



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA DA REDE BIONORTE



POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO E CONTROLE DE BACTÉRIAS
ENDOFÍTICAS ISOLADAS DA MICROPROPAGAÇÃO DE CAMU-
CAMU [*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh]

HOSANA CAROLINA DOS SANTOS BARRETO

Boa Vista – RR

Abril, 2023

HOSANA CAROLINA DOS SANTOS BARRETO

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO E CONTROLE DE BACTÉRIAS
ENDOFÍTICAS ISOLADAS DA MICROPROPAGAÇÃO DE CAMU-
CAMU [*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh]**

Tese de doutorado apresentada ao curso de doutorado do programa de pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal de Roraima, como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Edvan Alves Chagas
Co-Orientador: Prof. Dr. Antonio Alves de Melo Filho
Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Kedma da Silva Matos

Boa Vista – RR

Abril, 2023

Dados Internacionais de Catalogação na publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Roraima

B273p Barreto, Hosana Carolina dos Santos.
Potencial biotecnológico e controle de bactérias endofíticas isoladas da micropropagação de caçari [*Myrciaria dúbia* (Kunth) Mc Vaugh] / Hosana Carolina dos Santos Barreto. – Boa Vista, 2023.
121 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Edvan Alves Chagas.

Coorientador: Prof. Dr. Antonio Alves de Melo Filho.

Coorientadora: Profa. Dra. Kedma da Silva Matos.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Roraima, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE.

1 – Camu-camu. 2 – Bactérias promotoras de crescimento. 3 – Cultura de tecidos. 4 – Óleos essenciais. 5 – Antibióticos. I – Título. II – Chagas, Edvan Alves (orientador). III – Melo Filho, Antonio Alves de (coorientador). IV – Matos, Kedma da Silva (coorientadora).

CDU – 574.913

HOSANA CAROLINA DOS SANTOS BARRETO

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO E CONTROLE DE BACTÉRIAS
ENDOFÍTICAS ISOLADAS DA MICROPROPAGAÇÃO DE CAÇARI**
[*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh]

Tese de doutorado apresentada ao curso de doutorado do programa de pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal de Roraima, como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Biodiversidade e Biotecnologia.

Aprovada em: 20/04/2023

Banca Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 EDVAN ALVES CHAGAS
Data: 24/07/2023 08:40:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Pesq. Dr. Edvan Alves Chagas
Embrapa Roraima

Documento assinado digitalmente
 DANIEL AUGUSTO SCHURT
Data: 24/07/2023 12:19:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Pesq. Dr. Daniel Augusto Schurt
Embrapa Roraima

Documento assinado digitalmente
 FABIANA GRANJA
Data: 24/07/2023 18:38:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Fabiana Granja
Universidade Federal de Roraima



Firmado digitalmente por:
ABANTO RODRIGUEZ Carlos
FIR 40063612 hard
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 19/07/2023 12:34:18-0500

Pesq. Dr. Carlos Abanto Rodriguez
Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana

MONTERO
FERNANDEZ ISMAEL
28972395P

Assinado de forma digital por
MONTERO FERNANDEZ ISMAEL -
28972395P
Dados: 2023.07.20 01:23:17 +0200

Prof. Dr. Ismael Montero Fernández
Universidade de Extremadura Espanha

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, meu Rochedo e meu Refúgio; a meu esposo Aron e a meus filhos Ana Carolina e Samuel, que não apenas suportaram minha ausência e angústias durante a realização deste estudo, como também foram meu oásis de amor e paz na travessia desse deserto.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu guia, minha força.

A meu esposo, meu grande amor e meu parceiro neste e em todos os projetos que me engajei.

A meus filhos, que foram como brisa refrescante após cada dia de árduo trabalho.

A meus pais, meus “paístores”, por me ensinarem que o caminho da perseverança é árduo mais é recompensador.

A minha sogra, por sua incansável ajuda e por todo seu cuidado comigo.

A meus irmãos, Rebeca e Gildo Júnior, e a Ricardo, pelas correções e orientações na Tese.

Ao meu orientador Pesq. Dr. Edvan Alves Chagas, por toda orientação, paciência e apoio, e por suas sábias palavras sempre me adicionarem bons conselhos.

Aos meus coorientadores Prof. Dr. Antônio Alves de Melo Filho e Profa. Dra. Kedma Matos, por toda orientação e apoio nessa longa trajetória.

À Dra. Nilma, pela amizade e pelos conhecimentos compartilhados, e por todo apoio e incentivo.

Aos alunos de iniciação científica e estágio, especialmente Deila, Carol, Bilove, Jéssica e Bruna.

Sem vocês o que seria de mim para realização deste trabalho? Com vocês aprendi muito.

Aos novos amigos científicos, pelos momentos compartilhados em sala de aula ou no laboratório, pelos cafés, lanches e risadas, pois tudo isso tornou mais leve minha trajetória.

À Universidade Federal de Roraima, através do Programa de Pós Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal – Bionorte.

À Embrapa Roraima pelo suporte à realização desta pesquisa, sobretudo a Eliane, por todo apoio e conhecimentos compartilhados.

À Embrapa Amazônia Ocidental, especialmente ao Dr. Gilvan pelo apoio na realização do sequenciamento das amostras.

Aos colegas de trabalho, especialmente Ana Paula, Simone, e a Gabrielle que chegou para aquecer meu coração, gratidão pelas risadas e bons momentos compartilhados.

A meus irmãos em Cristo, que oraram e intercederam por mim, para conclusão de mais essa etapa profissional.

A Valessa, amiga e discípula, obrigada por sempre me animar e por se preocupar comigo e com minha família.

Aos amigos que a vida uniu e que de alguma forma contribuíram para execução deste trabalho, meu muitíssimo OBRIGADA!

“Grandes coisas fez o Senhor por nós, por isso estamos alegres.” (Salmos 126.3)

IDENTIFICAÇÃO, POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO E CONTROLE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DA MICROPROPAGAÇÃO DE CAMU-CAMU [*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh.]

RESUMO

O presente estudo permitiu observar a diversidade de bactérias presentes no camu-camu, com um total de 40 isolados provenientes da cultura de tecidos da espécie. Com base no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA foram identificados os gêneros *Erwinia*, *Micrococcus*, *Enterobacter*, *Microbacterium*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Stenotrophomonas*, *Brevundimonas* e *Methylobacterium*. Trinta e quatro isolados bacterianos apresentaram produção de ácido indol acético (AIA) *in vitro*, sendo maior produção de 15,39 $\mu\text{g L}^{-1}$ obtida pelo isolado 18 L. Todos os isolados foram positivos para solubilização de fosfato de alumínio, destacando-se 18C que solubilizou 75,8% do fosfato disponibilizado *in vitro*. A solubilização de fosfato de cálcio em meio sólido foi detectada em sete isolados, e variou entre baixa e média capacidade de solubilização. A análise de produção de sideróforos foi detectada em 38 isolados, e teve como destaque isolados com produção de 93,82% de unidades de sideróforos (PSU). A análise para identificação das linhagens com potencial para fixação de nitrogênio em plantas não identificou presença do gene *nifH* em nenhum dos isolados analisados pelo método empregado. A utilização de óleos essenciais permitiu redução na taxa de contaminação *in vitro* na cultura de tecidos, sendo observado que a partir da concentração de 2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ não houve contaminantes fúngicos e teve uma redução significativa da taxa de contaminação bacteriana, à exceção de óleo essencial de gengibre que apresentou contaminação expressiva em todas as concentrações analisadas. Em ordem inversa à redução no crescimento microbiano *in vitro*, percebe-se o aumento da oxidação dos explantes à medida que aumentam as concentrações, tendo os óleos de citronela e orégano apresentado potencial fitotóxico desde as mais baixas concentrações. Foi observada a taxa de brotação dos explantes na presença dos óleos essenciais de orégano (25%), alecrim (35%) e melaleuca (70%). Os antibióticos Ceftriaxona, Cefalexina e Rifampicina, promoveram maior halo de inibição no teste de difusão em disco de papel, indicando maior efetividade. Na análise de concentração mínima inibitória, a Cefalexina isolada apresentou menor controle no crescimento bacteriano e a combinação dos antibióticos Cefalexina, Ceftriaxona e Rifampicina resultou no melhor controle das cepas bacterianas assim como a Ceftriaxona. Este trabalho permitiu a seleção de linhagens promotoras do crescimento de plantas com base em bactérias isoladas da cultura de tecidos de camu-camu, o que poderá permitir o futuro desenvolvimento de biofertilizantes visando a redução dos fertilizantes químicos utilizados na agricultura moderna, assim como também identificou agentes antimicrobianos que podem favorecer à micropropagação *in vitro* de camu-camu.

Palavras-chave: Camu-camu; Bactérias Promotoras de Crescimento; Cultura de tecidos; Óleos essenciais; Antibióticos.

IDENTIFICATION, BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL AND CONTROL OF ENDOPHYTIC BACTERIA ISOLATED FROM MICROPROPAGATION OF CAMU-CAMU [*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh]

ABSTRACT

The present study allowed observing the diversity of bacteria present in camu-camu, with a total of 40 isolates from tissue culture of the species. Based on the partial sequencing of the 16S rRNA gene, the genera *Erwinia*, *Micrococcus*, *Enterobacter*, *Microbacterium*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Stenotrophomonas*, *Brevundimonas* and *Methylobacterium* were identified. Thirty-four bacterial isolates showed *in vitro* indole acetic acid (IAA) production, with the highest production of 15.39 $\mu\text{g L}^{-1}$ obtained by the 18 L isolate. All isolates were positive for aluminum phosphate solubilization, with emphasis on 18C, which solubilized 75.8% of the phosphate available *in vitro*. Calcium phosphate solubilization in solid medium was detected in seven isolates, and varied between low and medium solubilization capacity. The analysis of siderophore production was detected in 38 isolates, and highlighted isolates with production of 93.82% of siderophore units (PSU). The analysis to identify strains with potential for nitrogen fixation in plants did not identify the presence of the *nifH* gene in any of the isolates analyzed by the method employed. The use of essential oils allowed a reduction in the *in vitro* contamination rate in tissue culture, and it was observed that from the concentration of 2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ there were no fungal contaminants and there was a significant reduction in the rate of bacterial contamination, with the exception of oil ginger essential oil that showed significant contamination in all analyzed concentrations. In reverse order to the reduction *in vitro* microbial growth, an increase in explant oxidation is observed as concentrations increase, with citronella and oregano oils presenting phytotoxic potential from the lowest concentrations. The sprouting rate of the explants was observed in the presence of the essential oils of oregano (25%), rosemary (35%) and tea tree (70%). The antibiotics Ceftriaxone, Cephalexin and Rifampicin promoted a greater zone of inhibition in the paper disk diffusion test, indicating greater effectiveness. In the analysis of minimum inhibitory concentration, Cephalexin alone showed less control of bacterial growth and the combination of antibiotics Cephalexin, Ceftriaxone and Rifampicin resulted in better control of bacterial strains as well as Ceftriaxone. This work allowed the selection of plant growth-promoting strains based on bacteria isolated from camu-camu tissue culture, which could allow the future development of biofertilizers aimed at reducing chemical fertilizers used in modern agriculture, as well as identifying antimicrobial agents that may favor the *in vitro* micropropagation of camu-camu.

Keywords: camu-camu; Growth Promoting Bacteria; Tissue culture; Essential oils; Antibiotics.

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I:

- Figura 1.** Curva de Calibração de Solução Padrão de AIA Sintético45
- Figura 2.** Curva de Calibração de Solução Padrão de Fosfato Sintético46
- Figura 3.** Crescimento do explante na presença de manifestação bacteriana: (A) Presença de bactéria de coloração creme; (E) Presença de bactéria de coloração amarela; (F) Presença de bactéria de coloração rosa opaco e amarela transparente.49
- Figura 4.** Isolados bacterianos da cultura de tecidos de camu-camu. (A) Morfotipo 18E; (B) Morfotipo 18D; (C) Morfotipo 18O; (D) Morfotipo 15A; (E) Morfotipo 18N; (F) Morfotipo 18L.....50
- Figura 5.** Produção de AIA (A), Solubilização de Fosfato (B) e Produção de Sideróforos (C) observada em isolados bacterianos obtidos da micropropagação de camu-camu.* **Erro! Indicador não definido.**

CAPITULO II:

- Figura 1.** Esquema do método de Difusão em Discos de Papel 70
- Figura 2.** Atividade antimicrobiana e oxidação de óleos essenciais na cultura de tecidos de camu-camu 75
- Figura 3.** Avaliação do efeito fitotóxico dos óleos essenciais sobre o explante na cultura de tecidos de camu-camu. (A) Explante de camu-camu sob efeito de óleo essencial de alho; (B) Explante de camu-camu sob efeito de óleo essencial de citronela 78

CAPITULO III:

- Figura 1.** Esquema do método de Difusão em Discos de Papel 87
- Figura 2.** Esquema para identificação de concentração mínima inibitória de óleos essenciais 45
- Figura 3.** Análise da Concentração Mínima Inibitória de óleos essenciais no controle de isolados bacterianos de cultura de tecidos de camu-camu94
- Figura 4.** Ação dos óleos essenciais na cultura de tecidos de camu-camu segundo ação Oxidação.....96

CAPITULO IV:

- Figura 1.** Segmentos caulinares de camu-camu (A), Processo de desinfestação dos explantes em solução fungicida Nativa® (B), Explantes de camu-camu após assepsia (C). 1024
- Figura 2.** Esquema do método de Difusão em Discos de Papel 104
- Figura 3.** Esquema para identificação de concentração mínima inibitória de antibióticos . 1067
- Figura 4.** Manifestação bacteriana no estabelecimento *in vitro* de camu-camu: (A) Manifestação bacteriana com aspecto branco leitoso; (B) Manifestação mista, bacteriana e fúngica, bactéria de aspecto amarela opaco; (C) Manifestação bacteriana de aspecto rosa transparente. (D) Contaminação fúngica 109
- Figura 5.** Uso de antibióticos por difusão em disco sobre bactérias isoladas da cultura de tecidos de camu-camu. (A) Placa de Petri logo após a inoculação. (B) Placa de Petri após 24h da inoculação, com halos de inibição formados. 109
- Figura 6.** Avaliação da concentração mínima inibitória de antibióticos pelo microdiluição em caldo em bactérias isoladas da cultura de tecidos de camu-camu. 112
- Figura 7.** Análise da Concentração Mínima Inibitória em isolados bacterianos de cultura de tecidos de camu-camu. 113

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I:

Tabela 1. Contaminação e oxidação de explantes de clones superiores de camu-camu na fase de estabelecimento <i>in vitro</i>	48
Tabela 2. Valores de similaridade de sequências de 16S rRNA das bactérias endofíticas da cultura de tecidos de camu-camu	50
Tabela 3. Produção de AIA e Sideróforos, e Solubilização de Fosfato de Cálcio e Alumínio observada em isolados bacterianos da micropropagação de camu-camu*	54

CAPITULO II:

Tabela 1. Plantas utilizadas para extração dos óleos essenciais	70
Tabela 2. Ação bactericida de óleos essenciais em bactérias isoladas da cultura de tecidos de camu-camu, pelo método de difusão por perfuração em ágar*	74

CAPITULO III:

Tabela 1. Ação bactericida de óleos essenciais em bactérias isoladas da cultura de tecidos de camu-camu, pelo método de difusão por perfuração em ágar*	91
Tabela 2. Ação bactericida de óleos essenciais em bactérias isoladas da cultura de tecidos de camu-camu, pelo método de microdiluição em caldo	93
Tabela 3. Ação dos óleos essenciais sobre a cultura de tecidos de camu-camu	95

CAPITULO IV:

Tabela 1. Contaminação fúngica, bacteriana e porcentagem de oxidação em explantes de camu-camu na fase de estabelecimento <i>in vitro</i>	108
Tabela 2. Caracterização do morfotipo e identificação das colônias bacterianas isoladas da cultura de tecidos de camu-camu	109
Tabela 3. Ação de antibióticos pelo método de difusão em disco em bactérias isoladas da micropropagação de camu-camu*	112
Tabela 4. Avaliação da densidade microbiana (nm) sob diferentes antibióticos pelo método de microdiluição em caldo*	114

