus subtilis* JW1 enhances plant growth and nutrient uptake of Chinese cabbage through gibberellins secretion. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v. 92, p. 172–178, 1 jan. 2019.

KANG, S.-M. et al. Gibberellin secreting rhizobacterium, *Pseudomonas putida* H-2-3 modulates the hormonal and stress physiology of soybean to improve the plant growth under saline and drought conditions. **Plant physiology and biochemistry: PPB**, v. 84, p. 115–124, nov. 2014.

KASANA, R. C. et al. A Rapid and Easy Method for the Detection of Microbial Cellulases on Agar Plates Using Gram's Iodine. **Current Microbiology**, v. 57, n. 5, p. 503–507, 1 nov. 2008.

KHAN, A. L. et al. Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. **Journal of Microbiology**, v. 52, n. 8, p. 689–695, 1 ago. 2014.

KHANGHAHI, M. Y. et al. Solubilization of insoluble zinc compounds by zinc solubilizing bacteria (ZSB) and optimization of their growth conditions. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 25, n. 26, p. 25862–25868, set. 2018.

KOÇ, A. et al. Influence of arbuscular mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria on proline, membrane permeability and growth of strawberry (*Fragaria x ananassa*) under salt stress. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v. 89, p. 112–116, 2016. DOI: 10.5073/JABFQ.2016.089.011.

KUMAR MEENA, R. et al. Isolation of low temperature surviving plant growth – promoting rhizobacteria (PGPR) from pea (*Pisum sativum* L.) and documentation of their plant growth promoting traits. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 806–811, 1 out. 2015.

KUSS, A. V. et al. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético *in vitro* por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 10, p. 1459–1465, out. 2007.

LANG, A. Induction of flower formation in biennial hyoscyamus by treatment with gibberellin. **Naturwissenschaften**, v. 43, n. 12, p. 284–285, 1 jan. 1956.

LELAPALLI, S. et al. Characterization of phosphate solubilizing plant growth promoting rhizobacterium *Lysinibacillus pakistanensis* strain PCPSMR15 isolated from *Oryza sativa*. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 2, p. 100080, dez. 2021.

LIANG, Y.-L. et al. Isolation, Screening, and Identification of Cellulolytic Bacteria from Natural Reserves in the Subtropical Region of China and Optimization of Cellulase Production by *Paenibacillus terrae* ME27-1. **BioMed Research International**, v. 2014, p. e512497, 19 jun. 2014.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 350–382, 1987.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: Measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. In: **Current protocols in food analytical chemistry**. Nova York: John Wiley & Sons, 2001. p. F4.3.1–F4.3.8.

LOUDEN, B. C.; HAARMANN, D.; LYNNE, A. M. Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection. **Journal of Microbiology & Biology Education: JMBE**, v. 12, n. 1, p. 51–53, 19 maio 2011.

MAHDI, I. et al. *Bacillus velezensis* QA2 Potentially Induced Salt Stress Tolerance and Enhanced Phosphate Uptake in Quinoa Plants. **Microorganisms**, v. 10, n. 9, p. 1836, set. 2022.

MAMARASULOV, B. et al. Characterization, enzymatic and biochemical properties of endophytic bacterial strains of the medicinal plant *Ajuga turkestanica* (Rgl.) Brig (Lamiaceae). **Journal of King Saud University - Science**, v. 34, n. 6, p. 102183, 1 ago. 2022.

MARSCHNER, P.; CROWLEY, D.; RENGEL, Z. Rhizosphere interactions between microorganisms and plants govern iron and phosphorus acquisition along the root axis - model and research methods. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, p. 883–894, 2011.

MEENA, V. S. et al. (Eds.). **Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture**. New Delhi: Springer India, 2016. p. 1–20.

MEMARI-TABRIZI, E. F.; YOUSEFPOUR-DOKHANIEH, A.; BABASHPOUR-ASI, M. Foliar-applied silicon nanoparticles mitigate cadmium stress through physio-chemical changes to improve growth, antioxidant capacity, and essential oil profile of summer savory (*Satureja hortensis* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 165, p. 71-79, 2021.

MICHELSEN, C. F.; STOUGAARD, P. Hydrogen cyanide synthesis and antifungal activity of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* In5 from Greenland is highly dependent on growth medium. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 58, n. 4, p. 381–390, abr. 2012.

MIOTTO-VILANOVA, Lidiane; COURTEAUX, Barbara; PADILLA, Rosa; RABENOELINA, Fanja; JACQUARD, Cédric; CLÉMENT, Christophe; COMTE, Gilles; LAVIRE, Céline; AIT BARKA, Essaid; KERZAON, Isabelle; et al. Impacto de *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN no metabolismo fenólico da videira. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 22, p. 5775, 2019.

MOLINA, C.Y et al. **Impacto de isolados bacterianos e consórcios no crescimento e a resposta da batata (*solanum Tuberosum* L.) Ao estresse térmico *in vitro* e *in Vivo***. Tese (doutorado). Universidade Federal de Lavras, 2024.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, n. 1, p. 265–270, jan. 1999.

NAUTIYAL, C. S. et al. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. **FEMS microbiology letters**, v. 182, n. 2, p. 291–296, 15 jan. 2000.

NOWAK, J. Benefits of *in vitro* "biotization" of plant tissue cultures with microbial inoculants. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, v. 34, n. 2, p. 122-130, 1998.

NTABO, R. M. et al. Enzymatic Activity of Endophytic Bacterial Isolates from Selected Mangrove Plants in Kenya. **The Open Microbiology Journal**, v. 12, n. 1, p. 354–363, 14 nov. 2018.

ORLIKOWSKA, T.; NOWAK, K.; REED, B. Bacteria in the plant tissue culture environment. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 128, p. 487–508, 2017.

OROZCO-MOSQUEDA, M. C. et al. Plant Growth-Promoting Bacteria as Bioinoculants: Attributes and Challenges for Sustainable Crop Improvement. **Agronomy**, v. 11, p. 1167, 2021. DOI: 10.3390/AGRONOMY11061167.

PAHARI, A. et al. Bacterial Siderophore as a Plant Growth Promoter. Em: PATRA, J. K.; VISHNUPRASAD, C. N.; DAS, G. (Eds.). **Microbial Biotechnology: Volume 1. Applications in Agriculture and Environment**. Singapore: Springer, 2017. p. 163–180.

PATEL, A. K. et al. Production, purification and chemical characterization of the catechol siderophore from potent probiotic strains of *Bacillus* spp. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 368–373, jan. 2009.

PEDRAZA, R. O. et al. Chapter 6 - Azospirillum. Em: AMARESAN, N. et al. (Eds.). **Beneficial Microbes in Agro-Ecology**. [s.l.] Academic Press, 2020. p. 73–105.

RAAIJMAKERS, Jos M. et al. Microbial interactions in the rhizosphere and their significance for plant health. **Annual Review of Phytopathology**, v. 40, p. 309-348, 2002.

RADLEY, M. Occurrence of Substances Similar to Gibberellic Acid in Higher Plants. **Nature**, v. 178, n. 4541, p. 1070–1071, nov. 1956.

RAJAWAT, M. V. S. et al. Potassium-solubilizing bacteria (KSB): Isolation, identification, and K-release dynamics from waste mica. **Ecological Engineering**, v. 97, p. 478-484, 2016.

RAJKUMAR, M. et al. Potential of siderophore-producing bacteria for improving heavy metal phytoextraction. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 142-149, 2010.

RAMETTE, A. et al. *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHA0 produces multiple antibiotics involved in the suppression of root diseases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3216-3223, 2003.

RANA, S. Bioprospecting potential of endophytic bacteria isolated from indigenous plants of ambala. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, 1 jun. 2014.

RATHER, G. A. et al. Chapter 17 - Tissue culture: A perpetual source for the conservation of medicinally important endangered plant species. Em: CHANDRA RAI, A. et al. (Eds.). **Advances in Plant Tissue Culture**. Academic Press, 2022b. p. 373–393.

READ, P.; PREECE, J. Cloning: Plants - Micropropagation/Tissue Culture. Em: **Encyclopedia of Agriculture and Food Systems**. p. 317–336. 2014.

REDDY, E. C. et al. Hydrolytic Enzyme Producing Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) in Plant Growth Promotion and Biocontrol. Em: SAYYED, R. Z.; UARROTA, V. G. (Eds.). **Secondary Metabolites and Volatiles of PGPR in Plant-Growth Promotion**. Cham: Springer International Publishing, 2022. p. 303–312.

REES, D. C.; AKIF TEZCAN, F.; HAYNES, C. A.; WALTON, M. Y.; ANDRADE, S.; EINSLE, O.; HOWARD, J. B. Structural basis of biological nitrogen fixation. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 363, n. 1829, p. 971-984; discussion 1035-1040, 2005. DOI: 10.1098/rsta.2004.1539.

REETHA, A. K.; PAVANI, S. L.; MOHAN, S. **Hydrogen Cyanide Production Ability by bacterial antagonist and their Antibiotics Inhibition Potential on *Macrophomina phaseolina* (Tassi.) Goid.** 2014.

RIJAVEC, T.; LAPANJE, A. Hydrogen cyanide in the rhizosphere: not suppressing plant pathogens, but rather regulating availability of phosphate. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1785, 2016.

ROBERTS, W. K.; SELITRENNIKOFF, C. P. Plant and Bacterial Chitinases Differ in Antifungal Activity. **Microbiology**, v. 134, n. 1, p. 169–176, 1988.

ROGERS, J. R.; BENNETT, P. C. Mineral stimulation of subsurface microorganisms: release of limiting nutrients from silicates. **Chemical Geology**, v. 203, n. 1, p. 91–108, 15 jan. 2004.

SAAD, A. I. M. et al. Plant Tissue Culture Media. Em: **Recent Advances in Plant *in vitro* Culture**. [s.l.] IntechOpen, 2012.

SAEEDI, S. A. et al. Growth, photosynthetic function, and stomatal characteristics of Persian walnut explants *in vitro* under different light spectra. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, 17 nov. 2023.

SÁNCHEZ, Ó. J.; OSPINA, D. A.; MONTOYA, S. Compost supplementation with nutrients and microorganisms in composting process. **Waste Management**, v. 69, p. 136–153, nov. 2017.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v. 160, n. 1, p. 47–56, jan. 1987.

SEHRAWAT, A.; SINDHU, S. S.; GLICK, B. R. Hydrogen cyanide production by soil bacteria: Biological control of pests and promotion of plant growth in sustainable agriculture. **Pedosphere**, v. 32, n. 1, p. 15–38, 1 fev. 2022.

SHARMA, Ashwani et al. Hydrolytic enzyme production is a well-known feature of plant growth-promoting rhizobacteria of *Bacillus* species. **International Journal of Chemical Studies**, v. 1, n. 3, p. 1-4, 2013.

SHARMA, S. B. et al. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 587, 2013.

SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 23, n. 1, p. 15–22, 1 dez. 1957.

SILVA, L. I. DA et al. Fertilizer of the Future: Beneficial Bacteria Promote Strawberry Growth and Yield and May Reduce the Need for Chemical Fertilizer. **Agronomy**, v. 12, n. 10, p. 2465, out. 2022.

SIMIRGIOTIS, M. J. et al. Cytotoxic chalcones and antioxidants from the fruits of *Syzygium samarangense* (Wax Jambu). **Food Chemistry**, v. 107, n. 2, p. 813–819, mar. 2008.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SOUMARE, A. et al. Potential Role and Utilization of Plant Growth Promoting Microbes in Plant Tissue Culture. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 649878, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.649878>.

SOUMARE, A.; SARR, D.; DIÉDHIU, A. G. Potassium sources, microorganisms and plant nutrition: Challenges and future research directions. **Pedosphere**, v. 33, n. 1, p. 105–115, 1 fev. 2023.

SOUZA, R. D. et al. Bacterial siderophore production and its potential applications: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 21-29, 2019.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin and Plant-Microbe Interactions. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 4, p. a001438, 4 jan. 2011.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS microbiology reviews**, v. 31, n. 4, p. 425–448, jul. 2007.

SUPANJANI, S. et al. Nod factor enhances calcium uptake by soybean. **Plant physiology and biochemistry: PPB**, v. 44, n. 11–12, p. 866–872, 2006.

SYLVIA, D. M.; JARSTFER, A. G. Sheared-Root Inocula of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 229–232, jan. 1992.

SYLVIA, D. M.; JARSTFER, A. G. Sheath blight disease suppression with soil-borne actinomycetes and their effects on the growth of rice. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 24, p. 149-156, 1992.

TABACCHIONI, S. et al. Identification of Beneficial Microbial Consortia and Bioactive Compounds with Potential as Plant Biostimulants for a Sustainable Agriculture. **Microorganisms**, v. 9, n. 2, p. 426, 19 fev. 2021.

TEJERA-HERNÁNDEZ, B.; HEYDRICH-PÉREZ, M.; ROJAS-BADÍA, M. M. Aislamiento de *Bacillus* solubilizadores de fosfatos asociados al cultivo del arroz. **Agronomía Mesoamericana**, v. 24, n. 2, p. 357–364, dez. 2013.

TIMOFEVA, A. M.; GALYAMOVA, M. R.; SEDYKH, S. E. Bacterial siderophores: classification, biosynthesis, perspectives of use in agriculture. **Plants (Basel)**, v. 11, n. 22, p. 3065, 2022. DOI: 10.3390/plants11223065.

TORTORA, M. L.; DÍAZ-RICCI, J. C.; PEDRAZA, R. O. Azospirillum brasilense siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. **Archives of Microbiology**, v. 193, n. 4, p. 275–286, abr. 2011.

VEJAN, P. et al. **Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability. A Review. Molecules**, v. 21, p. 573, 2016. DOI: 10.3390/molecules21050573.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. **Amino Acids**, v. 35, n. 4, p. 753-759, 2008. DOI: 10.1007/s00726-008-0061-6.

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

VINCENT, J. M. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. Oxford: **Blackwell Scientific**, 1970. (IBP Handbook, 15).

WANG, M.-R. et al. *In Vitro* Micrografting of Horticultural Plants: Method Development and the Use for Micropropagation. **Horticulturae**, v. 8, n. 7, p. 576, jul. 2022.

WAŻNY, R.; JĘDRZEJCZYK, R. J.; ROZPADEK, P.; et al. Bacteria associated with spores of arbuscular mycorrhizal fungi improve the effectiveness of fungal inocula for red raspberry biotization. **Microbial Ecology**, v. 87, p. 50, 2024.

WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Calcium in Plants. **Annals of Botany**, v. 92, n. 4, p. 487–511, 1 out. 2003.

YAGHOUBI KHANGHAHI, M. et al. Isolation of Bacteria with Potential Plant-Promoting Traits and Optimization of Their Growth Conditions. **Current Microbiology**, v. 78, n. 2, p. 464–478, fev. 2021.

YU, X. et al. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. **European Journal of Soil Biology**, v. 47, n. 2, p. 138–145, mar. 2011.

ARTIGO 3 - Estudo da comunidade microbiana endofítica em plantas *in vitro* de morangueiro da cultivar San Andreas e sua resposta à biotização e adaptação às condições *ex vitro*

Ana Milena Gómez Sepúlveda¹, Ederson da Conceição Jesus², Yulimar Castro Molina¹, Luna Queiroz Carvalho³, Moacir Pasqual³, Joyce Dória Rodrigues³.

¹ Departamento de Biologia, Programa Microbiologia agrícola, Lavras DBI, Brasil, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, Caixa Postal 37200-900, Brasil.

² Embrapa Agrobiologia, Rodovia BR-465, Km 7, Seropédica 23897-970, RJ, Brasil

³ Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, Lavras, MG 37200-900, Brasil.+

E-mails: milena.biotec@outlook.com, ederson.jesus@embrapa.br, yulimarcastromolina@gmail.com
luna.carvalho@estudante.ufla.br, mpasqual@ufla.br, joyce.doria@ufla.br.