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	
2.1 OBJETIVO GERAL	
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	
3 REFERENCIAL TEÓRICO	
3.1 POTENCIAL DA FRUTICULTURA DA AMAZÔNIA.....	15
3.2 PRINCIPAIS TÉCNICAS DE PROPAGAÇÃO DO CAMU-CAMU.....	16
3.2.1 Características do Cultivo <i>in vitro</i> do camu-camu	17
3.2.2 Contaminação microbiana na Propagação <i>in vitro</i>	18
3.3 CONTROLE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NO CULTIVO <i>IN VITRO</i>	20
3.3.1 Uso de antibióticos na cultura de tecidos	20
3.3.2 Uso de Óleos Essenciais na cultura de tecidos	21
3.3.3 Identificação e controle de microrganismos contaminantes da cultura de tecidos	22
3.4 MICRORGANISMOS BACTERIANOS NA CULTURA DE TECIDOS DE CAMU-CAMU.....	23
3.4.1 Potencial Biotecnológico dos Endofíticos Bacterianos	25
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
CAPÍTULO I: POTENCIAL DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS À MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Myrciaria dubia</i> (Kunth) McVaugh NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS.....	37
Resumo	37
Abstract.....	37
INTRODUÇÃO	38
MATERIAL E MÉTODOS	40
RESULTADOS E DISCUSSÕES	46
CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
CAPÍTULO II: ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS CONDIMENTARES E MEDICINAIS NO CONTROLE DE CONTAMINANTES DA MICROPROPAGAÇÃO DE <i>MYRCIARIA DUBIA</i>.....	65
RESUMO.....	65
ABSTRACT	65
INTRODUÇÃO	66
MATERIAIS E MÉTODOS.....	68
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
CONCLUSÕES.....	77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
CAPÍTULO III: USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS CONDIMENTARES E MEDICINAIS NO CONTROLE DE BACTÉRIAS ISOLADAS DA CULTURA DE TECIDOS DE CAMU-CAMU (<i>Myrciaria dubia</i> (Kunth) McVaugh)	83
Resumo	83
MATERIAL E MÉTODOS	85
RESULTADOS E DISCUSSÕES	89
CONCLUSÕES	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
CAPÍTULO IV: USO DE ANTIBIÓTICOS NO CONTROLE DE BACTÉRIAS ISOLADAS DA MICROPROPAGAÇÃO DE <i>Myrciaria dubia</i> (Kunth) McVaugh.	99
Resumo	99
Abstract.....	99

INTRODUÇÃO	100
MATERIAL E MÉTODOS	101
RESULTADOS E DISCUSSÕES	105
CONCLUSÕES	113
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114
CONCLUSÃO	119
ANEXO	120

1. INTRODUÇÃO

O camu-camu [*Myrciaria dubia* (KUNTH) MCVAUGH] é uma fruta silvestre que cresce nas margens inundáveis dos rios e lagos de toda a bacia Amazônica, seus frutos de coloração rosa a roxo escuro são de grande interesse comercial por seu potencial nutricional, agroindustrial e farmacológico, tais como: elevadas concentrações de ácido ascórbico; compostos minerais como o potássio, cálcio, magnésio e sódio; e compostos fenólicos (elágino, antocianinas e flavonoides). A espécie chama atenção por sua atividade antioxidante, capaz de minimizar o risco de incidência de algumas doenças crônicas, o que permite inserir na lista de alimentos funcionais (PETERS; VÁSQUEZ, 1986; VILLACHICA, 1996; YUYAMA et al., 2011; SOUSA et al., 2015; CHAGAS et al., 2015; NASCIMENTO e SILVA, 2021; GRIGIO et al., 2020).

Também conhecido como caçari, a espécie silvestre está em processo de domesticação e já apresenta importante exploração comercial, tendo o Peru como o pioneiro nos estudos sobre seu cultivo (PINEDO et al., 2010).

A propagação seminífera é a principal técnica empregada na produção de mudas de camu-camu, e devido à alta variabilidade genética das plantas, o que limita a produção uniforme nos pomares comerciais, essa técnica é geralmente usada na produção de porta enxertos para clones superiores da espécie (SILVA; RODRIGUES; SCARPARE FILHO, 2011). A propagação vegetativa, tem como destaque a produção de clones superiores da espécie em larga escala por meio das técnicas de estaquia e enxertia, e atualmente a propagação *in vitro* por organogênese e embriogênese (Araújo et al., 2021); (CHAGAS et al., 2012; SUGUINO et al., 2003).

Araújo et al. (2021) aponta a micropropagação como alternativa para o processo de formação de mudas de camu-camu, que com o uso de técnicas de cultivo *in vitro* como organogênese e embriogênese somática é possível a multiplicação em larga escala de plantas idênticas durante todo o ano.

A micropropagação do camu-camu, segundo Araújo et al. (2012), ainda apresenta dificuldades em obter culturas assépticas devido à alta taxa de contaminação microbiana que possui acelerado crescimento no meio de cultura, favorecendo à competição por nutrientes. O estudo indicou a necessidade de suplementação do meio com antibióticos, considerando que, mesmo após desinfestação, houve 70% de contaminação. O estudo também sugere que havia presença de bactérias endofíticas, que só foram detectadas no meio após semanas do estabelecimento *in vitro*.

É importante destacar, que grande parte desses microrganismos são endofíticos. Os microrganismos endofíticos desempenham funções importantes como fixação biológica de

nitrogênio, solubilização de fósforo, biorremediação, fitorremediação, produção de compostos bioativos de interesse farmacológico, e ainda, atuam estimulando o desenvolvimento vegetal (ESPOSITO-POLESI, 2011; KUSS et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2007).

A contaminação bacteriana na cultura de tecidos de camu-camu foi observada na etapa de estabelecimento *in vitro*, resultando na maioria das vezes na dificuldade de avanços na sua micropropagação, principalmente quando a planta-matriz se encontra em condições de campo (ARAÚJO et al., 2012).

Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivos isolar, identificar e caracterizar bactérias contaminantes na micropropagação de clones superiores de camu-camu, e também identificar a concentração mínima inibitória de antibióticos e óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais no controle desses contaminantes da cultura de tecidos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Objetivos isolar, identificar e caracterizar bactérias contaminantes na micropropagação de clones superiores de camu-camu, e também identificar a concentração mínima inibitória de antibióticos e óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais no controle desses contaminantes da cultura de tecidos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar bactérias provenientes do cultivo *in vitro* de camu-camu e avaliar seu potencial como promotoras de crescimento de plantas.
- Analisar a ação dos óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais no controle da contaminação microbiana e sobre a taxa de sobrevivência dos explantes na micropropagação de camu-camu.
- Analisar o comportamento *in vitro* de cinco clones de camu-camu quanto à contaminação microbiana e fitotoxidade, assim como a identificação e controle com antibióticos das bactérias isoladas da cultura.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 POTENCIAL DA FRUTICULTURA DA AMAZÔNIA

As frutas da Amazônia vêm ganhando espaço cada vez mais expressivo no agronegócio de frutas, como é o caso do Açaí e Cupuaçu, decorrem de uma demanda cada vez maior pela diversificação de sabores e de produtos com potencial funcional. A maioria das frutas nativas da Amazônia, no entanto, apesar do grande potencial, apresentam importância em nível regional apenas. Algumas frutas promissoras tendem a ganhar espaço nos próximos anos, além do Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e do Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.), como: Açaí-do-amazonas (*Euterpe precatória* Mart.), Abiu (*Pouteria caimito* (Ruiz et Pavon) Radlk), Bacuri (*Platonia insignis* Mart.), Camu-camu (*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh), pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth), muruci (*Byrsonima crassifolia* H.B.K.), araçá-boi (*Eugenia stipitata* McVaugh), o biribá (*Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill.), o tucumã-do-amazonas (*Astrocaryum aculeatum* G. Mey), o tucumã-do-pará (*Astrocaryum vulgare* Mart.) o uxi (*Endopleura uchi* (Huber) Cuatrecasas) e espécies de bacaba (*Oenocarpus* sp.) (CARVALHO, 2012; CLEMENT et al., 2008).

Clement et al. (2008) afirma que a maioria das frutas nativas da Amazônia ainda são desconhecidas fora da região, e que isso se deve em parte ao curto tempo de vida de prateleira das frutas *in natura* e de seus subprodutos, produzidos geralmente de forma artesanal. Luvielmo e Lamas (2012) esclarecem que as frutas, principalmente em regiões tropicais, sofrem com mudanças bioquímicas e fisiológicas e também com as práticas de acondicionamento e manuseio inadequadas, as quais culminam na aceleração da maturação e deterioração.

Não obstante, perante às dificuldades mencionadas, Clement et al. (2008) destacam que as frutas nativas da Amazônia apresentam qualidade e produtividade variável devido à propagação por sementes, e que por isso vários estudos têm sido realizados para a obtenção de mudas com uniformidade na qualidade, produtividade e rentabilidade dos frutos.

O camu-camu, também conhecido como caçari, é uma fruta nativa da Amazônia que tem despertado o interesse comercial devido à expressiva importância nutricional, concentrando altas doses de ácido ascórbico e minerais em seus frutos (NASCIMENTO e SILVA, 2021; CHAGAS et al., 2015; GRIGIO et al., 2021; YUTAMA, AGUIAR, YUYAMA, 2002).

Em Roraima o camu-camu tem recebido destaque devido à presença de altas concentrações de vitamina C, podendo destacar o estudo de Yutama, Aguiar e Yuyama (2002) que encontrou em amostras coletadas na Região Leste do Estado de Roraima concentrações que variaram entre 5.737 a 6.112 mg.100g de polpa e casca. De modo semelhante, Chagas et al.

(2015) e Grigio et al. (2021) encontraram nas amostras coletadas em Roraima uma concentração média de ácido ascórbico de 5838,78 g.100mg de polpa e casca de camu-camu, tendo destaque amostras da região do Baixo Rio Branco que apresentaram teor de 7.355 mg.100g de polpa e casca de camu-camu.

Oliveira (2015) ao investigar o impacto da suplementação do consumo do camu-camu liofilizado em pacientes portadores de obesidade, relatam a melhoria significativa da prática de atividade física da pressão arterial, dos triglicerídios, da circunferência abdominal e aumento de HDL-c dos participantes que receberam a suplementação em relação ao grupo controle.

A inserção do camu-camu à dieta também é relatada por Chagas et al. (2021), utilizando a farinha do fruto inteiro em substituição parcial à farinha de trigo no preparo de biscoitos. Os autores relatam a presença de 11 flavonóides nos biscoitos, independente dos tempos de secagem, aumentando assim o potencial antioxidante do alimento.

3.2 PRINCIPAIS TÉCNICAS DE PROPAGAÇÃO DO CAMU-CAMU

Naturalmente os vegetais se multiplicam pelos ciclos sexuado e assexuado. No primeiro temos a multiplicação a partir da união dos grãos de pólen com a oosfera, o qual irá gerar um embrião presente nas sementes. A nova planta gerada a partir dessa semente terá uma combinação genética diferente da planta matriz. No ciclo assexuado, também chamado de vegetativo, uma nova planta é gerada a partir de estruturas vegetativas da planta matriz, sem a ocorrência de recombinação genética, sendo, portanto, geneticamente igual à planta que lhe deu origem (SILVA; RODRIGUES; SCARPARE FILHO, 2011; CID, TEIXEIRA, 2014).

Apesar da propagação de mudas por sementes ser possível e amplamente utilizada em mudas de frutíferas, sabe-se, que as plantas não serão idênticas, e não haverá, portanto, uma garantia de qualidade tão pouco de uniformidade na produtividade e rentabilidade dos frutos (SILVA; RODRIGUES; SCARPARE FILHO, 2011). Por isso a necessidade da busca por alternativas como que possibilitem a qualidade das mudas, por ser um dos principais fatores que garantem o sucesso da produção de frutas.

Chagas et al. (2012) destacam as principais técnicas empregadas na propagação do camu-camu, como a propagação seminífera e vegetativa. A seminífera tem sido amplamente usada como porta enxerto de clones superiores de camu-camu (SUGUINO et al., 2003). A propagação vegetativa, tem como destaque as técnicas estaquia e enxertia, e mais recentemente a propagação *in vitro* por organogênese e embriogênese relatadas por Araújo et al. (2015), Araújo et al. (2016) e Araújo et al. (2021).

Segundo Cid e Teixeira (2014), apesar da enxertia ser comumente utilizada em algumas culturas, quanto ao nível comercial, a técnica é considerada cara e laboriosa, e ainda oferece

como desvantagens a incompatibilidade entre enxerto e porta-enxerto e a possibilidade de transmissão de doenças bacterianas, viróticas e vasculares entre o material vegetal utilizado.

A propagação por estaquia é uma técnica muito empregada na produção de mudas de frutíferas, a qual utiliza qualquer segmento da planta (ramo, raiz ou folha). As estacas são colocadas em meio adequado a fim de formar raízes adventícias e assim originar uma nova planta (FRAZON; CARPENEDO; SILVA, 2010). Apesar de ser uma técnica simples, econômica e prática, apresenta como desvantagem a necessidade de grande quantidade de material vegetativo e maior tempo para a formação de muda.

O cultivo *in vitro*, diferente das técnicas anteriormente mencionadas, permite a propagação vegetativa de clones superiores em larga escala em meio de cultura sintético sob condições controladas de temperatura, umidade e luminosidade contendo nutrientes e reguladores de crescimento, entre outros. Essa tem como vantagens a propagação de plantas de alto valor agroeconômico e de plantas com risco de extinção, podendo também ser utilizada para limpeza clonal de plantas, através da cultura de meristemas (CID, 2014; LAMEIRA et al., 2000).

3.2.1 Características do Cultivo *in vitro* do camu-camu

A cultura de tecidos possibilitou avanços na área de melhoramento vegetal, permitindo, entre outras, maiores vantagens competitivas aos países que a adotam e conseqüentemente o surgimento de demandas como genótipos, a rápida multiplicação clonal, plantas livres de doenças e independência de fatores sazonais permitindo também maior oferta de empregos (CARVALHO, VIDAL, 2003).

Diferente das práticas convencionais de propagação vegetativa, essa técnica permite produzir grandes estoques de plantas livres de patógenos, o que acaba por aumentar a produtividade no cultivo. Além do interesse comercial de produção em larga escala de plantas superiores, o uso da técnica também pode ser aplicada à conservação e utilização sustentável de espécies florestais nativas (BHANSALI; SINGH, 2000).

A micropropagação apresenta um alto potencial de aplicação para a multiplicação de genótipos de espécies frutíferas de interesse. Entre as diferentes técnicas empregadas na propagação de plantas frutíferas, a micropropagação possui inúmeras vantagens permitindo, entre outras, a utilização de explante, um segmento de tecido ou órgão vegetal, ou qualquer outro tecido que corresponda à capacidade de regeneração *in vitro*. O desenvolvimento de uma planta dependerá da interação de fatores internos, quanto às substâncias orgânicas e hormônios essenciais na regulação do crescimento, e de fatores externos como luz, temperatura e

fotoperíodo entre outros (CHAGAS et al., 2012; FACHINELLO; HOFFMANN; NACHTIGAL, 2005).

Apesar da micropropagação ser mais cara devido os custos com mão de obra especializada, laboratório e equipamentos, ela apresenta um custo-benefício melhor por possibilitar a produção em escala comercial de mudas selecionadas e uniforme, além de permitir realizar pesquisas de apoio às diferentes áreas da biologia, como a genética, fitopatologia e fisiologia vegetal (CID, TEIXEIRA, 2014).

A técnica de micropropagação consiste no aproveitamento da totipotência das células vegetais, ou seja, na capacidade das células vegetais darem origem a novas células, e estas a novas réplicas com características iguais à célula que a originou, sob condições apropriadas. Esse processo exige condições favoráveis ao seu desenvolvimento e poderá gerar réplicas a partir da organogênese, demonstrada na capacidade das novas células produzirem órgãos ou na embriogênese somática, pela capacidade das novas células gerarem embriões e estes originarem uma planta inteira (LAMEIRA et al., 2000).

Nem todos os explantes reagem da mesma forma, exigindo o desenvolvimento de protocolos diferenciados muitas vezes, e que a escolha deverá influenciar todo o processo, podendo resultar no sucesso ou fracasso. Diante disso os estudos de cultura de tecidos buscam conhecer quais explantes possuem maior potencial de desenvolvimento *in vitro*, considerando a finalidade desejada. Após a escolha, é importante avaliar os melhores meios de culturas a serem utilizados, o tipo de regulador de crescimento e sua concentração no meio, assim como a influência dos fatores externos nesse processo (CID; TEIXEIRA, 2014).

3.2.2 Contaminação microbiana na Propagação *in vitro*

As contaminações microbianas são apontadas como o principal problema encontrado na cultura de tecidos, pois, por se tratar de uma técnica associada à produção em larga escala, é desejável a obtenção de plantas axênicas durante todo o processo de produção (ESPOSITO-POLESI, 2017).

Cassells (1991) aponta que, a contaminação microbiana pode se originar de duas fontes: pela desinfestação ineficaz da superfície e dos tecidos dos explantes; ou por falhas durante o procedimento de subcultura seja da assepsia de ferramentas e equipamentos, meio de cultura ou do operador. Leifert e Cassells (2001) descreve que, muitas das contaminações são manifestações endofíticas e que apesar de não serem prejudiciais às plantas, elas podem competir com o explante em condições de propagação *in vitro*.

De modo semelhante, Costa, Sherwinski-Pereira e Otoni (2010) também discorrem que, apesar da grande maioria dos microrganismos contaminantes encontrados na micropropagação

de plantas não promoverem diretamente a morte dos materiais estabelecidos *in vitro*, muitos deles competem com as plantas pelos nutrientes do meio de cultura e também excretam substâncias comumente tóxicas.

Esposito-Polesi (2020) afirma que há uma atribuição arbitrária de contaminação a todo microrganismo encontrado na micropropagação, e que é necessário a correta diferenciação entre contaminação microbiana e manifestação endofítica. A autora descreve a contaminação microbiana como advinda da desinfestação ineficaz ou de falhas no procedimento de subcultura, e que apresenta alta velocidade de propagação no meio e muitos danos à cultura *in vitro*. A manifestação endofítica, no entanto, é atribuída ao aparecimento de microrganismos endofíticos, os quais não estão relacionados ao processo de cultivo, e geralmente não interferem no cultivo *in vitro*, por seu caráter menos danoso e sua manifestação mais lenta no meio de cultura.

A contaminação microbiana resulta na maioria das vezes no crescimento variável das plântulas, redução de brotação e de enraizamento, assim como na necrose dos tecidos e mortalidade das plântulas (LEIFERT, CASSELLS, 2001; ODUTAYO et al., 2007). Young, Hutchins e Canfield (1984) apontaram dificuldades na esterilização da superfície de plantas lenhosas para produzir culturas axênicas, apontando como solução o uso de antibióticos *in vitro*.

Leone et al. (2019) afirma que a migração natural de bactérias endofíticas está associada à exudação dos tecidos das plantas para colonizar o meio de cultura e competir por nutrientes com as plântulas, tendo sido observada a redução no vigor fisiológico de explantes de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell sem o tratamento com antibióticos. Os autores analisaram o efeito de quatro antibióticos sobre o vigor, crescimento e brotação *in vitro*, e notaram que alguns antibióticos além de não controlar o crescimento bacteriano ainda afetaram o desenvolvimento dos explantes. O meio de cultura suplementado com $400\mu\text{g.mL}^{-1}$ de Timetin favoreceu tanto o controle bacteriano quanto o vigor do explante da espécie cultivada.

É importante avaliar o efeito dos antibióticos, pois apesar de muitos se mostrarem efetivos no controle de contaminantes bacterianos, há antibióticos que geram efeitos fitotóxicos severos, afetando o crescimento e multiplicação *in vitro*, e muitas vezes resultando na morte dos explantes (SCHERWINSKI-PEREIRA; FORTES, 2003).

A micropropagação do camu-camu, segundo Araújo et al. (2012), apresenta dificuldades em obter culturas assépticas devido à alta taxa de contaminação microbiana que possui acelerado crescimento no meio de cultura, favorecendo à competição por nutrientes.

3.3 Controle de bactérias endofíticas no cultivo *in vitro*

O potencial biotecnológico das bactérias endofíticas na cultura de tecidos ainda é pouco conhecido, e considerando que, na maioria das vezes, o meio de cultura é favorável ao crescimento bacteriano, esses microrganismos tentam a competir por espaço e nutrientes. Esposito-Polesi (2020) reforça a necessidade de se avaliar o potencial das Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (BPCPs) *in vitro*, considerando, no entanto, que esta deve ocorrer sem prejudicar o desenvolvimento da planta, e que em muitos casos torna-se necessária a suplementação do meio de cultura com um agente antibiótico que possibilite inibir essa manifestação.

Segundo Costa, Sherwinski-Pereira e Otoni (2010), o insucesso na redução de contaminação tem sido a principal perda de produtividade em laboratórios de cultura de tecidos. O autor descreve algumas estratégias para eliminar contaminantes na micropropagação, destacando o uso da termoterapia e quimioterapia a fim de reduzir os problemas com fitopatógenos. O uso de antibióticos, no entanto, muitas vezes não elimina completamente os contaminantes, mas apenas reduz a um nível baixo de detecção, podendo se manifestar novamente nos subcultivos posteriores. Por isso o autor sugere a combinação de técnicas, como a termo e quimioterapia, a fim de eliminar completamente os contaminantes no estabelecimento *in vitro* de uma cultura (CID; TEIXEIRA, 2014)

3.3.1 Uso de antibióticos na cultura de tecidos

A contaminação *in vitro* é um importante obstáculo para o estabelecimento *in vitro* e propagação de clones livres de doenças e em larga escala. Toledo (2011), em seu estudo relata a necessidade de controle na micropropagação de cana de açúcar que tem como fator limitante a contaminação no estabelecimento *in vitro*. O estudo permitiu identificar que a maioria dos contaminantes era composta por microrganismos endofíticos e que nenhum antibiótico foi 100% eficaz no controle geral *in vitro*, tendo melhores resultados com rifampicina a qual não afetou o crescimento das plantas micropropagadas.

Os estresses físicos ou nutricionais durante o processo de estabelecimento *in vitro* podem favorecer à manifestação de bactérias endofíticas, havendo, portanto, a necessidade de desenvolvimento de um protocolo que controle essa manifestação nesta etapa da micropropagação (LEONE et al., 2019).

O camu-camu, é uma espécie frutífera originária da Amazônia (PINEDO, RAMIREZ, BLASCO, 1981; CLEMENT, 1989), e apresenta grande potencial econômico para a região. No entanto, estudos relacionados ao controle das manifestações de microrganismos contaminantes na micropropagação dessas fruteiras nativas ainda são limitados, sendo,

portanto, necessário a busca por metodologias que permitam sucesso na assepsia do explante e sua manutenção *in vitro*.

A micropropagação de camu-camu no Estado de Roraima, apesar de recente, já apresenta importantes avanços quanto à organogênese e embriogênese somática (ARAÚJO et al., 2021). Araújo et al. (2012) relata que a alta contaminação na fase inicial de micropropagação, especialmente de bactérias endógenas, é um obstáculo para o estabelecimento da cultura *in vitro*. Em seu estudo a autora relata a necessidade de avaliar diferentes doses de antibióticos adicionados ao meio de cultura para controle da contaminação bacteriana no estabelecimento *in vitro* de camucamuzeiro, assim como uso de hipoclorito de sódio em diferentes concentrações e tempo de imersão.

3.3.2 Uso de Óleos Essenciais na cultura de tecidos

Os Óleos Essenciais, segundo a ISO 9235 (ISO, 2013) são produtos obtidos de matéria prima natural de origem vegetal, podendo sua extração ser por destilação a vapor, processos mecânicos do epicarpo de frutas cítricas ou por destilação a seco, desde que os tratamentos físicos aplicados (por exemplo, filtração, decantação e centrifugação) não resultem na alteração de sua composição. De modo geral, são descritos como misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, odoríferas e líquidas, sendo solúveis em solventes orgânicos apolares como o éter e, apesar de apresentar baixa solubilidade em água, são geralmente utilizados para aromatizar soluções aquosas, denominadas de hidrolatos (SIMÕES; SPITZER, 2007).

A composição química dos óleos essenciais é bastante variável, podendo ser constituída, segundo Simões e Spitzer (2007, p. 468), por: “hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos com enxofre”, os quais apresentam diferentes concentrações. Por seu potencial biológico, os óleos essenciais são usados em sistemas tradicionais de cura no mundo, tendo muitos estudos relatando suas atividades antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatórias, e até mesmo anticâncer. No entanto, os estudos sobre seu potencial vão além do uso na saúde humana, sendo empregado também na saúde animal e vegetal (SHARIFI-RAD et al., 2017).

Os óleos essenciais apresentam propriedades biológicas como atividades antibacterianas, antifúngicas, antioxidante, espasmolítica, hepatoprotetora e analgésica, entre outras. Estes constituem uma importante alternativa às drogas sintéticas (CARSON; HAMMER, 2011). Sharifi-Rad et al. (2017) descrevem estudos que demonstraram a eficácia dos óleos essenciais contra espécies de fungos, destacando plantas medicinais e condimentares como orégano (*Origanum syriacum* var. *Bevanii* (Holmes), lavanda (*Lavandula stoechas* L.

subsp. *Stoechas*), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), erva-doce (*Foeniculum vulgare* Mill.) e louro (*Laurus nobilis* L.) no controle de doenças do tomate causados por *Phytophthora infestans* e *Botrytis cinerea*. O estudo relatou que o uso dos óleos essenciais provocou a perda de integridade da permeabilidade da parede celular e da membrana plasmática, com importantes alterações morfológicas nas hifas, demonstrando seu potencial no controle dessas espécies.

O uso desses compostos secundários na exploração da bioatividade antimicrobiana é apresentam também potencial para o controle *in vitro* de contaminantes. O uso de óleos essenciais como alecrim, candeia e palmarosam, segundo Hillen et al. (2012), foram utilizados em diferentes concentrações no meio de cultura *in vitro* para o controle do crescimento micelial de *Alternaria carthami*, *Alternaria* sp. e *Rhizoctonia solani*, proporcionando 100% de inibição dos microrganismos testados a partir de uma concentração de 20 μ L.

Na cultura de tecidos de tâmaras, Jasim, Salih e Ati (2021) utilizaram óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris* L.), hortelã (*Mentha piperita* L.), cânfora (*Cinnamomum camphora*), Colocynth (*Citrullus colocynthis*) e rúcula (*Eruca vesicaria*) no controle de contaminantes fúngicos. Os autores relatam que os óleos essenciais de tomilho, a hortelã e a cânfora inibem a contaminação *in vitro*, no entanto é preciso encontrar a concentração de óleos que não provoque o escurecimento e morte dos explantes, pois esses se constituíram fitotóxicos afetando o estabelecimento *in vitro*.

3.3.3 Identificação e controle de microrganismos contaminantes da cultura de tecidos

A contaminação *in vitro* representa um dos grandes desafios para a cultura de tecidos, e mesmo quando os microrganismos não são fitopatogênicos, mas endofíticos ou epifíticos com potencial para promoção de crescimento, eles podem competir por nutrientes no meio e por espaço no tubo. Portanto, faz-se necessário, tanto a identificação dos contaminantes quanto de agentes antimicrobianos que apresentem melhor efetividade no controle de contaminantes da cultura de tecidos (QUAMBUCH, WINKELMANN, 2018; ESPOSITO-POLESI, 2020; COSTA, SHERWINSKI-PEREIRA, OTONI, 2010).

Quambuch e Winkelmann (2018) apontam metodologias para se identificar os microrganismos que se manifestam da cultura de tecidos, seja pela detecção diretamente da contaminação na cultura estudada ou pela detecção independente da cultura. No primeiro caso, os microrganismos são coletados diretamente da manifestação na cultura de tecidos. Esta técnica tem como desvantagem que muitos microrganismos permanecem no explante sem se manifestar imediatamente, geralmente são microrganismos endofíticos, que se manifestarão apenas quando houver uma mudança na composição do meio como quando há a inserção de citocinas e auxinas para a multiplicação por organogênese ou embriogênese, ou mesmo na fase

de regeneração com variação na concentração da fonte de carbono e agente osmótico (YAN et al., 2018; ESPOSITO-POLESI, 2020). Por isso, Quambuch e Winkelmann (2018) apontam ainda uma segunda alternativa, que é a identificação de microrganismos independente da cultura. Esta técnica consiste em extrair o DNA diretamente do material vegetal, para analisar a fração inculturable das bactérias endofíticas presentes na planta, que permanecem ocultas na maior parte do processo de micropropagação, mas que podem causar perdas significativas quando detectadas posteriormente.

Além da identificação desses microrganismos, é também necessário o desenvolvimento de métodos de controle *in vitro*. Ostrosky et al. (2008) descrevem o uso de extratos de plantas e óleos essenciais como alternativa ao controle por antibióticos, e ainda sugere técnicas para avaliação de atividade antimicrobiana e determinação de concentração mínima inibitória (CMI). Deste outros, o método de difusão em placas é amplamente empregado, e consiste em espalhar o inóculo sobre a placa, geralmente com o auxílio da alça de Drigalski, e aplicar o antibiótico ou extrato sobre discos de papel ou em poços perfurados no meio de cultura. A avaliação é realizada a partir do halo de inibição em torno do quimioterápico, que permite avaliar a sensibilidade dos microrganismos.

Já a metodologia de diluição em caldo permite avaliar a concentração mínima inibitória do quimioterápico empregado em meio líquido, sendo avaliada sua efetividade através da proporção da turbidez provocada pelo crescimento microbiano. Diferente do método de difusão em poços, este é um método quantitativo e gera, através da técnica de microdiluição, um volume menor de resíduo ao utilizar microplacas que contém 96 poços com capacidade para 300 μL cada. Nestes micropoços é possível avaliar a concentração mínima inibitória do agente antimicrobiano sobre o inóculo, através de diluição seriada, que após o crescimento bacteriano da testemunha é realizada a leitura por espectrofotômetro de um leitor de placas (OSTROSKY et al., 2008; BONA et al., 2014; AMPARO et al., 2017).

3.4 MICRORGANISMOS BACTERIANOS NA CULTURA DE TECIDOS DE CAMU-CAMU

O camu-camu é uma espécie nativa em fase de domesticação, que apresenta importante potencial nutricional devido seus frutos conterem altas concentrações de ácido ascórbico. A micropropagação do camu-camu enfrenta como principal barreira a alta taxa de contaminação *in vitro*, que permanece indiferente aos diferentes métodos de desinfestação empregados, havendo em sua maioria perdas significativas em sua produção (ARAÚJO et al., 2012).

Não obstante, é importante isolar e identificar os microrganismos que são considerados contaminantes, que resistem aos diferentes tratamentos de desinfestação superficiais, pois na

verdade, tem caráter endofítico e, portanto, potencialmente podem atuar na promoção de crescimento do camu-camu.

Os endófitos bacterianos podem oferecer vários benefícios à planta hospedeira, podendo melhorar a nutrição ou mesmo aumentar a resistência a estresses bióticos e abióticos (SANTOYO et al., 2016). Para Hallman et al. (1997) a definição de comportamento endofítico se relaciona com aquele microrganismo que não prejudica visivelmente a planta e pode ser isolado a partir de tecido vegetal desinfestado superficialmente ou de dentro da planta.

Segundo Azevedo (2002), a interação entre os endofíticos e a planta hospedeira tem sido alvo constante de estudos, pois indicam benefícios principalmente sobre a produção de metabólitos secundários de interesse farmacológico, tais como antibióticos, antioxidantes e antiviral, antiparasitária, entre outros.

A cultura de tecidos utiliza explantes descontaminados superficialmente que são inseridos em meio de cultura estéril. O processo que remove os microrganismos da superfície, geralmente não afeta os que habitam nos tecidos e órgãos internos. Esses microrganismos, por sua vez, encontram nas condições *in vitro* um ambiente favorável para manifestação e multiplicação (SILVA FILHO, 2016; Santoyo et al., 2016).