RESUMO

O morangueiro está entre as frutas mais apreciadas mundialmente devido às suas propriedades nutricionais, nutracêuticas e organolépticas, além de seu alto teor de compostos bioativos benéficos à saúde. Embora a micropropagação *in vitro* do morangueiro já tenha sido amplamente estudada, o conhecimento sobre seu microbioma endofítico ao longo das gerações de subcultivos *in vitro* ainda é limitado. Além disso, a biotização de microplantas com bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCVs) é especialmente relevante, pois pode auxiliar tanto no desenvolvimento *in vitro* quanto na adaptação às condições *ex vitro*. Este estudo utilizou a metataxonômica para caracterizar o microbioma endofítico de microplantas de morangueiro da cultivar San Andreas em condições *in vitro* ao longo de gerações subcultivadas, e avaliou o uso de BPCVs na biotização dessas plantas. Os resultados revelaram uma mudança na composição do microbioma endofítico ao longo das gerações, com predomínio do filo Actinobacteriota no ambiente *in vitro*, enquanto a planta matriz (PM) apresentou maior diversidade e riqueza microbiana, predominando os filos Firmicutes, Actinobacteriota e Proteobacteria. A biotização *in vitro* permitiu a seleção das cepas *Azospirillum brasilense* (Ab-V5, Ab-V6), *Bacillus subtilis* CCMA 0401 e *Rhizobium leucaneae* BR935 para a formação de consórcios (Ab-V5 + BR935, Ab-V5 + 0401, BR935 + 0401, Ab-V6 + BR935 e Ab-V6 + 0401), que foram posteriormente testados em condições *ex vitro*. A cepa Ab-V5 e seus consórcios demonstraram efeitos positivos na biotização, promovendo maior acúmulo de biomassa nas plantas re-inoculadas. Além disso, alguns tratamentos com BPCVs influenciaram a produção de metabólitos secundários, como fenóis e flavonoides. Esses resultados destacam a importância das interações planta-microrganismo e o potencial da biotização com BPCVs como estratégia para melhorar a adaptação das microplantas às condições ambientais, promovendo o crescimento sustentável.

Palavras-chave: Metataxonômica; Cultura de tecidos vegetais; *Fragaria Ananassa* Duch; BPCV; Interação Planta-microrganismo; Aclimatização.

ABSTRACT

Strawberries are among the most globally appreciated fruits due to their nutritional, nutraceutical, and organoleptic properties, as well as their high content of bioactive compounds beneficial to health. While the *in vitro* micropropagation of strawberries has been extensively studied, knowledge about their endophytic microbiome throughout successive *in vitro* subcultures remains limited. Additionally, the biotization of microplants with plant growth-promoting bacteria (PGPB) is particularly relevant, as it can support both *in vitro* development and adaptation to *ex vitro* conditions. This study utilized metataxonomics to characterize the endophytic microbiome of *in vitro* microplants of the San Andreas strawberry cultivar across successive subcultures, and also evaluated the use of PGPB for their biotization. Results revealed a shift in the composition of the endophytic microbiome over generations, with a dominance of the phylum *Actinobacteriota* under *in vitro* conditions, while the mother plant (MP) exhibited greater microbial diversity and richness, predominantly from the phyla *Firmicutes*, *Actinobacteriota*, and *Proteobacteria*. *in vitro* biotization enabled the selection of the bacterial strains *Azospirillum brasilense* (Ab-V5, Ab-V6), *Bacillus subtilis* CCMA 0401, and *Rhizobium leucaneae* BR935 to form consortia (Ab-V5 + BR935, Ab-V5 + 0401, BR935 + 0401, Ab-V6 + BR935, and Ab-V6 + 0401), which were subsequently tested under *ex vitro* conditions. The strain Ab-V5 and its consortia demonstrated positive effects on biotization, leading to increased biomass accumulation in re-inoculated plants. Additionally, some PGPB treatments influenced the production of secondary metabolites, such as phenols and flavonoids. These findings underscore the importance of plant-microbe interactions and highlight the potential of PGPB biotization as a strategy to improve the environmental adaptation of microplants while promoting sustainable growth.

Keywords: Metataxonomic; Plant tissue culture; *Fragaria Ananassa* Duch; PGPBs; Plant-microorganism interaction; Acclimatization.

1 INTRODUÇÃO

O morangueiro (*Fragaria × ananassa* Duch.) é uma cultura de grande importância econômica, amplamente cultivada por suas propriedades nutritivas e por ser uma fonte rica em compostos bioativos, como vitamina C, fenóis, flavonoides, antocianinas, taninos, entre outros, que conferem benefícios à saúde humana (Mezzetti *et al.*, 2018; Fierascu, 2020). Dentre as alternativas para produção de mudas de alta qualidade, destaca-se a micropropagação *in vitro*, que permite a obtenção de plântulas geneticamente uniformes em larga escala, sob condições controladas no laboratório (Read; Preece, 2014; Abdalla *et al.*, 2022; Soumare *et al.*, 2021).

O sucesso do cultivo *in vitro* depende de diversos fatores, como o tipo de explante, o meio de cultivo, as fontes e concentrações de açúcares, reguladores de crescimento, entre outros. Estes fatores influenciam diretamente o desenvolvimento vegetal, refletindo-se no tamanho das folhas, altura das microplantas, desenvolvimento radicular, formação de calos ou

brotos, e na taxa de multiplicação (Grattapaglia; Machado, 1998; Murashige; Skoog, 1962; Golle *et al.*, 2012). Além disso, aspectos como a oxidação e a contaminação podem impactar negativamente o cultivo *in vitro*. Qualquer alteração nesses parâmetros pode levar a mudanças no desenvolvimento das plantas e afetar o sucesso da aclimatização (Esposito, 2021). Durante o estabelecimento do cultivo *in vitro*, os explantes passam por uma assepsia prévia para eliminar microrganismos dos tecidos epifíticos, não entanto, alguns microrganismos endofíticos latentes, que habitam naturalmente os tecidos internos das plantas, podem sobreviver aos processos de assepsia aplicados na micropropagação (Orlikowska, Nowak, Reed, 2017; Quambusch; Winkelmann, 2018). Os endófitos são microrganismos simbióticos que colonizam o interior dos tecidos vegetais sem causar doenças às plantas. Além disso, eles podem competir com fitopatógenos pelos mesmos nichos, podendo contribuir para a proteção da planta e para o aumento de sua resiliência em condições adversas (Hardoim *et al.*, 2015; Araujo *et al.*, 2020).

Entre os efeitos benéficos dos microrganismos endófitos no cultivo *in vitro*, destaca-se a estimulação de crescimento vegetal (Fouda *et al.*, 2021), a produção de fitohormônios (Umamaheswari *et al.*, 2013), além de poderem ser utilizados como elicitores das biossínteses de metabólitos em plantas (Luti; Mavituna., 2011; Song *et al.*, 2017). Esses efeitos, no entanto, dependem de variáveis como o genótipo da planta, o tipo de cultura *in vitro* e o tipo de microrganismo envolvido (Fouda, 2019; 2021). Assim, alguns estudos enfatizam a importância dos microrganismos endofíticos no auxílio no desenvolvimento de plantas micropropagadas, favorecendo o equilíbrio osmótico, a absorção de nutrientes, a proteção contra patógenos, além de facilitar a aclimatização e melhorar a produção de biomassa (Dias *et al.*, 2009). Compreender a diversidade microbiana associada a explantes em culturas de tecidos vegetais é essencial, assim, já se tem alguns relatos da diversidade microbiana endofítica em espécies como *Pogonatherum paniceum* (Lam.) (Koskimäki, 2010), *Atriplex* spp. (Lucero *et al.*, 2011), *Prunus avium* (Quambusch *et al.*, 2018) e *Arbutus unedo* L. (Martins *et al.*, 2022).

Por outro lado, o cultivo *in vitro* também permite explorar a biotização com bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), a fim de selecionar as cepas com características benéficas. A biotização consiste na inoculação de explantes de tecido vegetal ou microplantas em condições *in vitro*, com microrganismos benéficos, possibilitando o estudo das respostas metabólicas e o desenvolvimento das plantas (Del Rosario Espinoza-Mellado *et al.*, 2021). Nesta pesquisa, estudou-se inicialmente a comunidade bacteriana endofítica em microplantas de morangueiro da cultivar San Andreas (SA) ao longo de três gerações (G0, G5 e G10), além

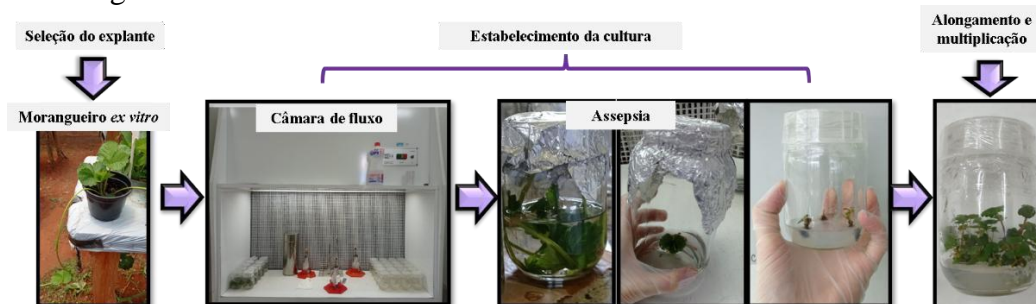
da planta mãe, afim de determinar o comportamento da microbiota ao longo dos subcultivos *in vitro*. Adicionalmente, investigou-se a resposta das microplantas à biotização com BPCV em condições *in vitro* e *ex vitro*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais Laboratório de Bioprodutos e Interações Planta Microrganismo (LCT/LABIMP-UFLA) do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras- MG. Os estolões da cultivar San Andreas (SA), provenientes de plantas-mães saudáveis, foram cedidas pelo Laboratório de Olericultura do Departamento de Agricultura da UFLA. Para o estabelecimento do cultivo *in vitro*, os estolões selecionados foram inicialmente lavados e mantidos em água destilada estéril por 30 minutos sob agitação magnética. Em seguida, passaram por desinfestação com etanol a 80% por 2 minutos, logo, foram submersos em hipoclorito de sódio a 1% por 10 minutos, e posteriormente, enxaguados seis vezes com água destilada estéril. Após esse processo, foram secos com papel toalha estéril e cultivados manipulados em condições assépticas dentro de uma câmara de fluxo laminar. Para o cultivo, os estolões foram transferidos a frascos de 200 mL contendo 50 mL do meio basal MS (Murashige; Skoog, 1962), suplementado com 1 mg/L^{-1} 6-benzilaminopurina (BAP), conforme protocolo adaptado por Boxus (1974, 1999). O pH do meio foi ajustado para 5.7 antes da autoclavagem, realizada a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 psi por 20 min. As culturas foram mantidas por aproximadamente 30 ± 3 dias em sala de crescimento sob condições controladas de iluminação artificial e temperatura. A iluminação foi fornecida por lâmpadas de LED brancas ($6400 \text{ K} - \lambda = 525 \text{ nm}$), com irradiância média de $49.4 \text{ } \mu\text{Mol m}_2\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 h. A temperatura foi mantida em $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ (Araújo *et al.* 2021a, b) (Figura 14).

Figura 14 - Estabelecimento do cultivo *in vitro* da cultivar San Andreas



Estabelecimento da cultura *in vitro* cultivar San Andreas.
Fonte: Da autora (2024).

2.2 Extração de DNA das gerações *in vitro* da cultivar San Andreas (SA)

As plântulas *in vitro* da cultivar (SA) foram submetidas a subcultivos a cada 30 dias ao longo de 10 meses. Material vegetal de microplantas de três gerações, (G0, G5, G10), assim como da planta mãe (PM) foi macerado com nitrogênio líquido para a extração de DNA total, utilizando o DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen), de acordo com as especificações do fabricante. A qualidade e a quantidade do DNA extraído foram avaliadas em gel de agarose 1% e por espectrofotometria no NanoDrop Lite (ThermoFisher Scientific) (260/280 nm). A extração do DNA foi feita em quadruplicada.

2.2.1 Sequenciamento e PCR

O sequenciamento foi realizado pela empresa BPI Biotecnologia EPP, localizada em São Paulo, Brasil. Utilizou-se um par de primers específicos para amplificar a região V5-V6-V7 do gene 16S rRNA, com o objetivo de minimizar a amplificação do DNA de cloroplastos e mitocôndrias, (Figura 15) (Chelius *et al.*, 2001; Beckers *et al.*, 2016; Qiu *et al.*, 2020).

Figura 15 - Sequência dos oligonucleotídeos

Iniciador	Sequencia 5'-3'
16s_799F_NGS	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAACMGGATTAGATACCCCKG
16s_1193R_NGS	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACGTCATCCCCACCTTCC

Sequência dos oligonucleotídeos 16S utilizados na amplificação dos DNA com o adaptador de Illumina.

Fonte: BPI (2024).

O programa de amplificação consistiu em uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos (min), seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 seg (segundos), anelamento a 55°C por 1 min; extensão a 72°C por 1 min; e uma extensão final a 72°C por 10 min. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems). Após reação de amplificação, cada amostra foi confirmada por

eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com UniSafe Dye 0.03% (v/v). Os produtos de amplificação resultaram em duas bandas, com tamanhos de aproximadamente 800 pb e 600 pb. As bandas de 600 pb, correspondentes ao 16S, foram cuidadosamente excisadas do gel e armazenadas a -80°C por uma noite. Posteriormente, o material foi centrifugado em tubos a 10.000 g, e o sobrenadante foi submetido à etapa de purificação com esferas magnéticas *Agencourt AMPure XP* (Beckman Coulter), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante.

2.2.2 Reação de Indexação

Nesta etapa de indexação, os indexadores foram inseridos nos adaptadores comuns, necessários para a geração de clusters e sequenciamento das amostras. A reação de indexação foi realizada de acordo com o protocolo do *kit Nextera XT Index* (Illumina). O programa de amplificação incluiu a incubação à 72°C por 3 minutos, desnaturação inicial à 95°C por 30 segundos, seguido de 12 ciclos de 95°C por 10 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems).

2.2.3 Purificação e Quantificação da Biblioteca NGS

As bibliotecas geradas passaram por uma etapa de purificação com esferas magnéticas *Agencourt AMPure XP* (Beckman Coulter), para remover fragmentos de menor tamanho e resíduos de primers da população total de moléculas. Em seguida, as bibliotecas foram quantificadas por PCR em Tempo Real, utilizando Kit KAPA Library Quantification Kit-Illumina/Universal (Roche), conforme as especificações do fabricante. As amplificações em tempo real foram conduzidas em termociclador QuantStudio3™ (Applied Biosystems). Gerou-se um Pool equimolar de DNA, através da normalização de todas as amostras, para realização do sequenciamento, que foi conduzido no sistema Illumina MiSeq de sequenciamento de nova geração (Illumina® Sequencing), utilizando o kit MiSeq V2 Nano 500 ciclos (leitura de 2 x 250 pb) com 25% de PhiX Sequencing Control V3 (Illumina).

2.2.4 Análise de bioinformática

As sequências foram analisadas usando o pipeline DADA2 (versão 1.8) no software R (Callahan *et al.*, 2016), aonde foram demultiplexadas e filtradas. As sequências de baixa qualidade e com quimeras foram removidas (<2%). Também se observou que apresentaram um escore $\geq Q30$, as sequências forward foram truncadas em 240 pb e as reversas em 160 pb. Após a filtragem, uma meia 11122 sequências de alta qualidade foram obtidas. A afiliação taxonômica foi realizada utilizando o banco de dados SILVA v.138 (Quast *et al.*, 2013). Para análise posterior, utilizou-se o pacote phyloseq (Mcmurdie; Holmes, 2013).

2.2.5 Análises de dados

Para análise de dados, verificou-se a normalidade e a homogeneidade dos dados. A estrutura da comunidade microbiana foi avaliada por meio da Detrended Correspondence Analysis (DCA). A escala multidimensional não métrica (NMDS) foi empregada para visualizar dissimilaridades na estrutura da comunidade bacteriana com base na distância de Bray-Curtis sobre a abundância de ASVs. A análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) foi realizada para identificar diferenças significativas na estrutura das comunidades bacterianas (Anderson, 2001). Além disso, foram realizadas análises de componentes principais (PCA) utilizando matrizes de covariância. As análises estatísticas foram conduzidas no software R com o pacote phyloseq (Mcmurdie; Holmes, 2013). Finalmente, o índice de riqueza (Chao1) e índice de diversidade (Shannon) foram calculados com base na matriz taxonômica no nível OTU, e a tabela de OTU ao nível de filo e gênero foi usada para comparar a composição da comunidade entre os tratamentos (Chao *et al.*, 2014).

2.3 Biotização de microplantas da cultivar San Andreas

Inicialmente foram utilizadas 10 cepas bacterianas para a biotização individual da cultivar SA, as quais foram cedidas pela Coleção de Cultura da Microbiologia Agrícola (CCMA/UFLA) do Laboratório de Microbiologia das Fermentações no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e pelo Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner da Embrapa Agrobiologia do Brasil (CCBD) (Tabela 18).

Tabela 18 - Tratamentos utilizados na biotização individual e em consórcios

Código	Cepas bacterianas
Ab-V5 (CCMA1291)	<i>Azospirillum brasilense</i>
Ab-V6 (CNPSo 2084)	<i>Azospirillum brasilense</i>
CIAT 899	<i>Rhizobium tropici</i>
BR935	<i>Rhizobium leucaneae</i>
BR921	<i>Sinorhizobium fredii</i>
CCMA0122	<i>Sinorhizobium fredii</i>
CCMA 0088	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
CCMA0401	<i>Bacillus subtilis</i>
CCMA0004	<i>Bacillus megaterium</i>
CCMA0112	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
Ab-V5 + BR935	<i>A. brasilense</i> + <i>R. leucaneae</i>
Ab-V5 + 0401	<i>A. brasilense</i> + <i>B. subtilis</i>
BR935 + 0401	<i>R. leucaneae</i> + <i>B. subtilis</i>
Ab-V6 + BR935	<i>A. brasilense</i> + <i>R. leucaneae</i>
Ab-V6 + 0401	<i>A. brasilense</i> + <i>B. subtilis</i>
Controle	Sem bactéria, (H ₂ O destilada estéril)

Cepas bacterianas individuais e em consórcios utilizadas nos testes de biotização da cultivar San Andreas. As duas cepas de *Azospirillum brasilense* foram nomeadas a partir daqui como: Ab-V5 e Ab-V6.

Fonte: Da autora (2024).

Para a biotização, foram selecionadas microplantas com comprimento de 2 a 2,5 cm, 6 a 7 folhas e raízes entre 3 a 5mm. Essas microplantas foram transferidas individualmente para frascos de 200 mL contendo 50 mL do meio básico Murashige & Skoog (MS) (Murashige; Skoog, 1962) e foram mantidas por aproximadamente 30±3 dias em uma sala de crescimento, sob iluminação artificial fornecida por lâmpadas de LED brancas (6400 K– $\lambda = 525$ nm), com irradiância média de 49.4 $\mu\text{Mol m}^2 \text{s}^{-1}$, fotoperíodo foi de 16 h diárias e temperatura controlada a 25 ± 2°C (Araújo *et al.* 2021a, b).

Após uma semana de adaptação na sala de crescimento, as microplantas foram biotizadas na capela de fluxo laminar com 50 μL de uma suspensão bacteriana previamente preparada, a uma concentração aproximada de 1.5x10⁸ UFC/mL. A suspensão de cada tratamento foi aplicada na base do caule-raiz de cada microplântula, resultando em uma concentração bacteriana final de aproximadamente 10⁶ células por microplântula. Foi estabelecido um delineamento inteiramente casualizado com dez tratamentos, cada tratamento foi composto por 24 mudas (seis mudas por repetição, com quatro repetições por tratamento).

A biotização individual permitiu a seleção das quatro cepas com melhor desempenho, sendo elas *Azospirillum brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6), *Bacillus subtilis* CCMA0401 e *Rhizobium leucaneae* BR935 as quais foram utilizadas para formação de consórcios formados a partir de suas combinações (Tabela 2). Os consórcios bacterianos foram preparados a partir

de suspensões bacterianas individuais, misturadas na proporção 1:1 e mantidas em agitação a 100 rpm por 20 min, em temperatura ambiente, para garantir a homogeneização (Blanco *et al.*, 2021).

2.4 Transplante e Condições de Casa de Vegetação

Após a biotização com consórcios se estabeleceram os tratamentos para serem levados às condições *ex vitro*, onde se utilizaram as quatro cepas individuais e os cinco consórcios formados (Tabela 18). Foi estabelecido um delineamento inteiramente casualizado com dez tratamentos (quatro cepas e cinco consórcios) e o tratamento controle, sem inoculação), com quatro repetições. Cada tratamento foi composto por 24 mudas (seis mudas por repetição).

Após a avaliação das variáveis fitotécnicas, realizada aos 30 ± 3 dias após a biotização, as mudas foram transplantadas para vasos contendo uma mistura previamente esterilizada de substrato comercial Tropstrato HT Hortaliças e areia na proporção de 6:4. A esterilização foi realizada em autoclave por 1 hora ao longo de três dias consecutivos. As mudas foram transferidas para uma casa de vegetação com temperaturas controladas de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante o dia e $16 \pm 2^\circ\text{C}$ à noite. Para facilitar a adaptação ao novo ambiente, as plantas foram cobertas com plástico de polipropileno perfurado, permanecendo sob essa proteção por 2 horas a cada 24 horas, durante os primeiros 4 dias (96 horas).

As mudas transplantadas foram divididas em dois grupos: o primeiro grupo foi composto por mudas que somente foram biotizadas (A), enquanto o segundo grupo recebeu uma segunda re-inoculação (B). As mudas foram irrigadas a cada dois dias e os tratamentos foram fertilizados semanalmente com 10 mL de uma solução de Hoagland, na metade da potência (Sylvia; Jarstfer, 1992). O grupo controle foi fertilizado com 10 mL de uma solução de Hoagland com adubação completa (Hoagland; Arnon, 1950). A taxa de sobrevivência foi avaliada após 25 dias, e as variáveis fitotécnicas foram mensuradas após 60 dias nas condições *ex vitro*. Ao final do experimento, foram avaliadas as variáveis fitotécnicas, fenóis e flavonoides.

2.5 Extratos hido-metanólicos para a quantificação de fenóis e flavonoides

Os extratos hido-metanólicos foram preparados com uma solução de metanol: água (80:20, v/v), acidificada com HCl a 0.1%. Para cada tratamento, 0.2 g de matéria seca foliar foi misturada com 10 mL da solução de extrato, sendo mantida sob agitação no escuro por 24

h. Após esse período, os extratos foram centrifugados a 855 x g por 15 min (Kasvi K14- 0815^a), e os sobrenadantes foram utilizados para a quantificação do conteúdo fenólico total (TPC) e o conteúdo total de flavonóides (TFC) (Ariza *et al.*, 2016; Ariza *et al.*, 2018).

2.5.1 Quantificação do conteúdo fenólico total (TPC)

A quantificação do TPC foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu (FC), com adaptações (Singleton., 1965). Para isso, 100µL dos extratos hido-metanólicos foram misturados com 500 µL de reagente FC a 10% e incubados por 3 min. Em seguida, foram adicionados 400 µL de CH₃CO₂Na (7 M), e a solução foi incubada à temperatura ambiente e no escuro por 2 horas. A absorbância foi medida a 760 nm em espectrofotômetro (Thermo Scientific™ Multiskan™). A curva padrão foi construída a partir de uma solução estoque de ácido gálico 100 µg/mL, e os resultados foram expressos em mgGAE/g, miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de matéria seca (Ariza *et al.*, 2016; Ariza *et al.*, 2018; Simirgiotis *et al.*, 2008).

2.5.2 Quantificação do conteúdo total de flavonóides (TFC)

Para a quantificação de TFC, foi utilizada a metodologia proposta (Ariza *et al.*, 2016) com modificações. Foram tomados 250 µL dos extratos hido-metanólicos, aos quais foram adicionados com 1.25 mL de água MilliQ e 75 µL de solução de NaNO₂ a 5%, sendo incubados por 6 min. Em seguida, foram adicionados 150 µL de solução de AlCl₃·6H₂O a 10%, e 500 µL de NaOH a 1 M, e o volume final foi ajustado para 2.5 mL com água MilliQ. A leitura da absorbância foi realizada a 420 nm em um espectrofotômetro (Thermo Scientific™ Multiskan™). A curva padrão foi construída a partir de uma solução estoque de quercetina a 100 µg/mL, e os resultados foram expressos em mgQE/g, miligramas de equivalentes de quercetina por grama de matéria seca (Chang *et al.* 2002; Memari-Tabrizi *et al.*, 2021).

2.6 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Em seguida, realizou-se análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, considerando um nível de significância de $p < 0.05$, utilizando os

softwares Infostat (Di Rienzo et al., 2020). Sisvar v 5.8 (Ferreira., 2023). Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão. Os gráficos foram gerados no mesmo software. Para as análises relacionadas ao microbioma endofítico, utilizou-se o pipeline DADA2 (versão 1.8) no ambiente R (Callahan *et al.*, 2016) e o pacote phyloseq (Mcmurdie; Holmes, 2013). As análises estatísticas englobaram escalonamento canônico desprovido de tendência (DCA), escalonamento multidimensional não métrico (NMDS), análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) e análise de componentes principais (PCA).

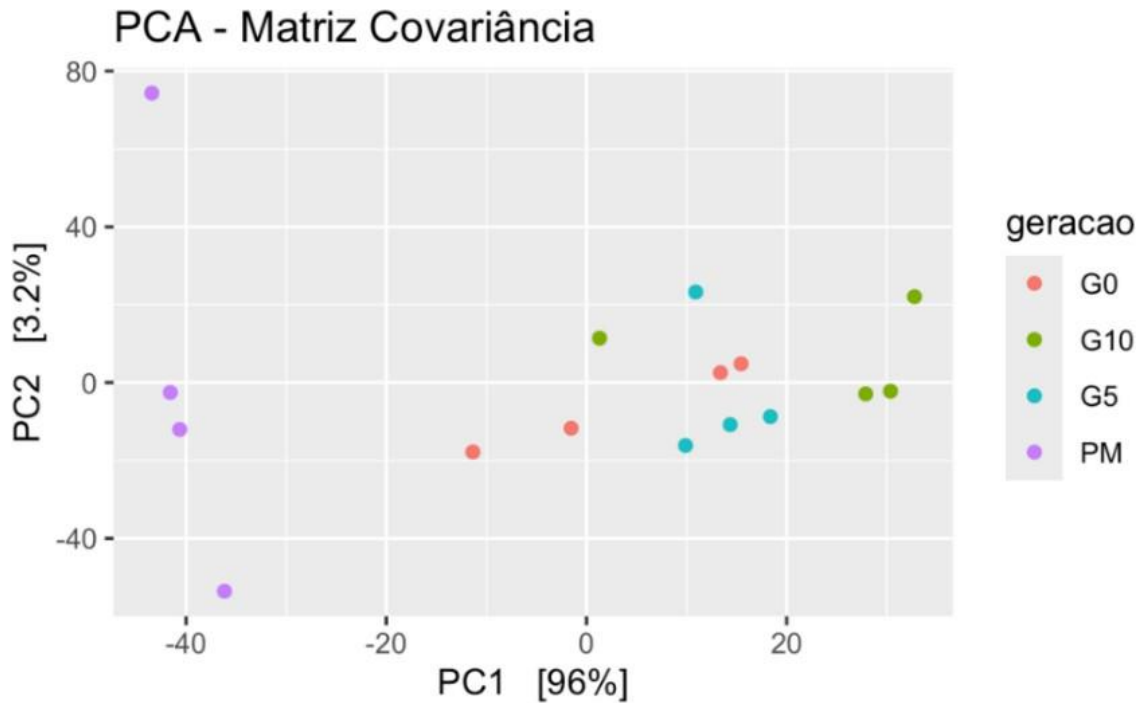
3 RESULTADOS

3.1 Análises da microbiota endofítica de morangueiro em condições *in vitro* e *ex vitro*

A Análise de Componentes Principais (PCA) foi calculada a partir de uma matriz de covariância, permitindo atribuir maior importância às espécies mais abundantes (Figura 16). O PC1 explicou 96% da variância, enquanto o PC2 correspondeu a 3.2%. Foi possível observar uma separação clara entre as amostras da planta mãe (PM) e as gerações G0, G5 e G10. As gerações cultivadas *in vitro* tenderam a valores mais próximos e positivos, sugerindo maior similaridade entre si.

As amostras da PM, localizadas no lado esquerdo do gráfico (valores negativos de PC1), apresentaram maior dispersão e estiveram claramente separadas das gerações cultivadas *in vitro*, indicando uma mudança significativa na composição do microbioma após o cultivo *in vitro* e sugerindo que a planta mãe possui características originais distintas das gerações subsequentes (Figura 16).

Figura 16 - PCA em matriz de covariância



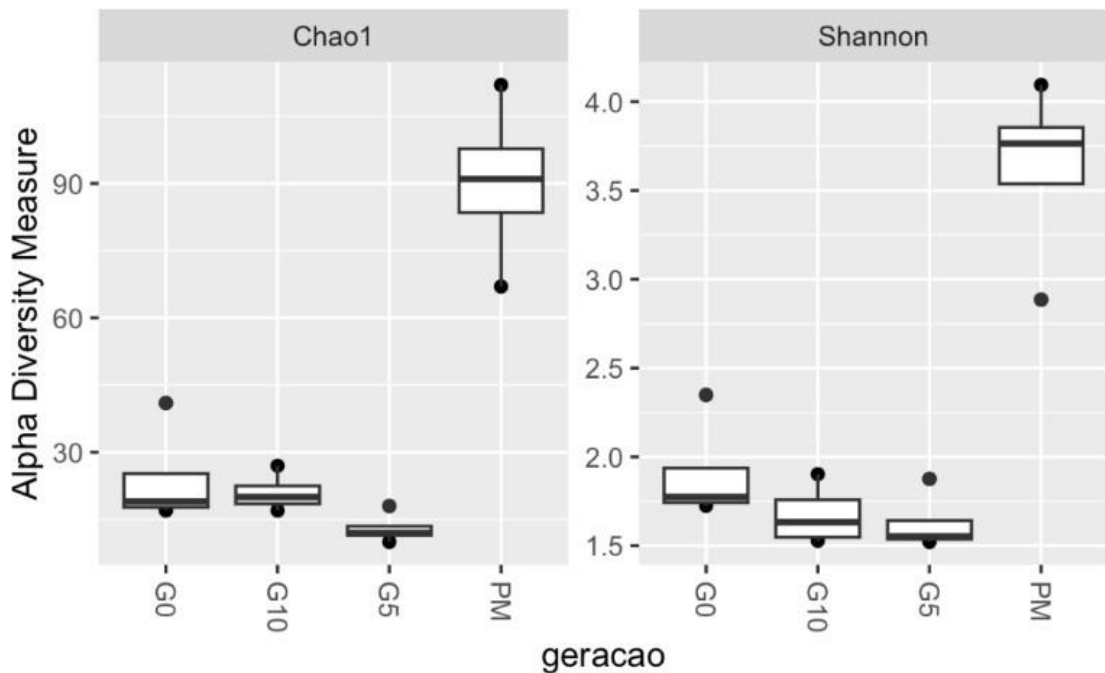
Análise de Componentes Principais (PCA) calculado a partir de uma matriz de covariância atribuindo maior importância às espécies mais abundantes.