Atualmente sabe-se que a presença de bactérias na cultura de tecidos nem sempre está associada à contaminação por falhas no processo de desinfestação, mas também devido à manifestação endofítica *in vitro* (ESPOSITO-POLESI, 2020; SILVA FILHO, 2016).

Esposito-Polesi (2020) descreve como fundamental a distinção entre contaminação e manifestação endofítica, descrevendo como contaminação aquela que decorre do crescimento de microrganismos que não foram eliminados por completo da superfície do explante, ou mesmo por falhas na assepsia dos instrumentos, equipamentos e do operador. A manifestação endofítica, no entanto, é em decorrência de microrganismos endofíticos da planta cultivada e não estão relacionados a erros durante o processo de cultivo *in vitro*.

Na cultura de tecidos, Leone et al. (2019) relata que há uma migração natural de bactérias endofíticas através da exudação dos tecidos das plantas para o meio, onde encontram um ambiente propício para colonizar e algumas vezes acabam por competir por nutrientes com as plântulas.

Esposito-Polesi (2020) aponta que quando a manifestação endofítica ocorre sem prejudicar o desenvolvimento da planta, é possível manter o cultivo das microplantas, realizando limpeza ou troca de meio, sem necessariamente descartar o explante. É importante avaliar os efeitos dessa interação entre bactérias endofíticas e as microplantas no cultivo *in vitro* considerando que algumas delas beneficiam os explantes, potencializando a multiplicação e enraizamento, e até mesmo aumentando a qualidade do explante no processo de organogênese

e embriogênese de genótipos recalcitrantes (SILVA FILHO, 2016). Silva Filho (2016) aponta ainda que, provavelmente, o papel mais importante das bactérias endofíticas está relacionado à fase de aclimação, e que a manutenção dessa interação durante o cultivo *in vitro* pode favorecer essa importante etapa da cultura de tecidos.

Araújo et al. (2001) observaram a interação *in vitro* entre microrganismos endofíticos isolados de tecidos foliares desinfetados de superfície de vários porta-enxertos de citros, identificaram que os metabólitos secretados por alguns fungos e bactérias apresentaram efeito inibitório, e outros, efeito estimulador de crescimento na interação fungo-bactéria.

3.4.1 Potencial Biotecnológico dos Endofíticos Bacterianos

Segundo Mariano et al. (2004), há bactérias endofíticas, e também epifíticas, que desenvolvem importante função na promoção de crescimento das plantas. Conhecidas como Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (BPCPs), elas atuam na produção de fitohormônios, mineralização de nutrientes, solubilização de fosfatos, e fixação de nitrogênio, entre outros, e se constituem importantes alternativas para a melhoria do suprimento para as plantas. Sua aplicação tem sido relatada na quebra de dormência de sementes, tratamento de estacas, tubérculos e raízes, pulverização de parte aérea de folhagens e frutos, e até mesmo na cultura de tecidos *in vitro* e fase de aclimação das mudas micropropagadas. Silveira et al., (2004) observaram que a bacterização das sementes com bactérias endofíticas melhorou a qualidade das mudas.

Além do potencial na promoção de crescimento, as BPCPs podem proteger ou reduzir a severidade de doenças no campo (ASSIS, 2002), como relatado por Assis et al. (1995) em relação à podridão-negra das crucíferas e antracnose do rabanete que foi controlado utilizando rizobactérias, encontrando resultados similares ao controle tradicional com fungicida benomil.

As bactérias do gênero *Methylobacterium*, por causa de sua pigmentação rosa característica e por serem capazes de crescer em metanol e metilamina, entre outros compostos de carbono, são conhecidos como metilotróficas facultativas com pigmentação rosa (PPFMs – pink-pigment facultatively methylotrophic). São geralmente encontradas na superfície das folhas de uma grande variedade de plantas, e também já foram isoladas da propagação *in vitro* de várias culturas. As PPFMs são consideradas epifíticas, mas apresentam características endofíticas que favorecem à aceleração da germinação, reduzir ação de patógenos, produção de fitohormônios, promoção de crescimento vegetal, solubilização de fosfato, e fixação de nitrogênio, entre outros. É notório o potencial das bactérias desse gênero, podendo desenvolver importantes funções na manutenção e equilíbrio microbiológico do hospedeiro (ANDRADE et

al., 2009; SAKIYAMA et al., 2003; MADHAIYAN et al., 2009; LIDSTROM, CHISTOSERDOVA, 2002; NEVES, 2015).

O potencial das PPFMs foram relatadas em culturas de grande interesse comercial como cana-de-açúcar, milho citros e soja entre outras (LONG et al., 1997; ARAÚJO et al., 2002; MADHAIYAN et al., 2009; MADHAIYAN et al., 2002). Holland e Polacco (1994) identificaram a presença das PPFMs na cultura de tecidos e relatam sua capacidade de alterar o metabolismo da planta, melhorando sua performance agrônômica e também melhorar a capacidade de germinação e da produção de citocininas. Já Verginer et al. (2010) identificaram *in vitro* a capacidade da linhagem M. Exorquens DSM21961 aumentar a produção de dois compostos responsáveis pelo aroma de morango, podendo influenciar na sua qualidade comercial. Lidstrom e Chistoserdova (2002) destacam um importante papel de bactérias do gênero *Methylobacterium* na produção de citocininas e auxinas, e promovendo a regeneração de plântulas de culturas de tecidos na ausência de hormônios exógenos.

Quambusch et al. (2014) relatam que há uma importante relação entre a comunidade de bactérias endofíticas, genótipo da planta cultivada e as condições da cultura de tecidos, podendo haver uma interação negativa ou positiva. Os autores relatam os efeitos negativos observados, destacando que apesar de não estarem ligadas à inibição de crescimento dos explantes, em que houve bactérias endofíticas que promoveram o escurecimento do tecido e senescência, devendo nesses casos, a implementação de antibióticos no meio de modo a reduzir os danos à cultura *in vitro*. O estudo também relatou os efeitos da promoção de crescimento após da inoculação de plantas micropropagadas com bactérias com potencial de promoção de crescimento, havendo também um resultado positivo sobre germinação de sementes e crescimento das plântulas, e na redução do tempo de aclimatização de 6 a 8 meses para 4 meses (MARIANO et al., 2004).

De modo semelhante, Dias et al. (2008) em seu trabalho realizou a biotização das sementes, avaliando a capacidade de bactérias endofíticas isoladas da cultura de tecidos de morango, auxiliarem na promoção de crescimento de plantas na fase de multiplicação. O estudo permitiu verificar enraizamento, comprimento e massa seca, número de folhas, comprimento do pecíolo e massa seca da parte aérea. Descrevem como resultado, a promoção de crescimento foi favorecida por 20 cepas diferentes, com maior desenvolvimento das plantas em muitos casos, sete promoveram o crescimento de raiz, e uma das cepas favoreceu o desenvolvimento da parte aérea das mudas. Concomitante a esse estudo, Dias et al. (2008) também quantificou a capacidade de produção de AIA e de solubilização de fosfato, identificou cepas com capacidade de produção de $18\mu\text{g.mL}^{-1}$ de AIA e de solubilização de fosfato de $30\mu\text{g.mL}^{-1}$.

A capacidade de produção da auxina AIA (ácido indol acético), um importante hormônio promotor de crescimento das plantas, foi relatada por Teixeira et al. (2007) como

um uma das principais características a serem avaliadas na seleção de microrganismos promotores de crescimento. Vega-Celedón et al. (2016) relata que AIA é uma das auxinas predominantes no desenvolvimento das plantas, e sabe-se atualmente, que parte desses fitohormônios são obtidos do metabolismo secundário de microrganismos presentes em seu interior ou na rizosfera (CORTES et al., 2019).

A função dos endófitos na micropropagação tem sido investigados cada vez mais, se destacando o efeito positivo de bactérias endofíticas da cultura de tecidos, especialmente de espécies lenhosas quando se trata da promoção de crescimento favorecida pela presença desses microrganismos (QUAMBUSCH; WINKELMANN, 2018).

O interesse por bactérias promotoras de crescimento em plantas tem aumentado diante da possibilidade de substituir ou reduzir o uso de fertilizantes químicos, de modo a tornar os sistemas agrícolas mais sustentáveis. A aplicação desses inoculantes microbianos vem sendo empregada há quase um século, e atualmente já existem inoculantes microbianos que estão disponíveis no mercado brasileiro, tendo como principal potencial de interesse a capacidade para fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato e de potássio, e atividade antibacteriana e antifúngica (VELLOSO, 2019).

O nitrogênio é considerado um dos nutrientes mais limitantes para as culturas, considerando baixa capacidade de fixação de nitrogênio da atmosfera pelas plantas, e por isso, comumente são utilizados fertilizantes nitrogenados a fim de aumentar o rendimento das culturas. No entanto, o emprego de fertilizantes nitrogenados atualmente representa cerca de 40% dos custos de produção e a longo prazo podem causar importantes prejuízos ao meio ambiente. Diante desse cenário, a inoculação de bactérias com potencial de atuar na fixação de nitrogênio da atmosfera, disponibilizando-o para o vegetal, tem sido relatada como uma grande aliada da agricultura por sua atuação como biofertilizantes (RODRIGUES et al., 2016; SIMÕES et al., 2018; ROESCH et al., 2007; TEIXEIRA, 1997; POTRICH, PASSAGLIAI, SCHRANK, 2001).

Vinhal-Freitas e Rodrigues (2010) destaca que o potencial das bactérias fixadoras de nitrogênio e aponta o isolamento de genes denominados *nif* como uma das estratégias de identificar um microrganismo capazes de realizar a fixação biológica de nitrogênio (FBN). Os *Nifs* são genes envolvidos na síntese da enzima nitrogenase, que é capaz de transformar o nitrogênio atmosférico em amônia (APOLONIO, 2018; SIMPSON, BURRIS, 1984; SEIXAS et al., 2020).

Santos (2017), empregou como promotores de crescimento os microrganismos: *Azospirillum brasilense*, *Burkholderia cepacia*, *Bacillus thuringiensis*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *Trichoderma* spp. e Isolado 411, encapsulados com argila e com alginato de

sódio sobre diversas frutíferas como camu-camu, jaborcaba, caqui, bacupari, graviola, caimito e lichia, entre outras. O estudo permitiu observar que os inoculantes utilizados promoveram maior crescimento de mudas de caimito e de lichia.

Correia et al. (2015) relata que fungos isolados do camu-camu apresentaram atividades antagonistas contra os fitopatógenos *Monilinia fructicola*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Aspergillus parasiticus*, destacando-se como promissor no biocontrole de fitopatógenos.

É importante compreender que o potencial dos compostos secundários vai além do campo agroecológico, mas também desempenham importante função na saúde humana, uma vez que o organismo humano, decorrentes do processo natural de envelhecimento e também do estresse, naturalmente produz espécies reativas de oxigênio chamadas de radicais livres, encontradas na forma de radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio. Na maioria das vezes eles são produzidas em maior quantidade do que o corpo consegue combater, e que uma dieta rica em compostos antioxidantes tem potencial de capturar e minimizar os danos desses radicais (SILVA et al., 2015). Muitos desses compostos bioativos são sintetizados sob condições de estresse, e estão relacionados no combate a danos oxidativos na proteção das estruturas celulares (Almeida, 2006) e muitos deles são resultados da interação da planta com endofíticos (CRISTIANI, SILVA, MIYASAKA, 2017; SILVA, 2017; SOUSA, 2018).

Chapla (2014) aponta como promissora a bioprospecção de microrganismos, sendo um dos focos da biotecnologia na atualidade, relacionando diversidade metabólica e adaptabilidade dos microrganismos com uma importante fonte de produtos bioativos. Bessa et al. (2014) destaca como produtos bioativos os flavonoides, que são metabólicos secundários de origem natural, por sua ação na absorção de vitamina C, anti-inflamatória e antioxidantes (SOUSA, 2018).

Abrahão (2014) em seu estudo, realizou a biotransformação de aromas por fungos endofíticos isolados de frutas tropicais como caju, jenipapo, sapoti e camu-camu, como uma alternativa promissora para a biotransformação de terpenos. Dentre os fungos isolados de camu-camu, os isolados L.B.-M.D.-1 e L.B.-M.D.-4, apresentaram capacidade expressiva de biotransformação de terpenóide verbenona a partir de α -pineno, indicando um importante potencial biotecnológico. A presença dos terpenos em alimentos, tem sido relatada na literatura como atrativos não apenas por seu aroma agradável, mas também pela capacidade antioxidante e protetiva contra o câncer e outras doenças (BICAS, NERI-NUMA, RUIZ, et al., 2011).

Segundo Szilagy-Zecchin, Mógor e Figueiredo (2016) a avaliação das características de promoção de crescimento *in vitro* é uma importante ferramenta na seleção de microrganismos com potencial agrônomo antes de testá-los em plantas. Para Yablonskaya, Gins, e Molchanova (2016) o uso de microrganismos simbióticos na micropropagação clonal

promove a resistência das plantas a fatores bióticos e abióticos negativos. A biotização de plantas é descrita como o emprego de bactérias simbióticas (bacterização) e fungos (micorrização) como inóculo ainda na propagação *in vitro*. Essa técnica favorece, principalmente, a fase de aclimação considerada crítica pela perda em massa das plantas micropropagadas. A biotização tem sido empregada por aumentar a taxa de sobrevivência das plantas, sendo considerado promissora para a micropropagação clonal (ESPINOZA-MELLADO et al., 2021).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHÃO, M. R. E. Desenvolvimento de processo biotecnológico para produção de compostos de aroma por fungos endofíticos. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, SP: 2014, 106p.
- ARAÚJO, M. da C. R.; CASTRO, A. M.; CHAGAS, E. A.; SILVA, M. L. da; FLORES, P. S.; SILVA, S. da. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de segmentos caulinares de camu-camuzeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 22, 2012, Bento Gonçalves. Anais. 13692 SP.
- ARAÚJO, M. C. R.; VENDRAME, W. A.; CHAGAS, E. A.; RIBEIRO, M. I. G.; VILACA, R. Preliminary Studies On *In vitro* Propagation of Camu-Camu (*Myrciaria dúbia*), an Important Medicinal Plant. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**. 128:52-54. 2015.
- ARAÚJO, M. C. R.; CHAGAS, E. A.; RIBEIRO, M. I. G.; PINTO, S. T. S.; CHAGAS, P. C.; VENDRAME, W.; MOTA FILHO, A. B.; SOUZA, O. M. Micropropagation of caçari under different nutritive culture media, antioxidants, and levels of agar and pH. **African Journal of Biotechnology**. Vol. 15(33), pp. 1771-1780, 17 August, 2016. DOI: 10.5897/AJB2016.15417.
- ARAÚJO, M. C. R.; Callus induction and pro-embryogenic mass formation in *Myrciaria dubia*, an important medicinal and nutritional plant. **Crop Breeding and Applied Biotechnology (Online)**, v.21, n.3, p.1-8, 2021.
- ALMEIDA, L. F. P.; YUYAMA, K.; CHAGAS, E. A.; LOZANO, R. M. B.; ALBUQUERQUE, T. C. S.; RODRIGUEZ, C. A.; QUEIROZ, F. B. Early Evaluation of Camu-Camu Subsamples in Transition Savanna/Forest Area. **Journal of Agricultural Science**, v. 6, p. 178-186, 2014.
- BASHAN, Y.; KAMNEV, A. A.; DE-BASHAN, L. E. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. **Biology and Fertility of Soils** (2013) 49:465–479. DOI 10.1007/s00374-012-0737-7.
- BHANSALI, R. R.; SINGH, M. SOMATIC EMBRYOGENESIS IN FRUIT AND FOREST TREES OF ARID ZONE. In Jain, S.M.; Gupta, P.K.; Newton, R.J. Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Volume 6, 141-167, 2000. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-3030-3>
- BICAS, J.L., NERI-NUMA, I.A., RUIZ, A.L.T.G., DE CARVALHO, J.E. AND PASTORE, G.M. Evaluation of the Antioxidant and Antiproliferative Potential of Bioflavors. **Food and Chemical Toxicology**, 2011, 49, 1610-1615. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.04.012>