Fonte: Da autora (2024).

3.2 Índice de riqueza e índice de diversidade

O índice de riqueza de espécies, (Chao 1) revelou que a PM apresentou os maiores valores e maior variabilidade entre as amostras, indicando maior riqueza de espécies em comparação com as gerações *in vitro*. As gerações G0, G5 e G10, apresentaram valores mais baixos, e similares entre si, sugerindo uma redução no número de espécies após cultivo *in vitro* (Figura 17).

Figura 17 - Índice de riqueza e diversidade



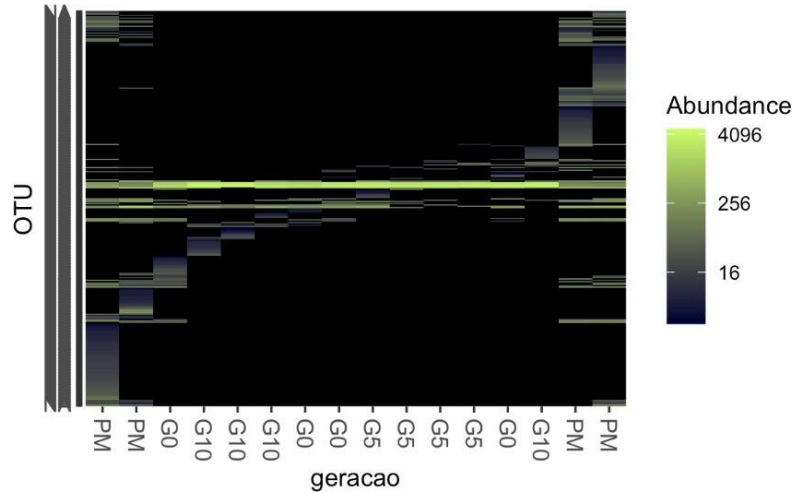
Determinação do índice de riqueza de espécies (Chao 1) e índice de diversidade de Shannon na Planta mãe e nas Gerações *in vitro*: G0, G5 e G10.

Fonte: Da autora (2024).

O índice de diversidade de Shannon, demonstrou que a PM teve um maior valor, indicando uma comunidade microbiana mais complexa, enquanto as gerações G0, G5, G10 apresentaram valores menores e mais próximos entre si, com menor variabilidade entre as amostras sugerindo comunidade menos diversa e mais homogênea (Figura 17). Observou-se, portanto, uma redução tanto na riqueza quanto na diversidade de espécies ao longo das gerações

O mapa de calor permitiu visualizar a abundância relativa das OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais) nas diferentes amostras. A PM apresentou maior número de OTUs diferentes e maior diversidade de padrões de abundância, com algumas OTUs exclusivas ou mais abundantes em suas amostras. As gerações G0, G5 e G10 exibiram padrões mais semelhantes entre si, com algumas OTUs se mantendo constantes ao longo das gerações, enquanto outras apresentaram aumento ou diminuição gradual de abundância. Estas gerações demonstraram um padrão mais homogêneo de distribuição, evidenciando diferenças significativas na composição microbiana entre a planta mãe e as gerações cultivadas *in vitro* (Figura 18).

Figura 18 - Mapa de calor mostrando a abundância de OTUs

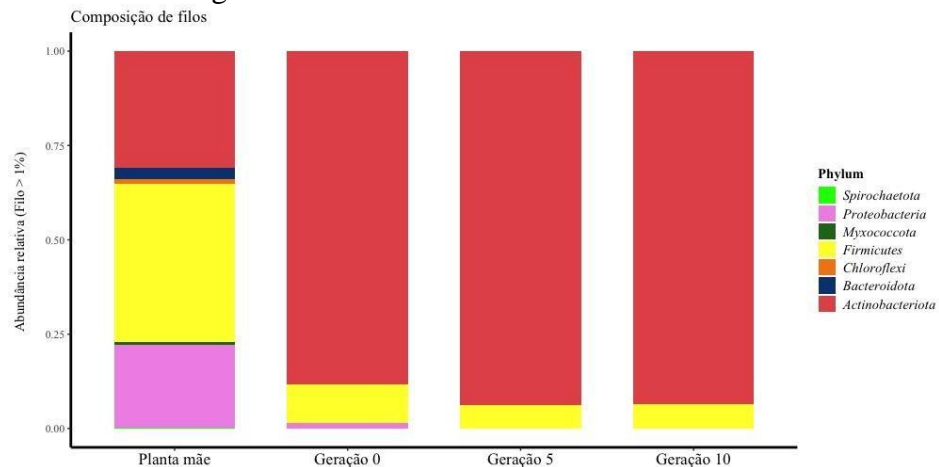


Mapa de calor que permite visualizar as abundâncias relativas das OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais) na Planta mãe e nas Gerações *in vitro*: G0, G5 e G10.

Fonte: Da autora (2024).

A abundância relativa em nível de filo (Figura 19), revelou que a planta mãe (PM) apresentou sete filios em sua composição, sendo Firmicutes, Actinobacteriota e Proteobacteria os mais representativos. Nas gerações cultivadas *in vitro*, observou-se uma redução da diversidade. A geração G0 apresentou três filios, com predominância de Actinobacteriota, seguido de Firmicutes e, em menor quantidade, Proteobacteria. As gerações G5 e G10, mostraram perfis similares, com apenas dois filios presentes: Actinobacteriota, em maior abundância, e Firmicutes, em menor proporção. As condições de cultivo *in vitro* favoreceram principalmente o filo Actinobacteriota, resultando em uma comunidade bacteriana mais simplificada e homogênea ao longo das gerações.

Figura 19 - Abundância relativa nível de filo

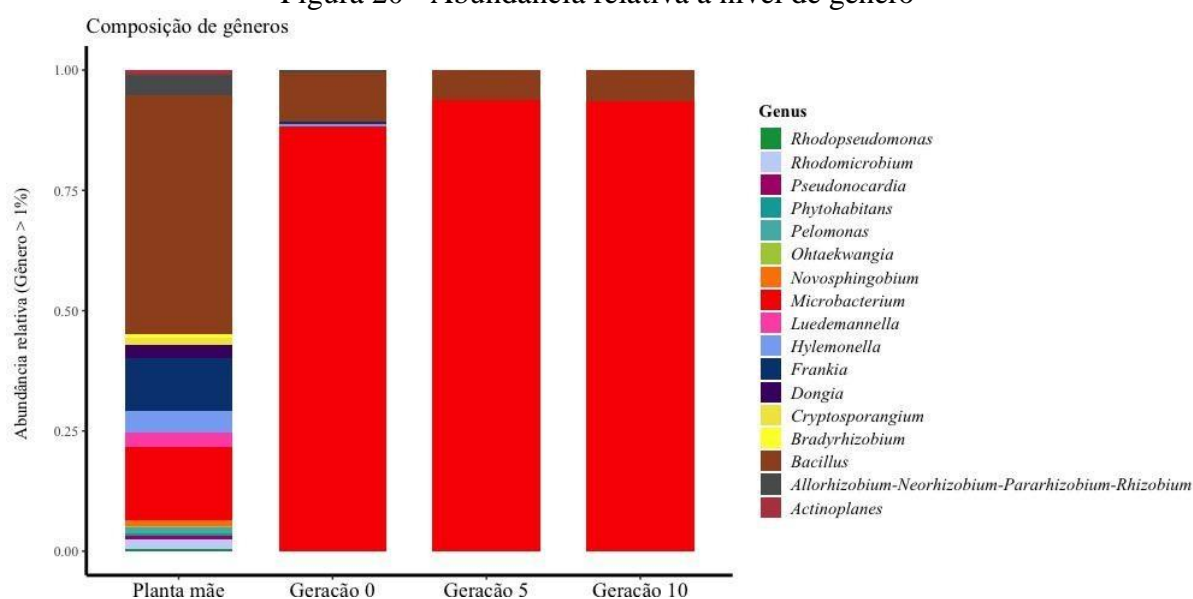


Abundância relativa em nível de filo encontrada na Planta mãe e nas Gerações *in vitro*: G0, G5 e G10.

Fonte: Da autora (2024).

A análise da abundância relativa em nível de gênero revelou que a planta mãe (PM) apresentou a maior diversidade na microbiota endofítica do morangueiro em condições *ex vitro*, com 17 gêneros identificados, sendo *Bacillus*, *Microbacterium*, *Frankia*, *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium* e *Hylemonella* os mais abundantes. A geração G0, apresentou redução para cinco gêneros, com predominância de *Microbacterium* e *Bacillus*, enquanto *Frankia*, *Hylemonella* e *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium* mostraram menor abundância. As gerações G5 e G10 exibiram apenas dois gêneros, com dominância de *Microbacterium* seguido por *Bacillus* em menor proporção (Figura 20).

Figura 20 - Abundância relativa a nível de gênero



Abundância relativa em nível de gênero encontrada na Planta mãe e nas Gerações *in vitro*: G0, G5 e G10.

Fonte: Da autora (2024).

O diagrama de Venn (Figura 21) ilustra a distribuição de gêneros bacterianos entre na planta mãe (PM) e nas gerações *in vitro*. A planta mãe (PM) apresentou 17 gêneros exclusivos (46.7%), evidenciando maior diversidade na microbiota endofítica em condições naturais. A geração G0, manteve 5 gêneros compartilhados (33.3%) com a PM, indicando que, embora tenha ocorrido a transição para o ambiente de cultivo *in vitro*, alguns gêneros endofíticos específicos foram mantidos apenas nesta primeira geração. As gerações G5 e G10 apresentaram uma baixa diversidade de gêneros bacterianos compartilhados (20%) entre todas as gerações, sugerindo redução da diversidade microbiana ao longo das gerações em condições *in vitro*.

Figura 21 - Diagrama de Venn

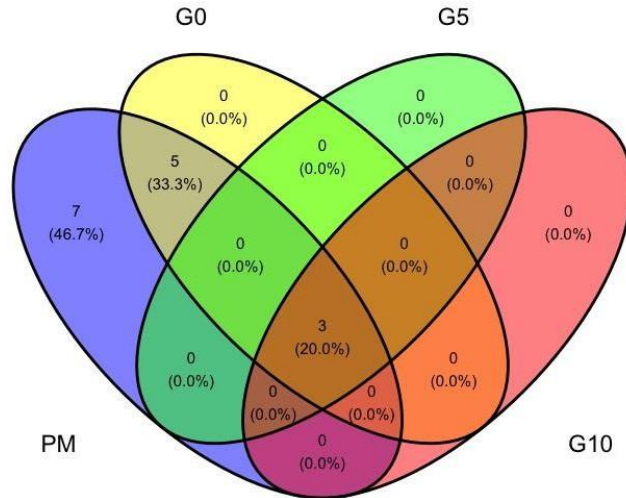
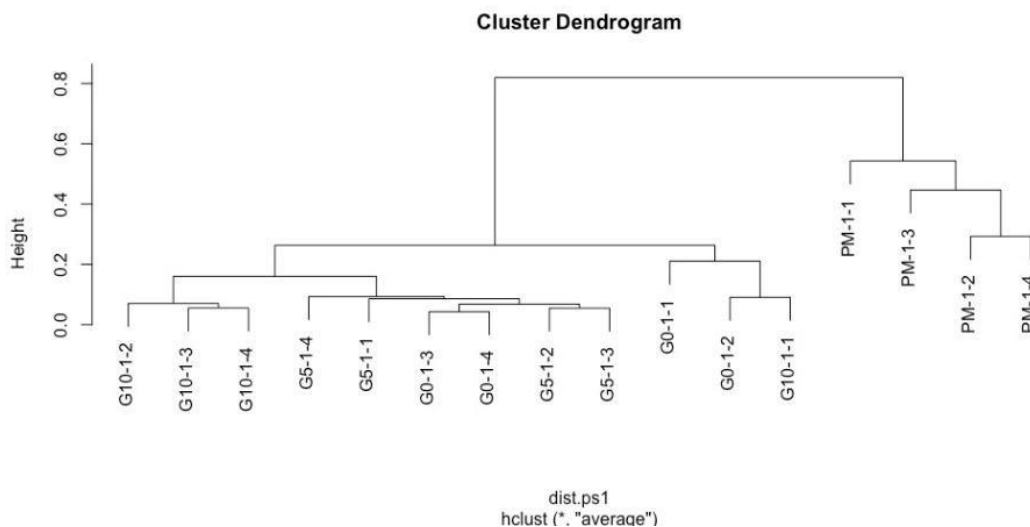


Diagrama de Venn agrupando os gêneros bacterianos presentes na planta mãe (PM) e nas gerações *in vitro*.

Fonte: Da autora (2024).

O dendrograma (Figura 22), sugere dois agrupamentos principais: um formado pela PM e outro pelas três gerações *in vitro* (G0, G5 e G10). As gerações cultivadas *in vitro* demonstraram maior similaridade entre si formando subagrupamentos distintos, com perfis microbianos mais similares entre si na microbiota endofítica. Esta análise evidencia que o cultivo *in vitro* promoveu mudanças significativas na composição microbiana, assim, as gerações *in vitro* mostraram comunidades mais homogêneas e distintas da planta mãe.

Figura 22 - Dendrograma



Dendrograma que permite visualizar as agrupações entre a planta mãe (PM) e as gerações *in vitro* (G0, G5 e G10) ao longo dos subcultivos.

Fonte: Da autora (2024).

3.3 Resposta da cultivar SA à biotização individual

Os resultados da biotização individual indicaram que 30% das cepas testadas influenciaram positivamente as variáveis de comprimento da parte aérea (Tabela 19), biomassa seca da parte aérea (SDM), biomassa seca da raiz (RDM) e acúmulo de biomassa seca total (TDM), destacando-se as cepas *Azospirillum brasilense* Ab-V5, *Azospirillum brasilense* Ab-V6 e *Bacillus subtilis* CCMA 0401 (Figura 23).

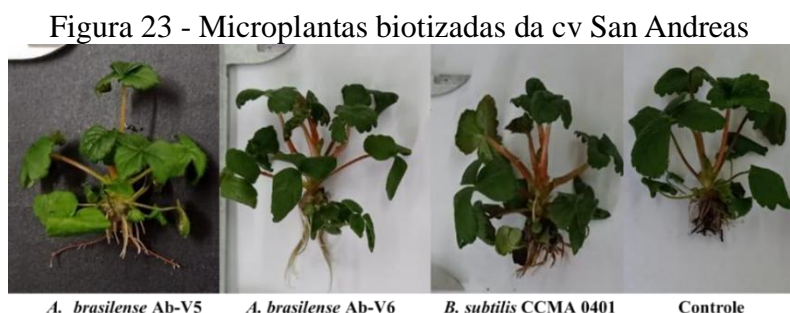
Em contraste, as cepas *Rhizobium leucaneae* BR935, *Sinorhizobium fredii* BR921 e *Rhizobium tropici* CIAT 899 apresentaram valores semelhantes ao controle. Além disso, observou-se um efeito negativo no desenvolvimento das microplântulas biotizadas com as cepas *Bacillus megaterium* CCMA 0004, *Bradyrhizobium japonicum* CCMA 0088 e *Sinorhizobium fredii* CCMA 0122 após 30 dias de cultivo *in vitro*. A cepa *Bacillus amyloliquefaciens* CCMA0112 foi excluída do experimento após 72 horas de co-cultivo devido ao crescimento excessivo tanto sobre as microplântulas quanto no meio de cultivo.