- BRAZ, R. R.; NAHAS, E. Synergistic action of both *Aspergillus niger* and *Burkholderia cepacea* in co-culture increases phosphate solubilization in growth medium. **Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Letters**, Volume 332, Issue 1, July 2012, Pages 84–90. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2012.02580.x.
- Carson, C.F.; Hammer, K.A. Chemistry and Bioactivity of Essential Oils. In Thormar, H. Lipids and essential oils as antimicrobial agents. Ed., pp. 255–306, **John Wiley & Sons**, London, UK, 2011.
- CARVALHO, J.E.U. FRUTAS DA AMAZÔNIA NA ERA DAS NOVAS CULTURAS. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS. Belém, PA. Anais... Brasília, DF: Sociedade Brasileira de Recursos Genéticos, 2012. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/950548/1/22.pdf>
- CARVALHO, J. M. F. C.; VIDAL, M. S.; Noções de Cultivo de Tecidos Vegetais. Campina Grande, PB, (Embrapa Algodão. Documentos, 116). ISSN 0103-0205, 2003. 39p.
- CASSELLS, A.C. Problems in tissue culture: culture contamination. In Debergh, P. and Zimmerman, R.H. Micropropagation: technology and application. Kluwer Academic Publishers Dordrecht I Boston I London. 474p. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-009-2075-0_3
- CATTELAN, A. J. Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal. Londrina: Embrapa Soja, 1999. 36p. ISSN: 1516-781X.
- CENCI, S. A. Boas Práticas de Pós-colheita de Frutas e Hortaliças na Agricultura ... Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006, p. 67-80.
- CHAGAS, E. A.; CARVALHO, A. S. C.; BACELAR-LIMA, C. G.; DUARTE, O. R.; NEVES, L. C.; ALBUQUERQUE, T. C. S. Ocorrência e distribuição geográfica de populações nativas de camu-camu no estado de Roraima. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2012, 22, Bento Gonçalves, Anais... Bento Gonçalves, RS: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 22. 2012.
- CHAGAS, E. A.; FLORES, P. S.; CHAGAS, P. C.; COUCEIRO, M. A.; PASQUAL, M.; PIO, R.; ARAÚJO, M. C. R.; SILVA, M. L. Frutas nativas da Amazônia. In Pasqual, M. Chagas, E. A. Cultura de tecidos em espécies frutíferas. Boa Vista: Editora da UFRR, 2014. 280 p.
- CHAGAS, E. A.; LOZANO, R. M. B.; CHAGAS, P. C.; LIMA, C. G. B.; GARCIA, M. I. R.; OLIVEIRA, J. V.; SOUZA, O. M.; MORAIS, B. S.; ARAUJO, M. C. R. Intraspecific variability of camu-camu fruit in native populations of northern Amazonia. **Crop Breeding and Applied Biotechnology (Online)**, v.15, p.265 - 271, 2015.
- CHAGAS, E. G. L.; VANIN, F. M.; GARCIA, V. A. S.; YOSHIDA, C. M. P.; CARVALHO, R. A. Enrichment of antioxidants compounds in cookies produced with camu-camu (*Myrciaria dubia*) coproducts powders. **LWT - Food Science and Technology**, Volume 137, 2021, 110472, ISSN 0023-6438. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110472>.
- CHALITA, P. B.; FARIAS, E.; DO N. C.; COSTA, I. B. DA; SOUSA, B. F.; SANTOS, M. A. O.; ALBUQUERQUE, T. C. S.; VITAL, M. J. S.; SILVA, K. Characterization of bacterial endophytes from the roots of native and cultivated Brazil nut trees (*Bertholletia excelsa*). **Acta Amazonica** v. 49, n.4, p. 257 – 267, 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/1809-4392201804831>.
- CID, L. P. B. Cultivo *in vitro* de plantas. 3ª ed. amp. – Brasília, DF: Embrapa, 2014. 325.
- CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. p.17-51. in Cid, L. P. B. Cultivo *in vitro* de plantas. 3ª ed. ampl. - Brasília, DF: Embrapa, 2014. 325p.

- CLEMENT, C.R.; CORNELIUS, J.P.; PINEDO-PANDURO, M.H.; YUYAMA, K. Native Fruit Tree Improvement in Amazonia: An Overview. In Akinnifesi, F.k.; Leakey, R.R.B.; Ajayi, O.C.; Sileshi, G.; Tchoundjeu, Z.; Matakala, P.; Kwesiga, F.R. **INDIGENOUS FRUIT TREES IN THE TROPICS: Domestication, Utilization and Commercialization. CAB International**, 2008. 458p. (ISBN 978-1-84593-110-0).
- CLEMENT, C.R. A center of crop genetic diversity in western Amazônia. **BioScience**, v.39, n. 9, p. 624-631, 1989.
- COSTA, F. E. C.; MELO, I. S. ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS À PALMA E PROSPECÇÃO DO POTENCIAL DE SOLUBILIZAR FOSFATO E FIXAR NITROGÊNIO. **Agrotrópica** 17: 23 - 26. 2005. Centro de Pesquisas do Cacau, Ilhéus, Bahia, Brasil.
- COSTA, M. G. C.; SHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; OTONI, W. C. Importância das contaminações e dos microrganismos endêmicos na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. In SHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. 446p.
- DIAS; A. C. F.; COSTA, F. E. C.; ANDREOTE, F. D.; LACAVA, P. T.; TEIXEIRA, M. A.; ASSUMPÇÃO, L. C.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; MELO, I. S. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** (2009) 25:189–195. DOI 10.1007/s11274-008-9878-0
- EMBRAPA RORAIMA. Procedimento Operacional Padrão Técnico para Caracterização de Culturas Bacterianas. Protocolo 005.POP.005.LMS, Embrapa Roraima 2005.
- Espinoza-Mellado, M. R.; López-Villegas, E. O.; López-Gómez, M. F.; Rodríguez-Tovar, A. V.; Garcia-Pineda, M.; Rodríguez-Dorantes, A. Chapter 3 - Biotization and *in vitro* plant cell cultures: plant endophyte strategy in response to heavy metals knowledge in assisted phytoremediation. *Microbe Mediated Remediation of Environmental Contaminants*, Woodhead Publishing Series in Food Science, **Technology and Nutrition**. 2021, Pages 27-36
- ESPOSITO-POLESI, N. P. Microrganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 9, n. 4, p. 533-541, out./dez. 2011.
- 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** (2017) 74:103–113 DOI 10.1007/s00284-016-1163-0.
- ESPOSITO-POLESI, N. P. Artigo de Revisão / Review Paper Contaminação versus manifestação endofítica: implicações no cultivo *in vitro* de plantas. **Rodriguésia** 71: e00562018. 2020. DOI: 10.1590/2175-7860202071072.
- Fachinello, J. C.; Hoffmann, A.; Nachtigal, J. C. Propagação de Plantas frutíferas. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. P. 221.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: A Computer Statistical Analysis System. **Ciência e Agrotecnologia, Lavras**, V.35, n.6, p.1039-1042, 2014.
- GRIGIO, M. L.; MOURA, E. A.; CHAGAS, E. A.; DURIGAN, M. F. B.; CHAGAS, P. C.; CARVALHO, G. F.; ZANCHETTA, J. J. Bioactive compounds in and antioxidant activity of camu-camu fruits harvested at different maturation stages during postharvest storage. **Acta Scientiarum. Agronomy**, vol. 43, e50997, 2021. 10.4025/actasciagron.v43i1.50997.

- GRIGIO, M. L., MOURA, E.A., CARVALHO, G.F., ZANCHETTA, J.J., CHAGAS, P.C., CHAGAS, E.A., DURIGAN, M.F.B. Nutraceutical potential, qualitative and acceptability of different camu-camu popsicle. **J. Food Process. Preserv.** 45, e15305, 2021a. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15305>
- GRIGIO, M. L.; MOURA, E. A.; CARVALHO, G. F.; ZANCHETTA, J. J.; CHAGAS, P. C.; CHAGAS, E. A.; DURIGAN, M. F. B. Nutraceutical potential, quality and sensory evaluation of camu-camu pure and mixed jelly. **Food Sci. Technol.** 41, fst.03421, 2021b. <https://doi.org/10.1590/fst.03421>.
- HILLEN,T.; SCHWAN-ESTRADA,K.R.F.; MESQUINI, R.M.; CRUZ,M.E.S.; STANGARLIN,J.R.; NOZAKI,M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatógenos fúngicos *in vitro* e no tratamento de sementes. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.14, n.3, p.439-445, 2012.
- ISO. ISO 9235:2013: Aromatic natural raw materials — Vocabulary. International Organization for Standardization. Disponível em: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:9235:ed-2:v1:en:term:2.11>.
- JASIM, N. S.; SALIH, A. M.; ATI, M. Evaluating the efficiency of plants essential oils against Common fungal contamination affecting tissue culture of date palms (Phoenix Dactylifera L.) by *in vitro* culture. **Research Journal of Chemistry and Environment**. Vol. 25 (6) June (2021)
- JONES, D. L. Organic acids in the rhizosphere: a critical review. *Plant and Soil*. **The Hague**, v.205, p.25-44, 1998.
- JOHNSTON, H. W. The solubilization of phosphate. I, The action of various organic compounds on dicalcium and tricalcium phosphates. **Reprinted from the Zealand Journal of Science and Technology**, Section B, Vol. 33, N°. 6, May, 1952.
- KIDUS, T.; TEKA, Z. Isolation, Characterization and Identification of Contaminant Bacteria from Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) *in vitro* Culture in Tigray Biotechnology Center, Mekelle, Ethiopia. **Journal of Bacteriology and Parasitology**, Vol.11 Iss.3 No: 1000372. 2020.
- KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M. L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético *in vitro* por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 42 (10), Out 2007. DOI: [10.1590/S0100-204X2007001000013](https://doi.org/10.1590/S0100-204X2007001000013).
- LAMEIRA, O.A.; LEMOS, O.F.; MENEZES, I.C.; PINTO, J.E.B.P. Cultura de Tecidos (manual). Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. 41p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 66). ISSN 1517-2201
- LEIFERT, C.; CASSELLS, A. C. 2001. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. ***In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant***, 37: 133–138.
- LEONE, G.F.; ANDRADE, P.A.M.; ALMEIDA, C.V.; ALMEIDA, C. V.; ANDREOTE, F. D.; ALMEIDA, M. Use of antibiotics to control endophytic bacterial growth migration onto culture medium in *Eucalyptus cloeziana* F.Muell.: a micropropagation approach. ***In vitro Cell.Dev.Biol.-Plant*** 55, 421–432 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11627-019-09986-2>
- LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. **Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology**, vol. 1815, © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature, 2018. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4>.
- LUVIELMO, M. M.; LAMAS, S. V.; Revestimentos comestíveis em frutas. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**. Pelotas. Vol.8, N.1, p.8-15, 2012.

- MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; LEE, H. S.; HARI, K.; SUNDARAM, S. P.; SA, T. M. Pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria accelerate germination, growth and yield of sugarcane clone Co86032 (*Saccharum officinarum* L.). **Biology and Fertility of Soils** (2005) 41: 350–358. DOI: 10.1007/s00374-005-0838-7.
- MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. IMPORTÂNCIA DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO E DE BIOCONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS PARA UMA AGRICULTURA SUSTENTÁVEL. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, Recife, vol. 1, p.89-111, 2004.
- MARRA, L. M. SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS POR BACTÉRIAS E SUA CONTRIBUIÇÃO NO CRESCIMENTO DE LEGUMINOSAS E GRAMÍNEAS. (Tese de Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras (UFLA). Lavras/MG. 2012. 142p.
- MELO, V. F.; SILVA, D. T.; EVALD, A.; ROCHA, P. R. R. Qualidade química e biológica do solo em diferentes sistemas de uso em ambiente de savana. **Revista Agro@mbiente Online**, v. 11, n. 2, p. 101-110, abril-junho, 2017
- MIRANDA, I. S.; ABSY, M. L. FISIONOMIA DAS SAVANAS DE RORAIMA, BRASIL. **Acta Amazônica**, 30 (3): 423-440. 2000.
- MOREIRA, A. L. L.; ARAÚJO, F. F. BIOPROSPECÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus* spp. COMO POTENCIAIS PROMOTORES DE CRESCIMENTO DE *Eucalyptus urograndis*. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.37, n.5, p.933-943, 2013.
- NASCIMENTO, O. V.; SILVA, E. L. CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia* (HBK) McVaugh), a small Amazonian fruit rich in vitamin C and a supplement for immunity. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. e27810615877, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i6.15877.
- ODUTAYO, O. I.; AMUSA, N. A.; OKUTADE, O.O.; Ogunsanwo, Y.R. Determination of the Sources of Microbial Contaminants of Cultured Plant Tissues. *Plant Pathology Journal*. 2007, 6(1): 77–81.
- OLIVEIRA, H. S.; LEMOS, O. F.; MIRANDA, V.S.; MOURA, H.C.P.; CAMPELO, M.F.; SANTOS, L. R.R. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de brotos no processo de micropropagação de cultivares de bananeira (*Musa* spp.). **Acta Amazônica**. vol. 41(3) 2011: 369 – 376.
- OLIVEIRA, A. S. Impacto do consumo de camu-camu (*Myrciaria dubia* (Kunth) Mc Vaugh) em adultos com síndrome metabólica em Boa Vista/RR. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2015. 80f
- PERU. Ministerio de Agricultura. Instituto Nacional de Recursos Nacionales Unidad de Desarrollo de la Amazonía. Marzo, 2000, 28p. Disponível em: http://agroaldia.minagri.gob.pe/biblioteca/download/pdf/manuales-boletines/camu-camu/prog_nac_camucamu.pdf. Acessado em: 10/10/2017.
- PETERS, C.M. & VASQUEZ, A. Estudios ecologicos de camu-camu (*Myrciaria dubia*) I. producción de frutos en poblaciones naturales. **Acta Amazônica**. v.16, n.17, p.161-174. 1986.
- PINEDO, P. M.; RAMIREZ, N.; BLASCO, M. L. Notas preliminares sobre el araza (*Eugenia stipitata*), frutal nativo de la Amazonía Peruana, Pub. Misc. 229, **Instituto Nacional de Investigación Agrária**. Lima, Peru. 58p, 1981.
- QUAMBUSCH, M; PIRTTILÄ, 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**, Volume 34, 524–533, 2014. DOI:10.1093/treephys/tpu027.
- QUAMBUSCH, M.; WINKELMANN, T. Bacterial Endophytes in Plant Tissue Culture: Mode of Action, Detection, and Control. In LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. **Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology**, vol. 1815. ©Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature, 2018. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4>.
- QIN, S.; ZHANG, Y.; YUAN, B.; XU, P.; XING, K.; WANG, J.; JIANG, J. Isolation of ACC deaminase-producing habitat-adapted symbiotic bacteria associated with halophyte *Limonium sinense* (Girard) Kuntze and evaluating their plant growth-promoting activity under salt stress. **Plant Soil** (2014) 374:753–766. DOI 10.1007/s11104-013-1918-3.
- RYAN, R. P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D. J.; DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Letters**, 278 (2008) 1–9.
- RODRIGUES, E. P.; OLIVEIRA, A. L. M.; VIDAL, M. S.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; BALDANI, J.I. Obtenção e Seleção de Mutantes Tn5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Pal 5) com Alterações na Produção de Auxinas. **Seropédia: Embrapa Agrobiologia**, 2007. 20p.
- SARWAR, M.; KREMER, R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, 1995, 20, 282-285.
- SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; COSTA, F. H. S. Estratégias de seleção e uso de substâncias químicas microbianas para o controle de contaminantes da cultura de tecidos de plantas. In SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. 446p.
- SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. 446p.
- SHARIFI-RAD, J.; SUREDA, A.; TENORE, G. C.; DAGLIA, M.; SHARIFI-RAD, M.; VALUSSI, M.; TUNDIS, R.; SHARIFI-RAD, M.; LOIZZO, M. R.; ADEMILUYI, A. O.; SHARIFI-RAD, R.; AYATOLLAHI, S. A.; IRITI, M. Review Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems. **Molecules** 2017, 22, 70.
- SILVA, S. R.; RODRIGUES, K. F. D; SCARPARE FILHO, J. A. Propagação de árvores frutíferas. Piracicaba: USP, ESALQ, Casa do Produtor Rural, 2011, v. 1, 63p.
- SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2000. Cap.18.
- SILVA, A. V. S.; VILENA, J. O.; CHAGAS, E. A.; ARAÚJO, M. C. R.; GRIGIO, M. L.; GARCIA, M. I. R. Desempenho adaptativo de clones de caçari (*Myrciaria dubia*) em condições de terra firme no Estado de Roraima. Anais do XXX CBA Congresso Brasileiro de Agronomia. 12 a 15/Setembro/2017, Fortaleza-CE.
- SILVA, F. C. Manual de Análises Químicas de Solos, Plantas e Fertilizantes. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999. 370p.
- SILVA, M. L. da. Desinfestação e estabelecimento de sementes de *Myrciaria dubia* (H. B. K.) McVaugh germinadas *in vitro*. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Roraima. Boa Vista, 2012. 55 p.
- SILVA, M. L.; YUYAMA, K. Propagação vegetativa de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) utilizando estacas de diâmetro diferentes submetidas a diferentes

- concentrações de ácido naftaleno acético – ANA. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 51, 2000, Brasília, DF. Resumos. Manaus: SBB, 2000. p. 88.
- SOUSA, R. C. P.; CHAGAS, E. A.; GUIMARÃES, P. V. P.; NASCIMENTO FILHO, W. B., MELO FILHO, A.A. Minerals in Aqueous Extract of the Coproducts *Myrciaria dubia* (Kunth.) McVaugh, Myrtaceae. **Rev. Virtual Química** 7, 1299–1305, 2015. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150072>.
- SUGUINO, E.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; ARAÚJO, P. S. R.; SIMÃO, S. Propagação vegetativa de camu-camu por meio de enxertia intergenérica na família Myrtaceae. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 12, p. 1477-1482, dez. 2003.
- SUGUINO, E.; DE ARAÚJO, P.S.R.; SIMÃO, S. Cultivo do camu-camu (*Myrciaria dubia*). Piracicaba: ESALQ - Divisão de Biblioteca e Documentação, 2001. 37 p.: (Série Produtor Rural, nº16).
- SZILAGYI-ZECCHIN, V. J., MÓGOR, Á. F., & FIGUEIREDO, G. G. O. (2016). Strategies for Characterization of Agriculturally Important Bacteria. **Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity**, 1–21. doi:10.1007/978-81-322-2647-5_1
- TOLEDO, C. P. Identificação e controle de microorganismos contaminantes no processo de micropropagação de cana-de-açúcar. (Dissertação de Mestrado) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, 2011. 71p.
- TEIXEIRA, M. A.; MELO, I. S.; VIEIRA, R. F.; COSTA, F. E. C.; HARAKAVA, R. MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS DE MANDIOCA DE ÁREAS COMERCIAIS E ETNOVARIEDADES EM TRÊS ESTADOS BRASILEIROS. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.1, p.43-49, jan. 2007.
- THOMAS, P.; KUMARI, S.; SWARNA, G.K.; GOWDA, T.K.S. Papaya shoot tip associated endophytic bacteria isolated from *in vitro* cultures and host-endophyte interaction *in vitro* and *in vivo*. **Canadian Journal of Microbiology**. Vol. 53, 2007.
- VAZQUEZ, P.; HOLGUIN, G.; PUENTE, M. E.; LOPEZ-CORTES, A.; BASHAN, Y. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. **Biology and Fertility of Soils** (2000) 30:460–468 <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s003740050024.pdf>
- VILLACHICA, H.L. 1996. El cultivo del camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) en la Amazonia peruana. Mirigraf, Lima.
- VILENA, J. O.; TAVEIRA, D.L.L.; CHAGAS, P.C.; CHAGAS, E.A.; ARAÚJO, M.C.R.; GARCIA, M.I.R. ADAPTAÇÃO DE CLONES DE CAÇARI NAS CONDIÇÕES DE FLORESTA DE TRANSIÇÃO DO ESTADO DE RORAIMA. Anais do II Simpósio de Propagação de Plantas e Produção de Mudanças. 29 a 31/outubro/2018. Águas de Lindóia, SP.
- WANG, Q.; LI, S.; ZHAO, F.; DAI, H.; BAO, L.; DING, R.; GAO, H.; ZHANG, L.; WEN, H.; LIU, H. Chemical constituents from endophytic fungus *Fusarium oxysporum*. **Fitoterapia** 82 (2011) 777–781.
- YAN, X.; WANG, Z.; MEI, Y.; WANG, L.; WANG, X.; XU, Q.; PENG, S.; ZHOU, Y.; WEI, C. Isolation, Diversity, and Growth-Promoting Activities of Endophytic Bacteria From Tea Cultivars of Zijuan and Yunkang-10. **Frontiers in Microbiology**, 21 August 2018. DOI: 10.3389/fmicd.2018.01848.
- YABLONSKAYA, M. I.; GINS, M. S.; MOLCHANOVA, M. A. *In vitro* Plants biotization. **RUDN Bulletin, Agronomy and Livestock series**, n 1 (2016), p.15-20. DOI: 10.22363/2312-797X-2016-1-15-20.

- YUTAMA, K.; AGUIAR, J. P. L.; YUYAMA, L. K. O. Camu-camu: um fruto fantástico como fonte de vitamina C. **Acta Amazônica**, 32 (1) Mar 2002. DOI: 10.1590/1809-43922002321174.
- YUYAMA, K.; MENDES, N. B.; VALENTE, J. P. Longevidade de sementes de camu-camu submetidas a diferentes ambientes e formas de conservação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 2, p. 601-607, 2011.
- YUYAMA, k. A cultura de camu-camu no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**. vol.33 no.2 Jaboticabal June, 2011.
- YOUNG, P. M.; HUTCHINS, A. S.; CANFIELD, M. L. Use of antibiotics to control bacteria in shoot cultures of wood plants. **Plant Science Letters**, v.34, n.3, p. 203-209, 1984.

CAPÍTULO I: POTENCIAL DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS À MICROPROPAGAÇÃO DE *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS

Resumo

O estabelecimento *in vitro* do camu-camu, apresenta grande desafio no controle da contaminação bacteriana. Entretanto, atualmente sabe-se que muitas das bactérias que se manifestam na cultura de tecidos são endofíticas e benéficas às plantas podendo auxiliar na promoção do crescimento e na defesa contra fitopatógenos. Embora indesejadas nas fases iniciais da cultura de tecido vegetal, o restabelecimento da microbiota dos cultivos *in vitro* pode auxiliar na promoção de crescimento dos explantes e sobrevivência *in vitro* e melhor adaptação na fase de aclimação. Neste sentido, objetivou-se neste trabalho, isolar e identificar bactérias provenientes do cultivo *in vitro* de cinco clones superiores de camu-camu e avaliar seu potencial na promoção de crescimento de plantas. Foram isoladas trinta e nove bactérias do cultivo *in vitro* de camu-camu, identificadas e caracterizadas quanto à morfologia, produção de ácido indol acético, solubilização de fosfato, produção de sideróforos e fixação de nitrogênio. O presente estudo permitiu observar a diversidade de bactérias presentes no camu-camu, com um total de 40 isolados provenientes da cultura de tecidos de cinco clones superiores da espécie. Com base no sequenciamento parcial do gene 16S rRNA foram identificados os gêneros *Erwinia*, *Micrococcus*, *Enterobacter*, *Microbacterium*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Stenotrophomonas*, *Brevundimonas* e *Methylobacterium*. Trinta e quatro isolados bacterianos apresentaram produção de ácido indol acético (AIA) *in vitro*, sendo maior produção de 15,39 $\mu\text{g L}^{-1}$ obtida pelo isolado 18L. Todos os isolados foram positivos para solubilização de fosfato, destacando-se 18C, 18E e 18P que solubilizaram 75,89, 60,35 e 72,34%, respectivamente, do fosfato insolúvel disponibilizado *in vitro*. A solubilização de fosfato de cálcio em meio sólido foi detectada em apenas sete dos 40 isolados, e variou entre baixa e média capacidade de solubilização. A análise de produção de sideróforos foi detectada em 38 isolados, e teve como destaque os isolados 10F e 18E, com 93,82% e 75,67% de unidades de sideróforos (PSU), respectivamente. A análise para identificação das linhagens com potencial para fixação de nitrogênio em plantas não identificou presença do gene *nifH* em nenhum dos isolados analisados pelo método empregado. Este trabalho permitiu a seleção de linhagens promotoras do crescimento de plantas com base em bactérias isoladas da cultura de tecidos de camu-camu, o que poderá permitir o futuro desenvolvimento de biofertilizantes visando a redução dos fertilizantes químicos utilizados na agricultura moderna.

Palavras-chave: Camu-camu. Cultura de tecidos. Endofíticos. Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas.

Abstract

The *in vitro* establishment of the camu-camu presents a great challenge in the control of bacterial contamination. However, it is currently known that many of the bacteria that manifest in tissue culture have the potential to promote plant growth, as they internally inhabit the plant tissues of the species in their natural habitat. Bacterial isolates can be used in biotization later, in order to identify their potential in promoting explant growth and *in vitro* survival and better adaptation in the acclimatization phase. In this sense, the objective of this work was to isolate and identify bacteria from the *in vitro* cultivation of five superior camu-camu clones and to evaluate their potential in promoting plant growth. Thirty-nine bacteria were isolated from the *in vitro* culture of camu-camu, identified and characterized in terms of morphology, indole acetic acid production, phosphate solubilization, siderophore production and nitrogen fixation. The present study allowed us to observe the diversity of bacteria present in the camu-camu, with a total of 40 isolates from the tissue culture of 5 superior clones of the species. The partial

sequencing of the *16S rRNA* gene indicated similarity with the genera *Erwinia*, *Micrococcus*, *Enterobacter*, *Microbacterium*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Stenotrophomonas*, *Brevundimonas* and *Methylobacterium*. Thirty-four bacterial isolates showed indole acetic acid (IAA) production *in vitro*, with emphasis on isolate 18L, which showed $15.39 \mu\text{g L}^{-1}$. All isolates performed phosphate solubilization, highlighting 18C, 18E and 18P that solubilized 75.89, 60.35 and 72.34%, respectively, of the insoluble phosphate available *in vitro*. Calcium phosphate solubilization in solid medium was detected in only 7 of the 40 isolates, and it varied between low and medium solubilization capacity. The analysis of siderophore production was detected in 38 of the 40 isolates, and the highlights were isolates 10F and 18E, with 93.82 and 75.67 percent of siderophore units (PSU), respectively. The analysis to identify the strains with potential for nitrogen fixation in plants did not identify the presence of the *nifH* gene in any of the isolates analyzed by the method used. This work allowed us to observe the potential for plant growth promotion of bacteria isolated from camu-camu tissue culture, which could be a future alternative to chemical fertilizers used in modern agriculture.

Keywords: Camu-camu; Tissue culture; Endophytes; Plant Growth-Promoting Bacteria.

INTRODUÇÃO

O camu-camu, também conhecido como caçari, é uma fruta nativa da Amazônia que tem despertado o interesse comercial devido à expressiva importância nutricional, concentrando altas doses de ácido ascórbico e minerais em seus frutos (NASCIMENTO e SILVA, 2021; CHAGAS et al., 2015; GRIGIO et al., 2021). As concentrações de vitamina C de plantas nativas do Estado de Roraima apresentaram alto teor de vitamina C, entre 6.112 mg.100g (YUYAMA et al., 2002) e 7.355 mg.100g de polpa e casca de camu-camu (CHAGAS et al., 2015).

Diante de seu potencial nutricional, Chagas et al. (2012) destacam as principais técnicas empregadas na propagação do camu-camu e outras frutíferas nativas, como a propagação seminífera e vegetativa. A propagação seminífera tem sido amplamente usada como porta enxerto de clones superiores de camu-camu (SUGUINO, 2003; SILVA; YUYAMA, 2000). A propagação vegetativa tem como destaque as técnicas de estaquia e enxertia e, mais recentemente, a propagação *in vitro* por organogênese e embriogênese relatadas por Araújo et al. (2015), Araújo et al. (2016) e Araújo et al. (2021). As contaminações microbianas, no entanto, são apontadas como principal barreira na micropropagação da espécie nativa, sobretudo por bactérias (NAHAS et al., 2012).

A atribuição arbitrária de contaminação a todo microrganismo encontrado na micropropagação não é a abordagem mais adequada, fazendo-se necessário a correta diferenciação entre contaminação microbiana e manifestação endofítica (Esposito-Polesi 2020). Desse modo, é considerada contaminação quando advinda da desinfestação ineficaz ou de falhas no procedimento de subcultura, e geralmente apresenta alta velocidade de propagação no meio e muitos danos à cultura *in vitro*. A manifestação endofítica, entretanto, é atribuída ao aparecimento de microrganismos endofíticos, os quais não estão relacionados ao processo de

cultivo, e geralmente não interferem no cultivo *in vitro*, por seu caráter menos danoso e sua manifestação mais lenta no meio de cultura.

Araújo et al. (2012) destaca que muitos dos microrganismos contaminantes da cultura de tecidos do camu-camu podem ser endofíticos, e, portanto, podem desempenhar importantes funções tanto na cultura *in vitro*, quanto na *ex vitro*, especialmente na fase de aclimação (POLESI, 2011). Dentre essas funções, podem ser destacadas: a fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fósforo, biorremediação, fitorremediação, produção de compostos bioativos de interesse farmacológico, controle biológico, produção de auxinas e citocininas, entre outros compostos que protegem e estimulam o desenvolvimento vegetal (ESPOSITO-POLESI, 2017; KUSS et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2007).

Embora muitos endófitos promotores de crescimento também possam ter atividade antimicrobiana, estes diferem das linhagens de biocontrole, porque geralmente não agem na inibição de patógenos, mas no crescimento das plantas, promovendo um aprimorado ciclo de nutrientes e minerais, como nitrogênio, fosfato e outros (RYAN et al., 2008).

Essa função de promoção de crescimento não se limita ao ambiente *ex vitro*, mas também pode ser aplicável na cultura de tecidos, apontam Yablonskaya, Gins e Molchanova (2016). Os autores indicam que a biotização possui um efeito positivo quando da utilização de bactérias com potencial de promoção de crescimento, pois favorecem a regeneração das plantas *in vitro*, assim como reduzem o estresse no transplante para condições não estéreis como na fase de aclimação.

Quambusch et al. (2014) relatam que há uma importante relação entre a comunidade de bactérias endofíticas, genótipo da planta cultivada e as condições da cultura de tecidos, podendo haver uma interação negativa ou positiva e que, por isso, é tão importante a descoberta de microrganismos com funções de promoção de crescimento *in vitro*. Os autores relatam os efeitos negativos observados em seu estudo, destacando que apesar de não estarem ligadas à inibição de crescimento dos explantes, houve bactérias endofíticas que promoveram o escurecimento do tecido e senescência, devendo nesses casos, a implementação de antibióticos no meio como forma de reduzir os danos à cultura *in vitro*. Já o estudo de Mariano et al. (2004), relatou efeitos de promoção de crescimento após da inoculação de plantas micropropagadas com bactérias com potencial de promoção de crescimento, havendo também um resultado positivo sobre germinação de sementes e crescimento das plântulas, e na redução do tempo de aclimatização de 6 a 8 meses para 4 meses.

De modo semelhante, Dias et al. (2008) em seu trabalho realizou a inoculação das sementes, avaliando a capacidade de bactérias endofíticas isoladas da cultura de tecidos de morango, auxiliarem na promoção de crescimento de plantas na fase de multiplicação. O estudo

permitiu verificar enraizamento, comprimento e massa seca, número de folhas, comprimento do pecíolo e massa seca da parte aérea. A promoção de crescimento foi favorecida por 20 linhagens diferentes, a maioria promoveu maior desenvolvimento das plantas, sete o crescimento de raiz, e uma das cepas favoreceu o desenvolvimento da parte aérea das mudas. Concomitante a esse estudo, Dias et al. (2008) também quantificaram a capacidade de produção de AIA e de solubilização de fosfato, confirmando seu potencial com promotoras de crescimento.