Tabela 19 - Biotização individual da cultivar San Andreas com as BPCVs

Biotização <i>in vitro</i> da Cv <i>San Andreas</i>	Comprimento (cm)		Massa seca (mg)		
	Comprimento parte aérea (CPA)	Comprimento da raiz (CR)	Massa seca parte aérea (MSPA)	Massa seca da raiz (MSR)	Massa total (MT)
<i>A. brasilense</i> Ab-V5	3.9 ± 0.01 ^a	3.0 ± 0.01 ^a	175.25 ± 0.2 ^a	41.5 ± 0.3 ^a	216.75 ± 0.3 ^a
<i>A. brasilense</i> Ab-V6	3.73 ± 0.08 ^{a, b}	2.93 ± 0.02 ^a	169.88 ± 0.4 ^{a, b}	39.23 ± 0.9 ^a	209.11 ± 1.1 ^a
<i>R. tropici</i> CIAT 899	2.78 ± 0.03 ^e	1.0 ± 0.0 ^e	81.25 ± 1.3 ^c	20.13 ± 0.2 ^e	101.38 ± 1.3 ^d
<i>R. leucaneae</i> BR935	3.5 ± 0.06 ^{b, c}	1.61 ± 0.04 ^{b, c}	164.63 ± 0.2 ^{a, b}	31.0 ± 0.1 ^b	195.63 ± 0.2 ^{b, c}
<i>S. fredii</i> BR921	3.03 ± 0.08 ^{d, e}	1.33 ± 0.02 ^d	164 ± 0.3 ^{a, b}	24.88 ± 0.2 ^{c, d}	188.8 ± 0.2 ^c
<i>S. fredii</i> CCMA 0122	0.0 ± 0.0 ^g	0.0 ± 0.0 ^g	8.12 ± 0.09 ^e	4.83 ± 0.1 ^d	12.95 ± 0.1 ^f
<i>B. japonicum</i> CCMA 0088	1.78 ± 0.03 ^f	0.45 ± 0.01 ^f	17.25 ± 0.1 ^e	4.21 ± 0.3 ^e	21.46 ± 0.3 ^f
<i>B. subtilis</i> CCMA 0401	3.88 ± 0.05 ^a	1.80 ± 0.06 ^b	167.11 ± 1.4 ^{a, b}	37.75 ± 0.2 ^a	204.86 ± 1.5 ^{a, b}
<i>B. megaterium</i> CCMA 0004	1.90 ± 0.03 ^f	0.66 ± 0.04 ^f	41.68 ± 1.0 ^d	7.54 ± 0.4 ^e	49.2 ± 1.2 ^e
Controle	3.24 ± 0.02 ^{c, d}	1.49 ± 0.02 ^{c, d}	163.25 ± 1.2 ^b	27.38 ± 0.1 ^{b, c}	190.63 ± 1.2 ^c

Variáveis fitotécnicas das microplantas da cultivar San Andreas biotizadas individualmente. Comprimento parte aérea (CPA), Comprimento da raiz (CR), Massa seca parte aérea (MSPA), Massa seca da raiz (MSR), Massa total (MT). Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$).

Fonte: Da autora (2024).



Microplantas biotizadas que promoveram algum parâmetro de crescimento nas condições *in vitro* na cv. San Andreas.

Fonte: Da autora (2024).

Assim, as quatro melhores cepas da biotização individual foram *A. brasilense* Ab-V5, *A. brasilense* Ab-V6 e *B. subtilis* CCMA 0401, utilizadas para a biotização em consórcios (Tabela 20), mostrando que os consórcios Ab-V6+0401, Ab-V5+0401 e Ab-V5+BR935 tiveram maior influência no desenvolvimento da massa aérea e da raiz, se refletindo no acúmulo da massa total, os outros dois consórcios Ab-V6+BR935 e BR935+0401 estiveram próximos do controle e abaixo deste, respectivamente.

Tabela 20 - Biotização com os consórcios *in vitro* da cultivar San Andreas

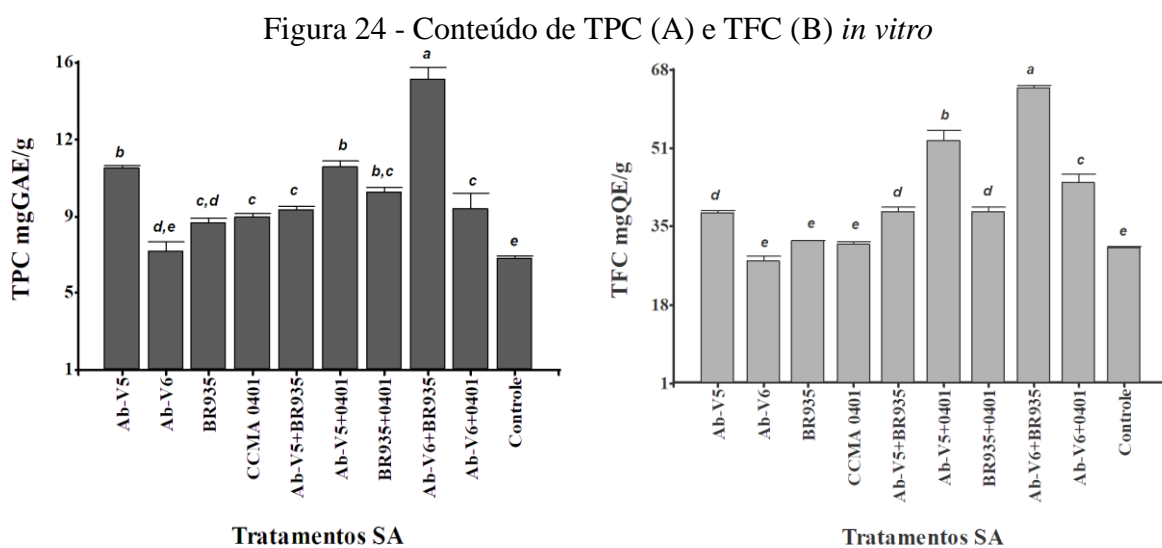
Biotização em consórcios na cultivar San Andreas	Comprimento (cm)		Massa seca (mg)		
	Comprimento parte aérea (CPA)	Comprimento da raiz (CR)	Massa seca parte aérea (MSPA)	Massa seca da raiz (MSR)	Massa total (MT)
Ab-V5 + BR935	5.98 ± 0.03 ^a	1.72 ± 0.03 ^b	214.17 ± 0.9 ^c	62.8 ± 0.4 ^b	277.0 ± 1.3 ^a
Ab-V5 + 0401	4.70 ± 0.02 ^b	2.40 ± 0.02 ^a	233.3 ± 0.2 ^b	63.67 ± 0.4 ^b	297.0 ± 0.5 ^a
BR935 + 0401	2.77 ± 0.02 ^d	1.30 ± 0.01 ^c	148.5 ± 0.3 ^e	40.83 ± 0.2 ^c	189.33 ± 0.5 ^b
Ab-V6 + BR935	3.35 ± 0.01 ^c	1.55 ± 0.01 ^{b, c}	150.0 ± 0.3 ^e	42.6 ± 0.1 ^c	192.6 ± 0.3 ^b
Ab-V6 + 0401	5.88 ± 0.04 ^a	2.12 ± 0.01 ^a	264.8 ± 1.4 ^a	99.6 ± 0.2 ^a	364.4 ± 1.6 ^a
Controle	3.30 ± 0.01 ^c	1.51 ± 0.07 ^{b, c}	164.83 ± 0.3 ^d	28.17 ± 0.1 ^d	193.0 ± 0.2 ^b

Variáveis fitotécnicas das microplantas da cultivar San Andreas biotizadas 1420m consórcios. Comprimento parte aérea (CPA), Comprimento da raiz (CR), Massa seca parte aérea (MSPA), Massa seca da raiz (MSR), Massa total (MT). Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$).

Fonte: Da autora (2024).

3.3.1 Quantificação de fenóis e flavonóides *in vitro*

A quantificação de fenóis e flavonóides revelou um padrão similar na resposta do acúmulo nos tratamentos, onde o consórcio Ab-V6+BR935 teve maior concentração de TPC e TFC, seguidos do Ab-V5+0401, Ab-V6+0401 e Ab-V5 no TPC, e Ab-V6 no TFC, os demais tratamentos tiveram valores próximos ao controle (Figura 24A, 24B).



Quantificação do Conteúdo de Fenóis Totais (TPC) e Conteúdo de Flavonóides Totais (TFC) na cultivar San Andreas em condições *in vitro*. Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$).

Fonte: Da autora (2024).

3.4 Adaptação da cultivar San Andreas às condições *ex vitro*

Após a transferência das mudas de condições *in vitro* para condições *ex vitro*, foi calculada a taxa de sobrevivência das plantas. As mudas biotizadas (A) mostraram que os quatro tratamentos individuais, bem como os consórcios Ab-V5+0401 e BR935+0401, apresentaram uma taxa de sobrevivência de 100%. As mudas submetidas a uma segunda re- inoculação demonstraram que os tratamentos Ab-V5, CCMA0401, Ab-V5+BR935, Ab-V5+0401 e BR935+0401 também mantiveram uma taxa de sobrevivência de 100%. Em

contrapartida, os demais tratamentos apresentaram taxas de sobrevivência próximas ou inferiores ao controle, sendo que os consórcios formados pela cepa Ab-V6 apresentaram apenas 50%, enquanto o controle obteve uma taxa de sobrevivência de 75% (Tabela 21).

Tabela 21 - Percentagem de sobrevivência

Tratamentos <i>ex vitro</i>	A	B
<i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5	100	100
<i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V6	100	75
<i>Rhizobium leucanae</i> BR935	100	75
<i>Bacillus subtilis</i> CCMA 0401	100	100
Ab-V5 + BR935	87.5	100
Ab-V5 + 0401	100	100
BR935 + 0401	100	100
Ab-V6 + BR935	50	50
Ab-V6 + 0401	75	50
Controle Sem bactéria, (H ₂ O destilada estéril)	75	75

Percentagem de supervivência das microplantas de morangueiro da cultivar San Andreas (A): biotização; (B): Re-inoculação em condições *ex vitro*.

Fonte: Da autora (2024).

3.4.1 Variáveis fitotécnicas sob condições *ex vitro* da Cultivar San Andreas

Nas mudas biotizadas (A), o parâmetro de comprimento da parte aérea (CPA) não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos e o controle. Contudo, os tratamentos re-inoculados, o consórcio Ab-V5+0401 destacou-se, apresentando maior comprimento de CPA. Quanto ao comprimento da raiz (CR), os consórcios Ab-V5+0401, BR935+0401 e Ab-V5+BR935 resultaram em raízes mais longas nas plantas tanto biotizadas quanto re-inoculadas. O maior acúmulo de massa total (MT) nas mudas biotizadas (A) foi observado nos tratamentos com as cepas CCMA0401 e Ab-V5, seguido do consórcio BR935+0401. Nos tratamentos submetidos a uma segunda re-inoculação (B), destacaram Ab-V5+0401, Ab-V5 e Ab-V5+BR935. Por outro lado, os consórcios com a cepa Ab-V6 apresentaram menor resposta nas variáveis analisadas (Tabela 22).

Tabela 22 - Variáveis fitotécnicas após aclimatização na cv San Andreas *ex vitro*

		Comprimento (cm)			Massa seca (g)		
		Comprimento parte aérea (CPA)	Comprimento da raiz (CR)	Diâmetro foliar (DF)	Massa seca parte aérea (MSPA)	Massa seca da raiz (MSR)	Massa total (MT)
Biotização (A)	Ab-V5	12.13 ± 0.2 ^a	15.54 ± 0.24 ^d	14.16 ± 0.13 ^a	1.17 ± 0.05 ^{a, b}	0.83 ± 0.06 ^{a, b}	2.0 ± 0.09 ^a
	Ab-V6	12.46 ± 0.07 ^a	17.25 ± 0.21 ^c	13.40 ± 0.1 ^{a, b}	1.06 ± 0.06 ^b	0.41 ± 0.04 ^{d, e}	1.47 ± 0.08 ^{c, d}
	BR935	10.69 ± 0.15 ^b	10.71 ± 0.14 ^e	8.64 ± 0.3 ^e	0.99 ± 0.07 ^{b, c}	0.49 ± 0.04 ^{c, d, e}	1.48 ± 0.08 ^{c, d}
	CCMA 0401	12.29 ± 0.17 ^a	15.39 ± 0.1 ^d	14.26 ± 0.08 ^a	1.34 ± 0.03 ^a	0.67 ± 0.06 ^{b, c}	2.01 ± 0.06 ^a
	Ab-V5 + BR935	9.20 ± 0.2 ^c	18.50 ± 0.21 ^c	10.20 ± 0.26 ^d	0.74 ± 0.05 ^{c, d, e}	0.90 ± 0.06 ^a	1.64 ± 0.1 ^{b, c}
	Ab-V5 + 0401	10.15 ± 0.16 ^{b, c}	28.19 ± 0.35 ^a	11.0 ± 0.19 ^{c, d}	0.72 ± 0.05 ^{d, e}	0.50 ± 0.03 ^{c, d, e}	1.22 ± 0.06 ^{d, e}
	BR935 + 0401	12.47 ± 0.12 ^a	21.78 ± 0.33 ^b	13.13 ± 0.27 ^b	1.20 ± 0.06 ^{a, b}	0.70 ± 0.03 ^{a, b, c}	1.90 ± 0.05 ^{a, b}
	Ab-V6 + BR935	7.85 ± 0.3 ^d	6.81 ± 0.4 ^f	7.28 ± 0.27 ^f	0.24 ± 0.02 ^f	0.18 ± 0.01 ^f	0.42 ± 0.02 ^f
	Ab-V6 + 0401	9.98 ± 0.18 ^{b, c}	15.96 ± 0.22 ^d	10.49 ± 0.17 ^d	0.53 ± 0.03 ^e	0.36 ± 0.04 ^{e, f}	0.89 ± 0.07 ^e
	Controle A	11.86 ± 0.2 ^a	15.54 ± 0.31 ^d	11.75 ± 0.23 ^c	0.95 ± 0.07 ^{b, c, d}	0.60 ± 0.04 ^{c, d}	1.55 ± 0.09 ^{b, c, d}
Biotização + Re-inoculação (B)	Ab-V5	11.01 ± 0.18 ^{c, d}	15.85 ± 0.18 ^c	12.54 ± 0.12 ^{b, c}	1.39 ± 0.05 ^b	1.37 ± 0.06 ^a	2.76 ± 0.03 ^a
	Ab-V6	11.66 ± 0.2 ^{b, c}	18.58 ± 0.3 ^b	10.28 ± 0.17 ^e	0.40 ± 0.03 ^d	0.29 ± 0.02 ^{d, e}	0.69 ± 0.03 ^e
	BR935	10.74 ± 0.17 ^d	9.79 ± 0.19 ^e	11.41 ± 0.19 ^d	0.86 ± 0.05 ^c	0.53 ± 0.08 ^c	1.39 ± 0.05 ^{c, d}
	CCMA 0401	10.69 ± 0.18 ^d	12.90 ± 0.23 ^d	12.05 ± 0.18 ^{c, d}	0.87 ± 0.04 ^c	0.45 ± 0.03 ^{c, d}	1.32 ± 0.05 ^d
	Ab-V5 + BR935	12.15 ± 0.08 ^b	22.74 ± 0.17 ^a	13.30 ± 0.3 ^{a, b}	1.40 ± 0.05 ^b	0.56 ± 0.03 ^c	1.96 ± 0.06 ^b
	Ab-V5 + 0401	13.22 ± 0.09 ^a	23.31 ± 0.7 ^a	14.03 ± 0.26 ^a	1.86 ± 0.08 ^a	1.01 ± 0.05 ^b	2.87 ± 0.1 ^a
	BR935 + 0401	11.04 ± 0.2 ^{c, d}	19.84 ± 0.25 ^b	9.59 ± 0.17 ^e	1.0 ± 0.03 ^c	0.63 ± 0.04 ^c	1.63 ± 0.07 ^c
	Ab-V6 + BR935	5.28 ± 0.19 ^e	6.44 ± 0.23 ^f	5.29 ± 0.32 ^f	0.20 ± 0.06 ^d	0.17 ± 0.06 ^e	0.37 ± 0.01 ^f
	Ab-V6 + 0401	5.19 ± 0.17 ^e	7.19 ± 0.08 ^f	4.88 ± 0.22 ^f	0.39 ± 0.02 ^d	0.24 ± 0.02 ^e	0.63 ± 0.03 ^{e, f}
	Controle B	12.05 ± 0.2 ^b	15.23 ± 0.19 ^c	11.45 ± 0.27 ^d	0.91 ± 0.06 ^c	0.61 ± 0.04 ^c	1.52 ± 0.02 ^{c, d}

Variáveis fitotécnicas da cultivar San Andreas biotizadas individualmente e em consórcios que foram transplantadas para a casa de vegetação. (A) Biotizadas; (B) Re-inoculadas Comprimento parte aérea (CPA), Comprimento da raiz (CR), Massa seca parte aérea (MSPA), Massa seca da raiz (MSR), Massa total (MT). Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$).