Até o momento, não foram encontradas informações sobre bactérias endofíticas associadas ao camu-camuzeiro, tanto em ambientes *in situ* quanto *in vitro*. Mas, é provável que essas plantas sejam colonizadas por bactérias promotoras de crescimento de plantas, como destacado por Paz et al. (2012) em estudos com outras espécies de Myrtaceae. Desta forma, este trabalho teve como objetivo isolar bactérias endofíticas da cultura de tecidos de camu-camu e avaliar seu potencial na promoção de crescimento de plantas.

MATERIAL E MÉTODOS

Micropropagação de clones superiores de camu-camu

Obtenção e preparo do material vegetal

Os explantes de camu-camu foram coletados no Campo Experimental Serra da Prata (CESP) na cidade de Mucajaí/RR (22°56'23.4''S 48°34'11.6''W). Foram coletadas 60 amostras de cinco clones identificados como UAT0796, UAT1096, UAT1596, UAT1796 e UAT1896, em pontos aleatórios, priorizando plantas que não apresentassem nenhum sinal de injúria causados por insetos ou danos causados por possíveis patógenos.

Após a coleta, os segmentos caulinares foram levados ao laboratório e passaram por pré-limpeza. Os segmentos caulinares de camu-camu, oriundos de brotações novas com um par de gemas axilares e aproximadamente 4 cm de comprimento, foram lavados em água corrente, para lixiviação parcial de compostos fenólicos liberados por consequência do corte dos tecidos. Posteriormente, foram imersos em solução fungicida com 2 mL L⁻¹ Nativo® e 100 mg L⁻¹ do antioxidante ácido cítrico, conforme recomendação de Araújo et al. (2015), permanecendo nestas condições por 2 horas.

Em seguida, os segmentos caulinares passaram por processo de desinfestação em câmara de fluxo laminar como descrito na sequência a seguir: primeiro foram imersos em álcool 70% por 1 minuto; logo, foram transferidos para recipiente com hipoclorito de sódio a 1,5% acrescido de 2 gotas de detergente neutro, onde permaneceram por 10 minutos; ao final,

passaram por tríplice lavagem com água destilada, deionizada e autoclavada (DDA) para retirada total dos produtos da superfície dos tecidos.

Condições de cultivo

- *Para coleta de microrganismos dependentes da cultura de tecidos*, 40 amostras de cada um dos cinco clones de camu-camu já desinfestados foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio WPM suplementado com 30 g.L⁻¹ de sacarose e 100 mg.L⁻¹ de ácido cítrico, solidificado por 7 g.L⁻¹ de ágar, com pH ajustado para 5,6 e tendo sido autoclavado a 1,2 atm de pressão e 120 °C por 15 minutos.

Todos os explantes foram mantidos a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 16 h de 35-40 μmol m⁻¹ s⁻¹ fornecido por lâmpadas fluorescentes brancas frias. Os explantes foram avaliados a cada 7 dias, para observação quanto ao aparecimento de microrganismos na fase de estabelecimento *in vitro* de camu-camu.

Nesta etapa foi analisado, com delineamento inteiramente casualizado com oito repetições e cinco explantes cada; as s variáveis: analisadas foram: oxidação dos explantes, contaminação bacteriana e contaminação fúngica. Os dados foram analisados por meio do SISVAR (FERREIRA, 2014) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a P = 0,05.

- *Para coleta de microrganismos independentes da cultura de tecidos*, 20 amostras de cada clone já desinfestadas foram armazenadas em erlenmeyer, vedados e levadas ao laboratório de microbiologia de Solos da Embrapa-Roraima. Em câmara de fluxo laminar, as amostras foram maceradas em solução salina a 0,85% para a diluição, e semeados 100 μL em meio ágar nutriente sendo distribuídas com auxílio de alça de Drigalski, em triplicata, e mantidas em incubadora a 28 °C por 10 dias.

Isolamento, caracterização e identificação bactérias isoladas de camu-camu

Método de detecção de bactérias

O isolamento dos microrganismos da cultura de tecidos de camu-camu foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Solo, LMS, da Embrapa Roraima e se deu de duas maneiras: detecção dependente da cultura e independente da cultura de tecidos (QUAMBUSCH, WINKELMANN, 2018). No primeiro método, o isolamento se deu após manifestações bacterianas na micropropagação de camu-camu em meio de cultura WPM. No segundo, os seguimentos caulinares de camu-camu foram macerados em solução salina para obtenção de uma maior porção da comunidade bacteriana, que podem não ter se desenvolvido em meio WPM da cultura de tecidos.

- *Isolamento de microrganismo dependentes da cultura de tecidos*: foram coletados das manifestações bacterianas após o cultivo *in vitro* de camu-camu em meio WPM. Os tubos provenientes da micropropagação de clones de camu-camu que apresentaram manifestação bacteriana foram reservados para isolamento e identificação em meio de cultura ágar em placas de petri, pelo método de esgotamento por estrias.

- *Isolamento de microrganismos independentes da cultura de tecidos*: foram isolados pelo método de esgotamento por estrias a partir da suspensão de solução salina com seguimentos caulinares de camu-camu macerados, semeados em meio ágar nutrientes após 10 dias em incubadora a 28 °C.

Caracterização morfológica

Os isolados bacterianos de camu-camu foram cultivados em ágar nutrientes para caracterização morfológica (tamanho, borda, superfície, elevação, cor, formato, brilho) a fim de separar em grupos primários segundo protocolo 005.POP.005.LMS da Embrapa Roraima (2005) que descreve o Procedimento Operacional Padrão Técnico para Caracterização de Culturas Bacterianas.

Identificação baseada em sequência 16S rRNA

- *Extração de DNA*: Para esta etapa, foi utilizado o Kit de extração de DNA Genomic DNA from Tissue NucleoSpin® da Macherey-Nagel, seguindo as instruções do fabricante.

- *Sequenciamento do gene 16S rRNA*: Após a extração de DNA, os microrganismos foram identificados pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, utilizando oligonucleotídeos específicos fD1 e rD1 (Weisburg, 1991). As sequências geradas foram submetidas à análise de similaridade de nucleotídeos do banco de dados GenBank para que identificação e classificação.

Potencial de promoção de crescimento de isolados bacterianos de camu-camu

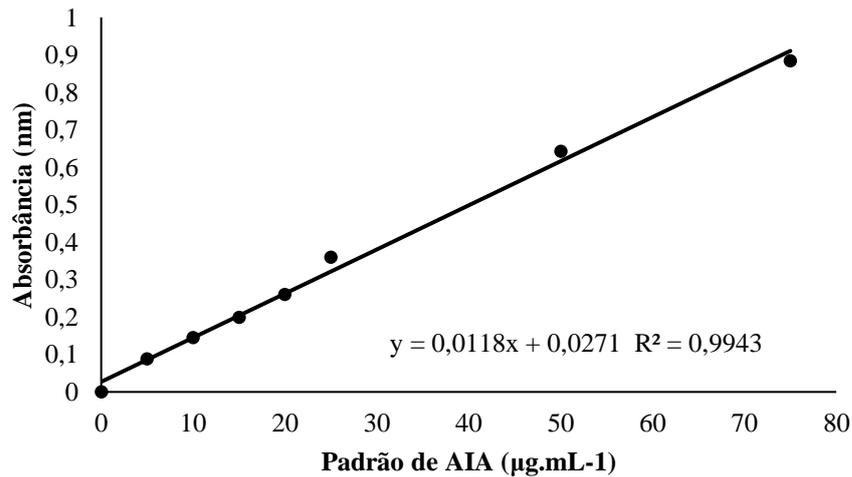
Para a identificação do potencial de promoção de crescimento dos isolados bacterianos, foram realizadas as seguintes análises: produção de ácido indol acético (AIA), solubilização de fosfato de alumínio, ferro e cálcio; produção de sideróforos, e presença do gene *nifH*. Para as análises de AIA e fosfato de alumínio e cálcio foi utilizado como controle positivo *Bacillus* sp. ERR680 (CHALITA et al., 2019) e BR3262 pertencente à coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia de Solos da Embrapa Roraima.

Produção de Ácido Indol Acético

Para quantificação da produção de Ácido Indol Acético (AIA) foi utilizado método adaptado de Cattelan (1999). Os isolados bacterianos de camu-camu e ERR680 foram semeadas em meio líquido DYGS e incubadas sob agitação por 48 horas. Destas soluções foi retirada uma alíquota de 5 μL e adicionadas a tubos contendo 5 mL de meio de cultura DYGS e 200 μL de L-triptofano a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, sendo incubados por 72 horas à 28 °C, no escuro. Após esse período, 1 mL das culturas foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos. Uma alíquota de 150 μL do sobrenadante de cada cultura foi transferida para microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo U com capacidade de 300 μL cada.

Em seguida, foram adicionados 100 μL do reagente de Salkowski (1 mL de tricloreto de ferrohexahidratado ($\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$) – 0,5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, em 50 mL de ácido perclórico (HClO_4) – (35 % em água) e acondicionado no escuro por 30 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 492 nm. Os dados da absorbância foram analisados posteriormente utilizando planilha eletrônica Calc de LibreOffice.

Para a construção da curva de calibração foi utilizado solução estoque 10mM (1,75 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) de AIA sintético, preparada com água destilada e adicionando aos poucos gotas de KOH para auxiliar na diluição. Essa solução foi diluída em concentrações crescentes de 0 a 100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em tubos contendo meio DYGS líquido e 200 μL de L-triptofano a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Alíquotas de 150 μL de cada diluição foram transferidas para microplacas de poliestireno de 96 poços de fundo U com capacidade de 300 μL cada. Em seguida, foram adicionados 100 μL de reagente Salkowski e acondicionado no escuro por 30 minutos a temperatura ambiente. A intensidade da coloração foi avaliada em comprimento de onda (λ) de 492 nm utilizando o espectrofotômetro em leitor de ELISA (Leitora Automática de Microplacas de 96 Poços - Mod. Tp Reader - ThermoPlate). Os dados da curva de calibração foram processados em planilha eletrônica e posteriormente plotados em um gráfico utilizando planilha eletrônica Calc de LibreOffice (Figura 1) (SARWAR, KREMER, 1995; RODRIGUES et al., 2007).

Figura 1. Curva de Calibração de Solução Padrão de AIA Sintético

Solubilização de fosfato

Foram utilizados 41 isolados bacterianos, sendo 40 isolados da cultura de camu-camu e um isolado ERR680 pertencente à coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia de Solos da Embrapa Roraima.

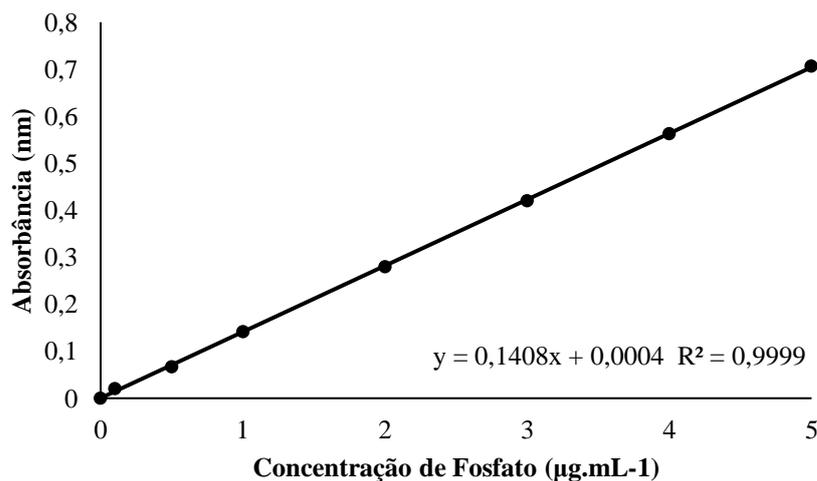
A identificação das bactérias solubilizadoras de fosfato foi realizada utilizando adaptação ao método proposto por Silva (1999), que consistem em utilizar meio NBRIP (10 g.L^{-1} de glicose; 2,5 mL.L^{-1} de solução de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10%; 5 g.L^{-1} de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g.L^{-1} de KCl; e 0,1 g.L^{-1} de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). Foram utilizadas três fontes de fósforo: de fosfato de alumínio (AlPO_4 (0,032 g.L^{-1})) em meio NBRIP líquido com pH 4,5, e fosfato de ferro ($\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3,62 g.L^{-1})) e de cálcio ($(\text{CaHPO}_4$ (2,6 g.L^{-1})) em meio NBRIP sólido com pH 7. As meios de fosfato de ferro e de fosfato de cálcio foi acrescido 15g de ágar para solidificação.

- *Fosfato de alumínio*: 50 mL de meio de cultura NBRIP foi adicionado em erlenmeyer de 125 mL, e acrescentado 0,0016 g de AlPO_4 e autoclavado por 15 minutos a 121 °C. Após esterilização, foram acrescentados ao meio líquido, os isolados com ajuda de alça de platina. Os tratamentos foram incubados a 28 °C com agitação por 5 dias, sendo utilizadas três repetições em cada tratamento. Após esse período, o pH das amostras foi aferido, e em seguida distribuídas em tubos Falcon para centrifugação a 5.000 g por 5 minutos. Em seguida, 5 mL do sobrenadante foram transferidos para copos descartáveis de 50 mL, e acrescentar 10 mL solução ácida de molibdato de amônio diluída e 30 mg de ácido ascórbico em pó. Agitar por um a dois minutos, deixar desenvolver a cor durante uma hora e efetuar a leitura por espectrofotometria (Spectrophotometer SP 2000 UV, BEL PROTONICS) em comprimento de onda (λ) a 660 nm. O controle consistiu em meio de cultura e o fosfato de alumínio em erlenmeyer, sem a presença

do inóculo. O delineamento foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 41x3 (40 bactérias inoculadas x três fontes de fosfatos), com três repetições cada.

Para a construção da curva de calibração foi utilizado meio NBRIP sem AlPO_4 com solução padrão de fósforo nas concentrações de 0 a 5 mg.L^{-1} em tubos 10 mL solução ácida de molibdato de amônio diluída e 30 mg de ácido ascórbico em pó. Promover a agitação por um a dois minutos, deixar desenvolver a cor durante uma hora e efetuar a leitura no espectrofotômetro em comprimento de onda (λ) a 660 nm. Os dados da curva de calibração foram processados em planilha eletrônica e posteriormente plotados em um gráfico utilizando planilha eletrônica Calc de LibreOffice (Figura 2).

Figura 2. Curva de Calibração de Solução Padrão de Fosfato Sintético



- *Fosfato de ferro:* 250 mL de meio NBRIP com 15 g de ágar foi autoclavado por 15 minutos a 121 °C em frascos de 500 mL. Ao meio ainda aquecido, em câmara de fluxo laminar, foi acrescentado o $\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($3,62 \text{ g.L}^{-1}$) e distribuído cerca de 20 mL em placas de petri. Após ser resfriado foi inoculado no centro da placa com ajuda de uma alça de platina. A Avaliação foi realizada após 7 e 10 dias para avaliação do aparecimento de halo ao redor do inoculante. O halo é medido com ajuda de um paquímetro digital. O controle consistiu em placa de Petri com meio de cultura e o fosfato de ferro, sem a presença do inóculo. O delineamento foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 27x2 (27 bactérias inoculadas x duas fontes de fosfatos), com três repetições.

- *Fosfato de cálcio:* 250 mL de meio NBRIP com 15 g de ágar e $2,6 \text{ g.L}^{-1}$ de CaHPO_4 foi autoclavado por 15 minutos a 121 °C em frascos de 500 mL. Com o meio ainda aquecido, em câmara de fluxo laminar foi distribuído cerca de 20 mL em placas de petri. Após ser resfriado foi inoculado no centro da placa com ajuda de uma alça de platina. A Avaliação foi realizada após 7 e 10 dias para avaliação do aparecimento de halo ao redor do inoculante. O halo é medido com ajuda de um paquímetro digital. O controle consistiu em placa de Petri com

meio de cultura e o fosfato de ferro, sem a presença do inóculo. O delineamento foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial 27x2 (27 bactérias inoculadas x duas fontes de fosfatos), com três repetições.

Produção de Sideróforos

Meio líquido de tripticaseína de soja (TSL) diluído 10 vezes, para o cultivo dos isolados bacterianos. Os microorganismos foram cultivados em Erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL de 1/10 TSL, a 28 °C por 48h, sob agitação constante (Cattelan, 1999).