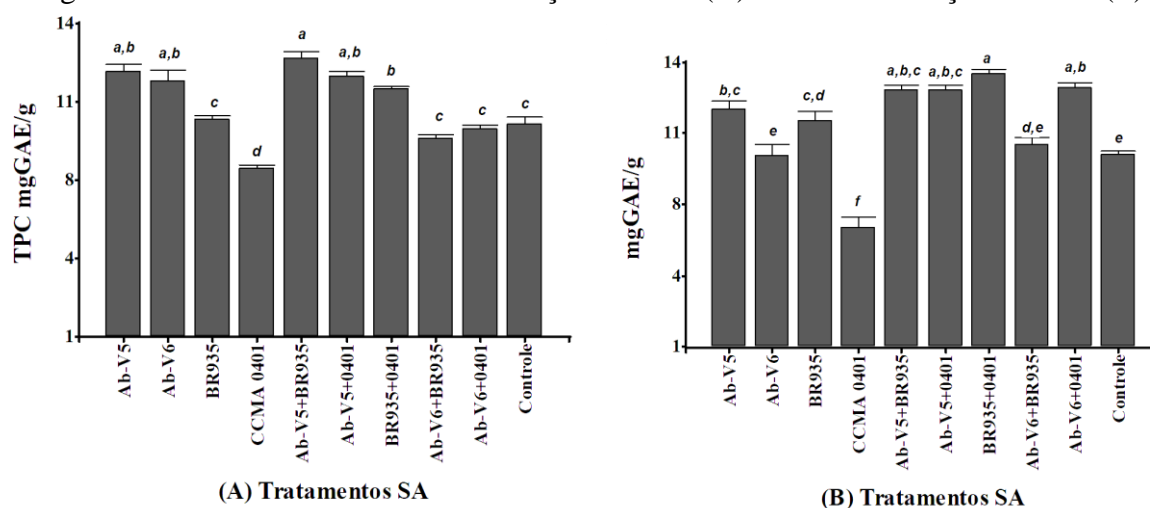
Fonte: Da autora (2024).

3.4.2 Quantificação de fenóis em condições *ex vitro* na cultivar San Andreas

Observou-se que as mudas biotizadas apresentaram o conteúdo fenólico total (TPC), teve maior destaque para o consórcio formado pelas cepas Ab-V5+BR935 que atingiu 12.57 mgGAE/g. Esse resultado foi seguido pelo tratamento individual com Ab-V5 (12.03 mgGAE/g), pelo consórcio Ab-V5+0401 (11.82 mgGAE/g), Ab-V6 (11.62 mgGAE/g) e pelo consórcio BR935+0401 com 11.27 mgGAE/g. Os demais tratamentos apresentaram valores aos próximos ao controle (9.85 mgGAE/g), enquanto o tratamento individual CCMA 0401 registrou o menor acúmulo com 7.97 mgGAE/g (Figura 25 A).

A re-inoculação da cv SA (Figura 25 B), mostrou que o consórcio BR935+0401 apresentou maior acúmulo de conteúdo fenólico total (TPC), com 13,47 mgGAE/g, destacando-se entre os tratamentos. Em sequência, os consórcios Ab-V6+0401, Ab-V5+BR935 e Ab-V5+0401 mostraram valores de TPC significativos, com 12.86 mgGAE/g, 12.77 mgGAE/g e 12.74 mgGAE/g, respectivamente. Logo após estiveram os tratamentos individuais Ab-V5 e BR935 com acúmulos de 11.88 mgGAE/g e 11.37 mgGAE/g, respectivamente, enquanto o controle teve um valor de 9.76 mgGAE/g. Os demais tratamentos mostraram acúmulos de TPC próximos ou inferiores ao controle, onde novamente o tratamento CCMA0401 apresentou menores acúmulos.

Figura 25 - Conteúdo de TPC na biotização *ex vitro* (A) e na re-inoculação *ex vitro* (B)



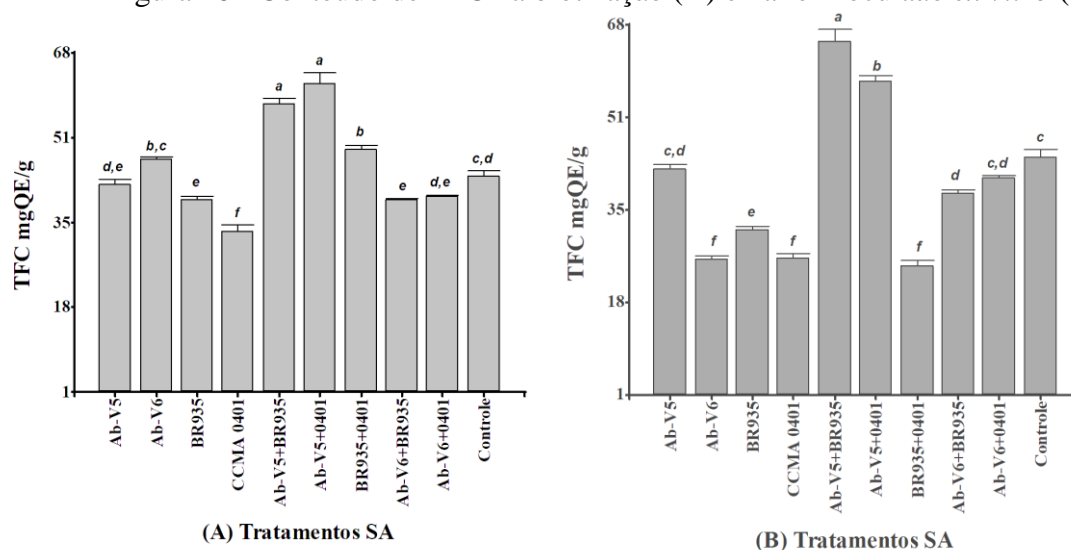
Quantificação do Conteúdo de Fenóis Totais (TPC) na cultivar San Andreas. (A) Biotizadas; (B) Re-inoculadas Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$).

Fonte: Da autora (2024).

3.4.3 Quantificação de flavonóides *ex vitro* na cultivar San Andreas

O acúmulo de flavonóides nas condições *ex vitro* se observa na figura 26A para as mudas biotizadas e 26B para a mudas com uma segunda re-inoculação.

Figura 26 - Conteúdo de TFC na biotização (A) e na re-inoculação *ex vitro* (B)



Quantificação do Conteúdo de Flavonóides Totais (TFC) na cultivar San Andreas. (A) Biotizadas; (B) Re-inoculadas Letras distintas indicam diferenças estatisticamente significativas ($P < 0.05$).

Fonte: Da autora (2024).

Na biotização da cultivar SA (Figura 26A), observou-se que os tratamentos Ab-V5+0401 e Ab-V5+BR935 apresentaram maior acúmulo de conteúdo total de flavonóides (TFC), com 61.92 mgQE/g e 57.93 mgQE/g, respectivamente. Em seguida, o tratamento com BR935+0401 mostrou um valor de 48.91 mgQE/g. Os demais tratamentos tiveram valores próximos ou inferiores ao controle, que teve um acúmulo de 43.68 mgQE/g. Na re-inoculação (Figura 26 B), os tratamentos com maiores acúmulos de flavonóides foram Ab-V5+BR935 com 64.99 mgQE/g e Ab-V5+0401 com 57.85 mgQE/g. Os demais tratamentos estiveram com valores iguais ou inferiores ao controle, que registrou 44.01 mgQE/g.

4 DISCUSSÃO

4.1 Microbioma vegetal endofítico na cultura *in vitro* do morangueiro

O microbioma vegetal desempenha um papel crucial na produtividade e saúde das plantas, influenciando aspectos como crescimento, resistência a doenças e capacidade de

enfrentar estresses bióticos e abióticos (Hardoim *et al.*, 2015). Dentro desse contexto, os microbiomas endofíticos, que habitam os tecidos internos das plantas e estabelecem interações estreitas com os hospedeiros, são de particular interesse nesta pesquisa. O avanço das tecnologias de sequenciamento tem permitido uma análise mais detalhada dessas comunidades endofíticas (Jansson; Baker, 2016), revelando aspectos essenciais das interações ecológicas e funcionais entre microrganismos e plantas hospedeiras.

Fatores como a idade da planta, o genótipo e as condições ambientais desempenham um papel significativo na formação do microbioma endofítico. A colonização inicial ocorre frequentemente por meio da seleção de microrganismos na rizosfera, sendo influenciada por fatores genéticos específicos da planta, que facilitam a entrada de microrganismos nas raízes (Haldar; Sengupta, 2015; Knights *et al.*, 2021). Entre os avanços recentes, o estudo da microbiota endofítica em condições de cultivo *in vitro* tem se mostrado relevante, oferecendo novas perspectivas sobre a composição e modulação do microbioma em ambientes controlados, embora ainda seja uma área pouco explorada.

O sequenciamento do gene 16S rRNA nesta pesquisa revelou que a Planta Mãe (PM), mantida em condições *ex vitro*, apresentou maior riqueza e diversidade de espécies em comparação com as gerações micropropagadas (G0, G5, G10) cultivadas *in vitro* por dez meses. As gerações micropropagadas mostraram maior similaridade entre si, embora, com algumas variações na composição bacteriana principalmente na G0. Esses resultados estão em conformidade com a literatura, que indica que culturas de tecidos vegetais geralmente apresentam menor diversidade endofítica quando comparadas a plantas mantidas em condições *ex vitro*. Isso ocorre porque o cultivo *in vitro* se origina de um único explante, neste caso, de estolões, e apenas um subconjunto dos endófitos conseguem sobreviver às condições de assepsia aplicadas antes do estabelecimento do cultivo (Orlikowska, Nowak, Reed., 2017; Quambusch *et al.*, 2014; Quambusch; Winkelmann, 2018).

Nossos estudos demonstraram que a microbiota endofítica da planta mãe (PM) incluiu sete filos, sendo que os filos Firmicutes, Actinobacteriota e Proteobacteria se destacaram por sua maior abundância, com um total de 17 gêneros identificados (Figura 7). A distribuição da microbiota na PM foi distinta quando comparada com as microbiotas das gerações cultivadas *in vitro* (G0, G5, G10). Nas gerações cultivadas *in vitro*, observou-se um aumento significativo do filo Actinobacteriota (>0.8%) em todas as três gerações, seguido pelo filo Firmicutes, enquanto o filo Proteobacteria esteve presente apenas na geração inicial (G0), desaparecendo nas gerações subsequentes, o que sugere uma possível perda desse grupo ao longo dos subcultivos *in vitro*. Estudos prévios sobre o microbioma endofítico em diferentes

espécies micropropagadas corroboram nossos achados, especialmente quanto à predominância do filo Actinobacteriota. Um estudo com *Arbutus unedo* L., realizado tanto em condições *in vitro* quanto *ex vitro*, identificou o filo Actinobacteriota como o mais abundante no cultivo *in vitro* (48%), seguido por Proteobacteria (43%), Firmicutes (6%) e Bacteroidota (3%). Com uma composição semelhante observada nas amostras *ex vitro*, embora com variações entre os genótipos (Martins *et al.*, 2022).

Em relação aos nossos resultados, observamos que, nas condições *in vitro*, a geração G0 apresentou cinco gêneros bacterianos com *Microbacterium* como o mais representativo, seguido por *Bacillus*, e, em menor abundância, *Frankia*, *Hylemonella* e *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*. Já nas gerações G5 e G10, houve uma diminuição considerável, na diversidade. Com apenas dois gêneros observados, sendo *Microbacterium* o mais abundante, e *Bacillus* em menor proporção. Assim, Martins e colaboradores 2022, relataram que no *Arbutus unedo* L, encontraram o filo Actinobacteriota com gêneros *Mycobacterium* (49.7%), *Cutibacterium* (36.9%) e *Corynebacterium* (3.5%) como os mais representativos, e com *Micrococcus* (1.7%) em menor quantidade. No filo Proteobacteria os gêneros mais abundantes foram *Pseudomonas* (62.4%) e *Serratia* (17.2%), enquanto, no filo Firmicutes, destacaram-se *Staphylococcus* (29.4%), *Streptococcus* (28.6%), *Bacillus* (17.8%) e *Lactobacillus* (9.9%) (Martins *et al.*, 2022).

Por outro lado, estudos realizados em sementes de trigo demonstraram que a maior diversidade de endófitos está concentrada nos endospermas das sementes, enquanto os embriões abrigam menos bactérias. Encontrando o gênero *Pantoea* e *Paenibacillus* como dominantes no material de semente estudado, enquanto, nas raízes de duas cultivares de trigo, foram identificados 13 gêneros, incluindo *Bacteroides*, *Corynebacterium*, *Limnohabitans*, *Lachnoclostridium*, *Escherichia/Shigella*, *Paenibacillus*, *Cutibacterium*, *Candidatus Brocardia*, *Halomonas*, *Microbacterium*, *Paenisporosarcina*, *Streptomyces* e *Roseburia* (Kuźniar *et al.*, 2020).

Nesta pesquisa, *Microbacterium*, foi o gênero predominante nas gerações *in vitro*. Outros estudos já relataram a presença desse gênero, como *Microbacterium zea* sp. nov., uma nova espécie de bactéria endofítica isolada do tecido do caule de milho na China, diferenciada de outras espécies do gênero por sua morfologia, perfil de ácidos graxos e sequenciamento do gene 16S rRNA (Gao *et al.*, 2017). Outro estudo encontrou endófitos em sementes de arroz cultiváveis, tendo maior abundância do filo Proteobacteria, incluindo o gênero *Flavobacterium* sp, com alta tolerância à salinidade e estresse osmótico, catalogadas como solubilizadoras de fosfato e produtoras de ácido indol-3-acético, ademais os gêneros

Microbacterium sp e *Xanthomonas* sp apresentaram atividade pectinase e celulase (Walitang *et al.*, 2017).

Estudos recentes sobre o microbioma endofítico em três cultivares de morangueiro cultivadas em condições *ex vitro* revelaram que os filos Actinobacteriota, Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria e Bacteroidia constituíram aproximadamente 80% das OTUs detectadas em diferentes compartimentos da planta e no solo. Esses resultados destacam a importância destes estudos, mostrando que tanto o genótipo quanto o órgão da planta influenciam significativamente para a estrutura e funcionalidade metabólica da microbiota, podendo também incluir microrganismos com capacidade de fixação de nitrogênio entre outros benefícios relacionados como a promoção de crescimento vegetal. Assim o filo Actinobacteriota se mostrou predominante em todos os genótipos e compartimentos estudados do morangueiro (Sangiorgio *et al.*, 2022). Enquanto o presente estudo, mostrou que a planta mãe, por estar em condições naturais, retém uma diversidade microbiana mais distinta. Esse padrão indica que a micropropagação e o ambiente *in vitro* podem levar a uma perda de diversidade microbiana ou a uma seleção de certos microrganismos que conseguem persistir nessas condições, neste caso o filo Actinobacteriota foi o que predominou ao longo dos subcultivos.

Em outro estudo, foi relatado que a bactéria endofítica *Paenibacillus lautus*, isolada de plantas *Leucojum aestivum* cultivadas *in vitro*, demonstrou capacidade de sintetizar alcaloides do tipo Amaryllidaceae. Além disso, essa bactéria produziu ácido indol-3-acético, t-zeatina, c-zeatina, cinetina, giberelina A₁, ácido abscísico, ácido salicílico e ácido benzoico, ela também induziu o aumento da biomassa seca, estimulou a produção de galantamina e licorina, e influenciou o conteúdo de pigmentos e as atividades de enzimas antioxidantes (Ptak *et al.*, 2022). O anterior destaca a importância dos microrganismos endofíticos na agricultura sustentável.

Além disso, há relatos de microrganismos endofíticos que se manifestam ao longo do cultivo *in vitro*, como observado em estudos com outras culturas, nos quais esses microrganismos surgem em explantes previamente estabelecidos na cultura *in vitro* (Almeida *et al.* 2009; Abreu-Tarazi *et al.* 2010; Esposito-Polesi *et al.* 2015, 2017). No presente estudo, não foi observada manifestação endofítica nas gerações subcultivadas ao longo dos 10 meses de cultivo *in vitro* de morangueiro da cultivar San Andreas.

Estudos anteriores têm destacado a diversidade microbiana associada a espécies micropropagadas de *Atriplex canescens* e *Atriplex torreyi* var. *griffithsii*, nas quais foram amplificadas sequências de DNA homólogas a diversos táxons fúngicos e bacterianos isolados

de calos. Esses microrganismos foram agrupados com mais de 95% de similaridade com bactérias pertencentes aos filos Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobacteria (Lucero *et al.*, 2011). De maneira similar, em *Prunus avium* L., a comunidade bacteriana endofítica foi avaliada em seis genótipos distintos, revelando variações significativas nos padrões de crescimento durante a propagação *in vitro*. Nesse estudo, o gênero *Mycobacterium* foi o predominante, enquanto outros gêneros, como *Rhodopseudomonas* sp. N-I-2 e *Microbacterium* D-I-1, estavam presentes apenas nos genótipos de fácil propagação. Esses gêneros demonstraram efeitos positivos no enraizamento dos genótipos de difícil propagação, sugerindo que a composição microbiana endofítica pode influenciar a resposta das plantas (Quambusch *et al.*, 2014).

Nesse contexto, estudos adicionais são necessários para compreender ainda mais os efeitos da comunidade endofítica latente presente na cultura *in vitro*, e como esta pode influenciar e modular a resposta vegetal sob diversas condições de cultivo. Assim, encontramos que a planta mãe (PM) em condições *ex vitro* apresentou maior diversidade e riqueza endofítica, enquanto nas gerações *in vitro* foi observada uma diminuição dessa diversidade, sugerindo que a condição de cultivo na qual as culturas *in vitro* são submetidas pode influenciar a composição e a redução do microbioma ao longo do tempo. Já que no cultivo *in vitro* tem-se concentração de gases no interior dos recipientes, alta umidade, baixa transpiração e fotossíntese, alto CO₂ etc. Tal condição pode não ser favorável para alguns microrganismos. Esses resultados reforçam a importância de se compreender a conformação do microbioma endofítico e a possibilidade de manipular a população bacteriana endógena, seja por meio de ajustes nas condições de cultura ou pela inoculação dos mesmos endófitos ou com bactérias promotoras de crescimento vegetal, como uma estratégia para melhorar a sobrevivência e o desenvolvimento das plantas durante as fases críticas da cultura de tecidos vegetais. Finalmente, também se destaca que o estudo da comunidade endofítica fungica na cultivar SA ao longo das gerações também está sendo estudado no Laboratório de Bioprodutos e Interações Planta Microrganismo (LCT/LABIMP-UFLA) do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras- MG.

4.2 Resposta da cultivar SA à biotização individual e em consórcios

A biotização de microplantas em cultura *in vitro* mostra-se uma alternativa promissória para explorar as respostas fisiológicas e metabólicas dos explantes vegetais ao co-cultivo com BPCVs. Este processo permite a selecionar cepas benéficas e suas associações em consórcios, que poderiam influenciar positivamente a resposta vegetal. Nesta pesquisa, a biotização individual da cultivar SA com as dez BPCVs permitiu a seleção das cepas *A. brasilense* Ab-V5, *A. brasilense* Ab-V6 e *B. subtilis* CCMA 0401 como as mais eficazes, observando-se um

aumento na biomassa vegetal. A cepa *R. leucaneae* BR935, com crescimento similar ao controle, também foi utilizada para formar consórcios bacterianos. As combinações Ab-V6+0401, Ab-V5+0401 e Ab-V5+BR935 destacaram-se na promoção de crescimento em condições *in vitro*. Em relação ao acúmulo de fenóis e flavonóides, o consórcio Ab-V6+BR935 apresentou maiores níveis, embora sem aumento significativo de biomassa. Desta forma, as BPCVs também podem impactar no metabolismo secundário das plantas ao induzir alterações no perfil bioquímico durante a interação (Chamam *et al.*, 2012; Miotto-Vilanova *et al.*, 2019; Mhlongo *et al.*, 2020)

Estudos prévios relatam a eficácia da biotização com *Methylobacterium* sp. L10 ou *Stenotrophomonas* sp. L20 na micropropagação de *Jacaranda mimosifolia*. A inoculação com *Methylobacterium* sp. L10 aumentou a taxa de multiplicação em 94% em relação aos brotos não inoculados, e *Stenotrophomonas* sp. L20 em combinação com 30 µM IBA elevou a porcentagem de enraizamento *in vitro* e *ex vitro*, com 95% de sobrevivência após aclimação *ex vitro* após 2 meses na casa de vegetação (Salotti *et al.*, 2023). Assim, Morais *et al.* (2019), relatam que a inoculação de morangueiro com a bactéria *Pedobacter* sp. aumentou significativamente os teores de compostos fenólicos e flavonóides nas folhas, podendo-se utilizar como biofertilizante com potencial para fortalecer as defesas naturais da planta e melhorar a produção e qualidade dos frutos, configurando uma estratégia uma abordagem promissora para a agricultura sustentável.

4.3 Resposta da cultivar San Andreas às condições *ex vitro*

Nas condições *ex vitro*, encontrou-se que a biotização com a cepa *Azospirillum brasilense* Ab-V5, tanto de forma isolada quanto em consórcios, aumentou significativamente a taxa de sobrevivência, enquanto os consórcios com Ab-V6 tiveram menor resposta nas variáveis de promoção de crescimento. Além disso, as plantas biotizadas com Ab-V5, CCMA 0401 e BR935+0401 apresentaram maior acúmulo de biomassa seca, sendo que os tratamentos re-inoculados com Ab-V5 e os consórcios Ab-V5+0401 e Ab-V5+BR935 também influenciaram positivamente nesse parâmetro. O conteúdo de fenóis e flavonóides também foi modulado na presença das BPCVs. Estudos anteriores já têm relatado a cepa Ab-V5 como um biofertilizante, por ter a capacidade de realizar a fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção de fitohormônios (De Andrade *et al.*, 2019; Pedraza *et al.*, 2020). Na caracterização bioquímica realizada anteriormente nesta cepa se encontrou que pode fixar o nitrogênio, solubilizar e disponibilizar fosfato, potássio e zinco, além de ter a

produção de fitohormônios como o AIA, giberelinas e ácido salicílico, e produzir enzimas hidrolíticas tipo proteases.

Já o gênero *Bacillus*, amplamente estudado como promotor de crescimento vegetal, também demonstrou potencial de colonização em ambientes variados devido à sua produção de fitohormônios, solubilização de nutrientes e produção de enzimas extracelulares (Soni; Keharia, 2021). A cepa *B. subtilis* CCMA 0401, usada nesta pesquisa, exibiu propriedades de fixar nitrogênio, solubilização de fosfatos, potássio e zinco, produção de amilases, celulasas, proteases, lipases e quitinases, produtor de giberelinas, ácido salicílico, ACCd, sideróforos, HCN e formação de biofilme moderadamente abundante, características que podem ter influenciado na adaptação da microplanta nas condições externas. Ademais também tem se relatos do uso dos gêneros *Phyllobacterium* e *Rhizobium*, na promoção de crescimento do morangueiro (Flores-Félix *et al.*, 2018).

Observou-se que o consórcio Ab-V6+0401, embora teve um benefício *in vitro*, não promoveu crescimento significativo no solo, possivelmente devido a fatores como competição microbiana, fatores ambientais, bem como pela produção de compostos que, em determinadas concentrações ou condições, são benéficos *in vitro*, mas podem ser prejudiciais no solo devido à acumulação ou interação com outros compostos. Assim, positivamente a cepa Ab-V6 teve menor resposta dos consórcios nesta cultivar devido ao rápido crescimento desta cepa quando comparada com a Ab-V5 (recuento UFC). Portanto, este estudo reforça a relevância do uso de BPCVs isoladamente e em consórcios, afim de selecionar as melhores cepas bacterianas para promover o crescimento e melhorar adaptação das mudas micropropagadas de morangueiro a condições *ex vitro*, representando uma alternativa promissora na cultura de tecidos vegetal.

5 CONCLUSÃO

O estudo do microbioma endofítico de microplantas de morangueiro revelou uma redução nos filos presentes ao longo do cultivo *in vitro*. A geração G0 apresentou maior diversidade (Actinobacteriota, Firmicutes e Proteobacteria), enquanto nas gerações G5 e G10 predominou o filo Actinobacteriota, seguido em menor proporção por Firmicutes. Todas as gerações mostraram um aumento no filo Actinobacteriota após o estabelecimento do cultivo *in vitro*. Pelo contrário, a planta mãe (PM) apresentou sete filos, com predominância de Firmicutes, Actinobacteriota e Proteobacteria além de 17 gêneros, sendo *Bacillus*, o mais abundante. Isso evidencia a maior riqueza e diversidade em condições *ex vitro* e revela uma mudança significativa no microbioma ao longo do processo de micropropagação. Quanto à biotização, esta pesquisa destaca-se pela seleção de cepas bacterianas e combinações promissoras para testes em casa de vegetação. As cepas Ab-V5, CCMA0401 e o consórcio

BR935+0401 promoveram o acúmulo de biomassa nas plantas biotizadas. Da mesma forma, os tratamentos Ab-V5, Ab-V5+0401 e BR935+0401 foram os mais destacados nas plantas re-inoculadas. Desta forma, ressalta-se a importância de explorar as interações entre as plantas e os microrganismos endófitos, bem como as BPCV na cultura de tecidos vegetais, já que podem ser uma opção para a preparação das microplantas às condições *ex vitro*, e o restabelecimento da microbiota vegetal com microrganismos benéficos podendo-se tornar uma alternativa com potencial para melhorar a adaptação e a resposta vegetais às novas condições.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, M.; ARAUJO, W. L.; SOUZA, L. P. Micropropagação de plantas: avanços e desafios. **Journal of Plant Biotechnology**, v. 12, p. 99-110, 2022.
- ABDALLA, N. et al. An Academic and Technical Overview on Plant Micropropagation Challenges. **Horticulturae**, v. 8, n. 8, p. 677, ago. 2022.
- ABREU-TARAZI, M. F.; NAVARRETE, A. A.; ANDREOTE, F. D.; ALMEIDA, C. V.; TSAI, S. M.; ALMEIDA, M. Endophytic bacteria in long-term *in vitro* cultivated „„axenic““ pineapple microplants revealed by PCR-DGGE. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 555-560, 2010.
- ALMEIDA, C. V.; ANDREOTE, F. D.; YARA, R.; TANAKA, F. A. O.; AZEVEDO, J. L.; ALMEIDA, M. Bacteriosomes in axenic plants: endophytes as stable endosymbionts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 1757-1764, 2009.
- ANDERSON, M. J. A new method for non parametric multivariate analysis of variance. **Austral Ecology**, v. 26, p. 32–46, 2001.
- ARAÚJO, R. C. et al. Acclimatization of *Musa* spp. seedlings using endophytic *Bacillus* spp and *Buttiauxella* agrestis strains. **Microbiological Research**, v. 248, p. 1-12, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126750>
- ARAÚJO, R. C. et al. Association of growth-promoting bacteria and hydroponic system aiming at reducing the time of production of banana seedlings. **Archives of Agronomy and Soil Science**, 2022. <https://doi.org/10.1080/03650340.2022.2078965>
- ARAUJO, W. L.; MARCONI, F. C.; MACCHETTI, L. A. Endofíticos como agentes promotores de crescimento e defesa em plantas cultivadas. **Agricultural Microbiology**, v. 8, p. 45-59, 2020.
- ARIZA, M.T.; REBOREDO-RODRÍGUEZ, P.; CERVANTES, L.; SORIA, C.; MARTÍNEZ-FERRI, E.; GONZÁLEZ-BARREIRO, C.; CANCHO-GRANDE, B.; BATTINO, M.; SIMAL-GÁNDARA, J. Bioaccessibility and potential bioavailability of phenolic compounds from achenes as a new target for strawberry breeding programs. **Food Chemistry**, v. 248, p. 155-165, 2018. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.11.105.

ARIZA, M.T.; REBOREDO-RODRÍGUEZ, P.; MAZZONI, L.; FORBES-HERNÁNDEZ, T.Y.; GIAMPIERI, F.; AFRIN, S.; GASPARRINI, M.; SORIA, C.; MARTÍNEZ-FERRI, E.; BATTINO, M.; MEZZETTI, B. Strawberry Achenes Are an Important Source of Bioactive Compounds for Human Health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 7, p. 1103, 2016. DOI: 10.3390/ijms17071103.

BECKERS, B.; OP DE BEECK, M.; THIJS, S.; TRUYENS, S.; WEYENS, N.; BOERJAN, W.; VANGRONSVELD, J. Performance of 16S rDNA Primer Pairs in the Study of Rhizosphere and Endosphere Bacterial Microbiomes in Metabarcoding Studies. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 650, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00650.

BLANCO, E. et al. **Selección de un consorcio microbiano promotor del crecimiento de plántulas de cebolla en condiciones de umbráculo** [Selection of a growth promoter microbial consortium in onion seedlings under shade-house conditions]. v. 38, p. 301–321, 1 abr. 2021.

BOXUS, P. H. The production of strawberry plants by *in vitro* micro-propagation. **Journal of Horticultural Science**, v. 49, n. 3, p. 209–210, 1 jan. 1974.

BOXUS, P. Micropropagation of Strawberry via Axillary Shoot Proliferation. Em: HALL, R. D. (Ed.). **Plant Cell Culture Protocols**. Methods In Molecular Biology™. Totowa, NJ: Humana Press, 1999. p. 103–114.

CALLAHAN, B. J.; McMURDIE, P. J.; ROSEN, M. J.; HAN, A. W.; JOHNSON, A. J. A.; HOLMES, S. P. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, p. 581–583, 2016. DOI: 10.1038/nmeth.3869.

CHAMAM, A. et al. Plant metabolite profiling evidences the effect of *Azospirillum brasilense* on the primary and secondary metabolism of rice. **Phytochemistry**, v. 87, p. 65-77, 2013. DOI: 10.1016/j.phytochem.2012.11.009.

CHANG, C. C. et al. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, n. 3, p. 178-182, 2002.

CHAO, A.; CHIU, C. H.; JOST, L. Unifying species diversity, phylogenetic diversity, functional diversity, and related similarity and differentiation measures through Hill numbers. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 45, p. 297–324, 2014.

CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, v. 41, n. 3, p. 252-263, 2001. DOI: 10.1007/s002480000087.

DE ANDRADE, F. M. et al. Beneficial effects of inoculation of growth-promoting bacteria in strawberry. **Microbiological Research**, v. 223–225, p. 120–128, 2019.

DEL ROSARIO ESPINOZA-MELLADO, M. et al. Chapter 3 - Biotization and *in vitro* plant cell cultures: plant endophyte strategy in response to heavy metals knowledge in assisted phytoremediation. Em: KUMAR, A. et al. (Eds.). **Microbe Mediated Remediation of Environmental Contaminants**. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology

and Nutrition. Woodhead Publishing, 2021. p. 27–36.

DI RIENZO, J. A., CASANOVES, F., BALZARINI, M. G., GONZALEZ, L., TABLADA, M., & ROBLEDO, C. W. (2020). **InfoStat versión 2018**. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.

DIAS, ACF.; COSTA, FEC.; ANDREOTE, FD.; LACAVA, PT.; TEIXEIRA, MA, ASSUMPÇÃO LC, ARAÚJO WL, AZEVEDO JL & MELO IS. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 25: 189-195. 2009.

ESPOSITO, E. Challenges and perspectives in *in vitro* plant cultivation. **Botanical Review**, v. 87, p. 145-158, 2021.

ESPOSITO-POLESI, N. P.; ABREU-TARAZI, M. F.; ALMEIDA, C. V.; TSAI, S. M.; ALMEIDA, M. Investigation of endophytic bacterial community in supposedly axenic cultures of pineapple and orchids with evidence on abundant intracellular bacteria. **Current Microbiology**, v. 74, p. 103-113, 2017.

ESPOSITO-POLESI, N. P.; ANDRADE, P. A. M.; ALMEIDA, C. V.; ANDREOTE, F. D.; ALMEIDA, M. Endophytic bacterial communities associated with two explant sources of *Eucalyptus benthamii* Maiden & Cambage. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 1737-1746, 2015.

ESPOSITO-POLESI, NATALIA PIMENTEL. Contaminação versus manifestação endofítica: implicações no cultivo *in vitro* de plantas. **Rodriguésia**. v. 71 e00562018. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/2175-7860202071072>>. Epub 06 Jul 2020. ISSN 2175-7860.

FERREIRA, D. F. **Sisvar: sistema de análise de variância**. Versão 5.8 [software]. Lavras: UFLA, 2023.

FIERASCU, R. C. et al. Fragaria Genus: Chemical Composition and Biological Activities. **Molecules**, v. 25, n. 3, p. 498, 23 jan. 2020.

FIERASCU, R. C.; et al. Bioactive compounds in strawberry and their beneficial effects on health. **Journal of Food Chemistry**, v. 12, p. 89-98, 2020.

FOUDA, A. et al. Plant growth-promoting endophytic bacterial community inhabiting the leaves of *Pulicaria incisa* (Lam.) DC inherent to arid regions. **Plants**, 2021.

FOUDA, A.; HASSAN, S.; EID, A. M.; EL-DIN EWAI, E. The interaction between plants and bacterial endophytes under salinity stress. In: **Endophytes and Secondary Metabolites**. Cham: Springer, 2019. p. 1–18.

FLORES-FÉLIX, J. D. et al. *Rhizobium* and *Phyllobacterium* bacterial inoculants increase bioactive compounds and quality of strawberries cultivated in field conditions. **Food Research International (Ottawa, Ont.)**, v. 111, p. 416–422, set. 2018.

GAO, J. L.; SUN, P.; WANG, X. M.; et al. *Microbacterium zeae* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from maize stem. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 110, p. 697–704, 2017.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa-SPI/Embrapa –SNPH, 1998. v. 1, p. 183 - 260.

GOLLE, D. P.; REINIGER, L. R. S.; CURTI, A. R.; LEÓN, E. A. B. Estabelecimento e desenvolvimento *in vitro* de *Eugenia involucrata* DC.: influência do tipo de explante e do meio nutritivo. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 22, n. 1, p. 207–214, 2012.

HALDAR, S.; SENGUPTA, S. Plant–microbe cross-talk in the rhizosphere: insight and biotechnological potential. **Open Microbiology Journal**, v. 9, p. 1, 2015. DOI: <https://doi.org/10.2174/1874285801509010001>.

HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; BERENDSEN, R. L.; VAN ELSAS, J. D. Dynamics of Seed-Borne Rice Endophytes: Composition, Functioning and Beneficial Aspects. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 631, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00631>.

HARDOIM, P.R.; VAN, OVERBEEK, L.S.; BERG, G.; PIRTTILÄ, A.M.; COMPANT, S.; CAMPISANO, A.; DÖRING, M.; SESSITSCH, A. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 79, 293–320. 2015.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **Circular. California Agricultural Experiment Station**, v. 347, n. 2nd edit, 1950.

JANSSON JK, BAKER ES. A multi-omic future for microbiome studies. **Nat Microbiol.** 26: 16049. 2016.

KNIGHTS, H. E.; JORRIN, B.; HASKETT, T. L.; POOLE, P. S. Deciphering bacterial mechanisms of root colonization. **Environmental Microbiology Reports**, v. 13, n. 4, p. 428–444, 2021.

KOSKIMÄKI, J. J.; et al. Diversity of bacterial endophytes in the roots of *Pogonatherum paniceum*. **Microbial Ecology**, v. 60, p. 347-356, 2010.

KOSKIMÄKI, J. J.; HANKALA, E.; SUORSA, M.; NYLUND, S.; PIRTTILÄ, A. M. Mycobacteria are hidden endophytes in the shoots of rock plant *Pogonatherum paniceum* (Poaceae). **Environmental Microbiology Reports**, v. 2, p. 619–624, 2010. DOI: [10.1111/j.1758-2229.2010.00197.x](https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00197.x).

KUŹNIAR, A.; WŁODARCZYK, K.; GRZĄDZIEL, J.; WOŹNIAK, M.; FURTAK, K.; GAŁĄZKA, A.; DZIADCZYK, E.; SKÓRZYŃSKA-POLIT, E.; WOLIŃSKA, A. New insight into the composition of wheat seed microbiota. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 13, p. 4634, 2020. DOI:

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 350-382, 1987. DOI: [10.1016/S0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(87)48036-1).

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Current Protocols in Food Analytical Chemistry. **Plant Physiology**, v. 140, p. 257-261, 2001.

SYLVIA, D. M.; JARSTFER, A. G. Plant growth and nutrition: the role of nutrient solutions. **Plant Biology and Soil Science**, v. 56, p. 100-105, 1992.

LUCERO, M. E.; UNC, A.; COOKE, P.; DOWD, S.; SUN, S. Endophyte microbiome diversity in micropropagated *Atriplex canescens* and *Atriplex torreyi* var. *griffithsii*. **PLoS ONE**, v. 6, e17693, 2011.

LUTI, K. J.; MAVITUNA, F. Elicitation of *Streptomyces coelicolor* with dead cells of *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* in a bioreactor increases production of undecylprodigiosin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 461–466, 2011.

LUTI, S.; MAVITUNA, F. Elicitation of secondary metabolite production by plant endophytes. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 106, p. 173-180, 2011.

MARTINS, J. et al. A baseline of *Arbutus unedo* L. microbiome for future research: *In vitro* versus ex vitro. **Scientia Horticulturae**, v. 292, p. 110657, 2022.

MHLONGO, M. I. et al. Metabolic profiling of PGPR-treated tomato plants reveals priming-related reprogramming of the phenylpropanoid pathway and improved oxidative stress tolerance. **Metabolites**, v. 10, n. 5, p. 210, 2020. DOI: 10.3390/metabo10050210.

MIOTTO-VILANOVA, L. et al. Impact of Paraburkholderia phytofirmans PsJN on grapevine secondary metabolism. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 22, p. 5775, 2019. DOI: 10.3390/ijms20225775.

McMURDIE, P. J.; HOLMES, S. Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **PLoS One**, v. 8, e617, 2013.

MEMARI-TABRIZI, E. F.; YOUSEFPOUR-DOKHANIEH, A.; BABASHPOUR-ASI, M. Foliar-applied silicon nanoparticles mitigate cadmium stress through physio-chemical changes to improve growth, antioxidant capacity, and essential oil profile of summer savory (*Satureja hortensis* L.). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 165, p. 71-79, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.04.040>.

MEZZETTI B, GIAMPIERI F, ZHANG Y-T, ZHONG C-F. Status of strawberry breeding programs and cultivation systems. **Journal of Berry Research**. v 8, n. p.205–221. 2018. <https://doi.org/10.3233/JBR-180314>

MORAIS, M. C. et al. Potential of *Pedobacter* sp. as an effective biofertilizer in strawberry plants: Improvement in yield and fruit quality. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, p. 5517–5524, 2019. DOI: 10.1002/jsfa.9773.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, jul. 1962.

ORLIKOWSKA, T.; NOWAK, K.; REED, B. Bacteria in the plant tissue culture environment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 128, p. 487-508, 2017.

PEDRAZA, R. O. et al. Chapter 6 - Azospirillum. Em: AMARESAN, N. et al. (Eds.). **Beneficial Microbes in Agro-Ecology**. [s.l.] Academic Press, 2020. p. 73–105.

PTAK, A.; MORANŃSKA, E.; WARCHOŁ, M.; et al. Endophytic bacteria from *in vitro* culture of *Leucojum aestivum* L. a new source of galanthamine and elicitor of alkaloid biosynthesis. **Scientific Reports**, v. 12, p. 13700, 2022.

QIU, Z. et al. Plant microbiomes: do different preservation approaches and primer sets alter our capacity to assess microbial diversity and community composition? **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 993, 2020. DOI: 10.3389/fpls.2020.00993.

QUAMBUSCH, M.; PIRTTILA, A. M.; TEJESVI, M. V.; WINKELMANN, T.; BARTSCH, M. Endophytic bacteria in plant tissue culture: differences between easy- and difficult-to-propagate *Prunus avium* genotypes. **Tree Physiology**, v. 34, p. 524–533, 2014. DOI: 10.1093/treephys/tpu027.

QUAMBUSCH, M.; WINKELMANN, T. Bacterial Endophytes in Micropropagated Plants. **Journal of Plant Science**, v. 234, p. 112–123, 2018.

QUAMBUSCH, M.; WINKELMANN, T. Bacterial endophytes in plant tissue culture: mode of action, detection, and control. In: LOYOLA-VARGA, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. (Eds.). **Plant cell culture protocols**. New York: Springer Science+Business Media, 2018. p. 69–88.

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; PEPLIES, J.; GLÖCKNER, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. D590–D596, 2013.

READ, P.; PREECE, J. Cloning: Plants - Micropropagation/Tissue Culture. Em: **Encyclopedia of Agriculture and Food Systems**. 2014 p. 317–336.

SALOTTI, A. H.; YARTE, M. E.; LARRABURU, E. E. Biotização com bactérias promotoras do crescimento vegetal na micropropagação de *Jacaranda mimosifolia*. **Trees**, v. 37, p. 1757–1765, 2023.

SANGIORGIO, D.; CELLINI, A.; DONATI, I.; FERRARI, E.; TANUNCHAI, B.; FAREED MOHAMED WAHDAN, S.; SADUBSARN, D.; FARNETI, B.; CHECCUCCI, A.; BUSCOT, F.; SPINELLI, F.; PURAHONG, W. Taxonomical and functional composition of strawberry microbiome is genotype-dependent. **Journal of Advanced Research**, v. 42, p. 189–204, dez. 2022. DOI: 10.1016/j.jare.2022.02.009.

SIMIRGIOTIS, M. J. et al. Cytotoxic chalcones and antioxidants from the fruits of *Syzygium samarangense* (Wax Jambu). **Food Chemistry**, v. 107, n. 2, p. 813–819, mar. 2008.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144–158, 1965.

SONI, R.; KEHARIA, H. Phytostimulation and biocontrol potential of Gram-positive endospore-forming *Bacilli*. **Planta**, v. 254, n. 3, p. 49, 12 ago. 2021.

SONG, X.; WU, H.; YIN, Z.; LIAN, M.; YIN, C. Endophytic bacteria isolated from *Panax ginseng* improves ginsenoside accumulation in adventitious ginseng root culture. **Molecules**, v. 22, p. 1–12, 2017.

SOUMARE, A.; BACHIRI, S.; LARBI, K. Biotização de plântulas e estratégias de aclimatização. **Plant Biotechnology**, v. 29, p. 203-214, 2021.

UMAMAHESWARI, T.; ANBUKKARASI, K.; HEMALATHA, T.; CHENDRAYAN, K. Studies on phytohormone producing ability of indigenous endophytic bacteria isolated from tropical legume crops. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 2, p. 127–136, 2013.

WALITANG, D. I.; KIM, K.; MADHAIYAN, M.; et al. Characterizing endophytic competence and plant growth promotion of bacterial endophytes inhabiting the seed endosphere of Rice. **BMC Microbiology**, v. 17, p. 209, 2017.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta pesquisa, foi possível estabelecer um protocolo eficiente de biotização *in vitro* de microplantas de morangueiro, permitindo a seleção de três gêneros bacterianos promissores: *Azospirillum*, *Bacillus* e *Rhizobium*. Além disso, foram identificadas as melhores combinações em consórcios bacterianos durante o processo de biotização *in vitro*, que demonstraram efeitos benéficos nos parâmetros de promoção do crescimento vegetal. Esses consórcios bacterianos também influenciaram positivamente a modulação do conteúdo de fenóis e flavonoides em determinados tratamentos, mostrando seu potencial como bioestimulantes. Ademais, a biotização com as BPCV (Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal) foi eficaz na preparação das microplantas para condições *ex vitro*, destacando sua aplicabilidade prática no cultivo de morangueiro s. A caracterização bioquímica das BPCV revelou diversas propriedades importantes das cepas bacterianas utilizadas, evidenciando a necessidade de uma seleção criteriosa das cepas com base em suas características biofuncionais, como solubilização de nutrientes e produção de compostos bioativos. Esses resultados reforçam a relevância das BPCV como ferramentas biotecnológicas para o desenvolvimento de práticas agrícolas mais sustentáveis e eficientes. Além disso, na cultivar San Andreas, o estudo metataxonômico permitiu observar a dinâmica da comunidade bacteriana endofítica presente na planta-mãe e nas plântulas ao longo das gerações de cultivo *in vitro* (G0, G5 e G10). Os resultados demonstraram que, a partir da G0, os gêneros bacterianos presentes na microbiota endofítica bacteriana começaram a diminuir, evidenciando que o processo de micropropagação *in vitro* pode influenciar na composição e montagem do microbioma sob essas condições. Este achado é fundamental para compreender as interações planta-microrganismo em sistemas de cultura de tecidos vegetais e para o desenvolvimento de estratégias que minimizem os impactos negativos no microbioma endofítico durante o cultivo *in vitro*. Portanto, este trabalho contribui significativamente para o avanço do conhecimento sobre a interação planta-microrganismo no cultivo de morangueiros, fornecendo bases científicas sólidas para a aplicação de BPCV na micropropagação e propondo alternativas sustentáveis para a produção agrícola. Os resultados obtidos reforçam o papel das BPCV como bioinoculantes promissores e a importância de estratégias que preservem a microbiota endofítica durante o cultivo *in vitro*, com impactos positivos tanto na pesquisa científica quanto na prática agrícola.