Após o período de incubação, a solução foi centrifugada a 12.000 g por 10 min, coletada uma alíquota de 150 µL do sobrenadante e adicionada a placa Elisa de fundo U, e acrescido em seguida de 150 µL de solução CAS. As amostras foram preservadas por 1 hora à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As bactérias que apresentam mudança na coloração azul da solução CAS para amarelo, dentro de 15 min, foram consideradas produtores de sideróforos. Em seguida foram analisadas em espectrofotômetro a 630 nm (ARORA; VERMA, 2017), tomando como controle a solução de TSL 1/10 com solução CAS sem inoculante.

A fórmula para calcular o percentual de íons Fe³⁺ complexado (porcentagem de unidade de sideróforo – PSU), indicando o teor de sideróforos produzidos pelo microorganismo é indicado na equação a seguir:

$$PSU = \frac{A_r - A_s \times 100}{A_r}$$

Onde, A_r é a absorvância do controle (caldo de cultivo + solução CAS) e A_s a absorvância lida da amostra de microorganismo fermentado com solução CAS.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Micropropagação de clones superiores de camu-camu

O estudo permitiu verificar como os cinco genótipos corresponderam diante do mesmo processo de desinfestação e cultivo, à etapa de estabelecimento *in vitro*. Notou-se uma importante diferenciação na oxidação e contaminação fúngica entre os genótipos, se sobressaindo UAT07, seguido de UAT15, com menor percentual de oxidação *in vitro*, demonstrando maior resistência ao processo de desinfestação. A resistência e estabilidade do explante aos processos do cultivo *in vitro*, torna viável para as etapas posteriores de subcultivos. A contaminação bacteriana, no entanto, não apresentou diferenças significativas entre os clones (Tabela 1).

Tabela 1. Contaminação e oxidação de explantes de clones superiores de camu-camu na fase de estabelecimento *in vitro*.

Genótipos	Oxidação (%)	Percentual de Contaminação	
		Cont. Fúngica (%)	Cont. Bacteriana (%)
UAT07	47,5b	35,0b	87,5a
UAT10	75,0ab	57,5ab	95,0a
UAT15	50,0b	47,5ab	95,0a
UAT17	82,5a	80,0a	90,0a
UAT18	75,0ab	52,5ab	87,5a

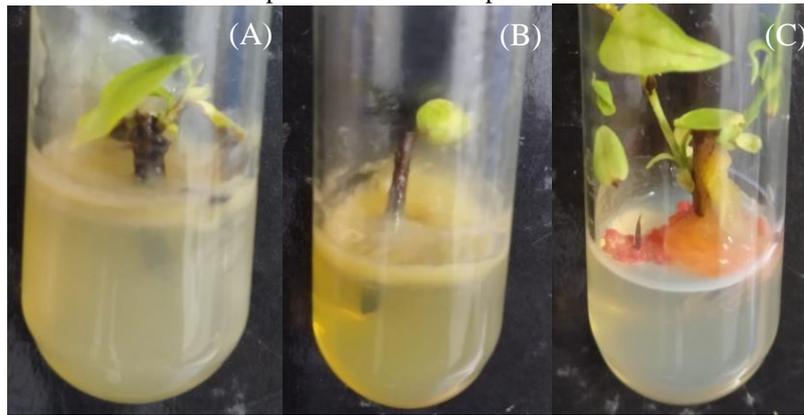
*Valores seguidos de letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Neste estudo, a manifestação bacteriana foi considerada alta, com mais de 80% de contaminação, resultados semelhantes foram reportados por Araújo et al. (2012), que apontam que, a contaminação bacteriana é a principal limitação para o estabelecimento da cultura *in vitro* de camu-camu.

O método de micropropagação clonal de plantas difere significativamente das tecnologias tradicionais por sua velocidade e alto coeficiente de reprodução, bem como pela possibilidade de obtenção de um material de plantio homogêneo e livre de vírus. No entanto, é preciso a melhoria de métodos para romper com a principal limitação para o estabelecimento *in vitro* de clones superiores de camu-camu atualmente: a contaminação fúngica e bacteriana (ARAÚJO et al., 2012; ARAÚJO et al., 2016; YABLONSKAYA, GINS, MOLCHANOVA, 2016).

Na Figura 3 é possível observar o crescimento *in vitro* de explantes com presença de bactérias, inoculados no mesmo período e sob as mesmas condições. Nas Figuras 3A e 3B é possível observar que houve importante crescimento bacteriano, e possivelmente está ocorrendo competição *in vitro* por nutrientes. Esse resultado vai de encontro com o observado por Leifert e Cassells (2001), Thomas et al (2007) e Costa, Sherwinski-Pereira e Otoni (2010), em que microrganismos endofíticos, podem agir tanto na promoção de crescimento *in vitro*, como também podem manifestar um comportamento de “patógeno *in vitro*” quando competem por nutrientes.

Figura 3. Crescimento do explante na presença de manifestação bacteriana: (A) Presença de bactéria de coloração creme; (E) Presença de bactéria de coloração amarela; (F) Presença de bactéria de coloração rosa opaco e amarela transparente.



Entretanto, nem todos os microrganismos se comportam da mesma maneira *in vitro*, como pôde ser observado na Figura 3C, onde os explantes com mesmo tempo de cultivo das Figuras 3A e 3B, teve crescimento proeminente na presença de bactéria. Neste caso, o microorganismo de pigmentação rosa opaca permanece apenas na base do explante. Diferente das figuras anteriormente relatadas, em que os microrganismos ocuparam todo o meio de cultura e promoveram mudança da coloração do meio, tendo, possivelmente, alterado sua composição, acidez e biodisponibilidade, a bactéria na Figura 3C se mostra interdependentes do explante e não do meio de cultura.

Esposito-Polesi (2020) descreve que a manifestação endofítica, geralmente não interfere no cultivo *in vitro*, no entanto, relata que algumas bactérias endofíticas podem mudar seu comportamento nas condições *in vitro*, devendo, nesses casos, complementar o meio de cultura com agentes antibacterianos de forma que minimize os danos na micropropagação.

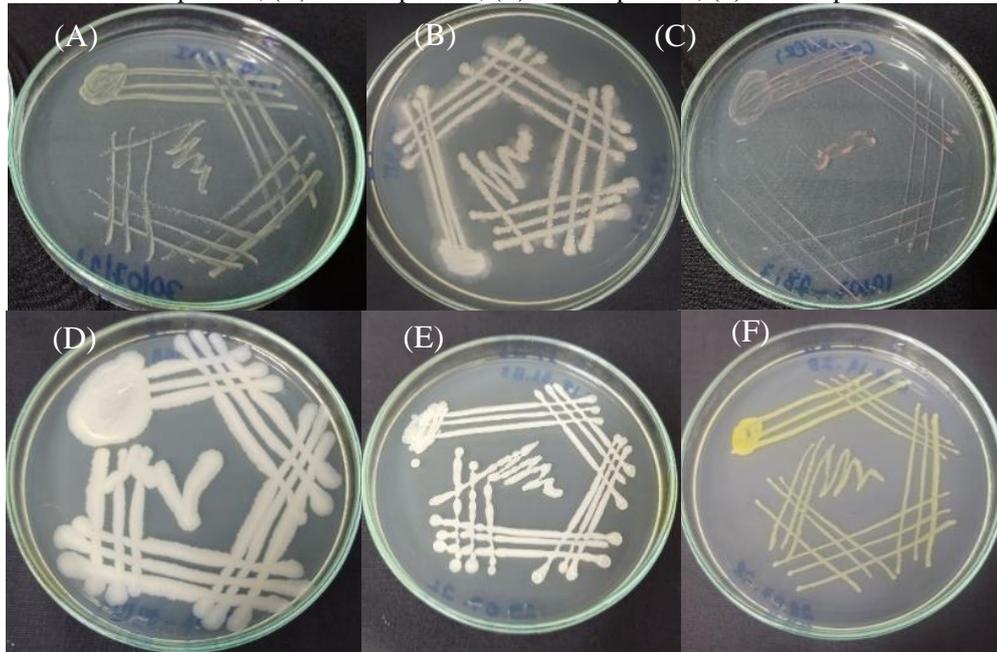
A contaminação microbiana impõe limitações à cultura de tecidos, culminando em perdas no cultivo *in vitro* e exigindo mudanças nos protocolos de desinfestação (SCHERWINSKI-PEREIRA; COSTA, 2010). Entretanto, Kidus e Teka (2020) destacam que é importante isolar e conhecer o comportamento dos microrganismos que se manifestam na cultura de tecidos, assim como identificar os que podem auxiliar na promoção de crescimento tanto *in vitro* quanto *ex vitro*. Diante disso, este estudo buscou isolar, identificar e avaliar o potencial de promoção de crescimento de plantas dessas bactérias, tendo em vista que podem favorecer o cultivo *in vitro* e, posteriormente, a fase de aclimação.

Isolamento, caracterização e identificação bactérias isoladas da cultura de tecidos de camu-camu

Os isolados bacterianos foram selecionados da micropropagação de cada genótipo de camu-camu estudados, para isolamento e identificação. Além do isolamento dos

microrganismos provenientes da contaminação *in vitro*, também foram isoladas cepas independentes da cultura de tecidos (Figura 4).

Figura 4. Isolados bacterianos da cultura de tecidos de camu-camu. (A) Morfotipo 18E; (B) Morfotipo 18D; (C) Morfotipo 18O; (D) Morfotipo 15A; (E) Morfotipo 18N; (F) Morfotipo 18L.



O estudo permitiu observar a diversidade entre os isolados bacterianos, com variações entre coloração, forma, brilho, transparência, consistência entre outros. Todos os isolados analisados apresentaram crescimento muito rápido, com aparecimento das colônias com apenas 1 dia de inoculação.

É importante destacar que não é possível identificar as cepas bacterianas com apenas sua caracterização morfológica, sendo necessário, no entanto, a identificação molecular e análises com antimicrobianos para melhor tomada de decisões no que diz respeito ao controle da manifestação *in vitro* na cultura de tecidos de camu-camu. Além disso, Dias et al (2009) e Moreira e Araújo (2013) relatam, além da identificação dos microrganismos, também é necessário avaliar seu potencial na promoção de crescimento, pois podem favorecer tanto o crescimento *in vitro* como *ex vitro*, especialmente na fase de aclimação e sua adaptação posteriormente no campo, que são etapas caracterizadas por grandes perdas. Nesse sentido, foi realizada a identificação baseada em sequência 16S rRNA, conforme descrito na Tabela 2:

Tabela 2. Valores de similaridade de seqüências de 16S rRNA das bactérias endofíticas da cultura de tecidos de camu-camu

Clone de Origem	Nomenclatura do isolado	Espécie mais Próxima	Identidade (%)
UAT0796	07A	<i>Erwinia sp. / Pantoea sp.</i>	95,79 / 95,72
UAT0796	07B	<i>Micrococcus yunnanensis / Micrococcus sp.</i>	95,99 / 95,99
UAT0796	07C	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>	95,64
UAT0796	07D	Não Identificado	-
UAT0796	07E	<i>Microbacterium foliorum</i>	97,96
UAT0796	07F	<i>Microbacterium foliorum</i>	95,62
UAT0796	07G	<i>Bacillus altitudinis</i>	97,81
UAT1096	10A	<i>Bacillus safensis / Bacillus altitudinis</i>	97,95 / 97,95
UAT1096	10B	Não Identificado	-
UAT1096	10C	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	97,76
UAT1096	10D	Não Identificado	-
UAT1096	10E	Não Identificado	-
UAT1096	10F	Não Identificado	-
UAT1596	15A	Não Identificado	-
UAT1596	15B	<i>Bacillus safensis</i>	97,96
UAT1596	15C	Não Identificado	-
UAT1596	15D	Não Identificado	-
UAT1596	15E	Não Identificado	-
UAT1596	15F	Não Identificado	-
UAT1796	17A	<i>Bacillus safensis / Bacillus pumilus</i>	96,01 / 95,95
UAT1796	17B	<i>Bacillus subtilis</i>	96,98
UAT1796	17C	<i>Enterobacter hormaechei / Enterobacter sp.</i>	97,37 / 97,30
UAT1796	17D	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	97,63
UAT1896	18A	Não Identificado	-
UAT1896	18B	<i>Bacillus safensis</i>	97,55
UAT1896	18C	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	98,66
UAT1896	18D	<i>Klebsiella pneumoniae / Klebsiella sp.</i>	97,85 / 97,84
UAT1896	18E	Não Identificado	-
UAT1896	18F	Não Identificado	-
UAT1896	18G	<i>Klebsiella pneumoniae / Klebsiella quasipneumoniae</i>	98,52 / 98,52
UAT1896	18H	<i>Bacillus safensis</i>	97,97
UAT1896	18I	Não Identificado	-
UAT1896	18J	<i>Brevundimonas sp.</i>	98,59
UAT1896	18K	<i>Bacillus sp. / Cytophila horneckiae</i>	96,61 / 96,61
UAT1896	18L	Não Identificado	-
UAT1896	18M	<i>Bacillus pumilus / Bacillus sp.</i>	98,35 / 98,35
UAT1896	18N	<i>Bacillus subtilis / Bacillus sp.</i>	94,88 / 94,84
UAT1896	18O	<i>Methylobacterium sp.</i>	95,31
UAT1896	18P	Não Identificado	-
UAT1896	18Q	Não Identificado	-

Neste estudo, o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA indicou semelhança com os gêneros *Erwinia*, *Micrococcus*, *Enterobacter*, *Microbacterium*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Stenotrophomonas*, *Brevundimonas* e *Methylobacterium* (Tabela 2). As espécies identificadas para a cultura de tecidos de camu-camu pela primeira vez, são amplamente citadas na literatura como bactérias promotoras de crescimento de plantas (Plant Growth-Promoting Bacteria – PGPB), como veremos a seguir.

Souza, Ambrosini e Passaglia (2015) destacam o potencial de bactérias pertencentes aos gêneros *Pantoea*, *Bacillus*, *Klebsiella* e *Pseudomonas*, entre outras, na promoção de crescimento de plantas como fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de sideróforos e de ácido indol acético.

Bettencourt et al. (2021) por sua vez, isolou da cultura de tecidos de *Eucalyptus urophylla*, cepas dos gêneros *Bacillus* e *Enterobacter*, e observaram que apresentavam potencial na promoção de crescimento, especialmente na fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção de amônio. Queiroz et al. (2020) também isolaram bactérias da cultura de tecidos de *Plinia peruviana*, tendo identificado os gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas* e suas características de bactérias promotoras de crescimento de plantas.

Segundo Alexander et al. (2019), plantas tratadas com *Stenotrophomonas maltophilia* tiveram aumento de auxina, osmoprotetores, compostos fenólicos totais e teor de flavonóides totais, além do aumento dos níveis de antioxidantes. Os autores ainda identificaram a presença do gene *nifH* na bactéria, confirmando seu potencial de fixação de nitrogênio, e destacam que interação de plantas com bactérias promotoras de crescimento de plantas melhora a saúde das plantas e a fertilidade do solo em muitos aspectos. Safdarpour e Khodakaramian (2019) afirmam que *Stenotrophomonas maltophilia* demonstrou ação antagonista contra fungos e de promoção de crescimento em condições *in vitro*, também aumentou a germinação de sementes e crescimento das plântulas. Ao analisar sua ação *in vivo*, a *S. maltophilia* reduziu os danos de doença fúngica provocada por *Verticillium dahliae* em tomateiro e melhorou o desenvolvimento das plantas em casa de vegetação. Nesse sentido, a *S. maltophilia* possui potencial de biocontrole e biofertilizante, podendo ser uma importante alternativa a produtos químicos.

As cepas *Klebsiella pneumoniae* e *K. quasipneumoniae*, isoladas da rizosfera de *Allium hookeri* Thwaites, foram testados para AIA, sideróforo e fixação de nitrogênio, atributos que podem qualificar o potencial de promoção de crescimento de plantas. O estudo mostra o aumento de comprimento e peso da raiz de *Allium hookeri*, após o tratamento com esses isolados, e maior solubilização de fosfato na presença de *K. quasipneumoniae* (Kshetri; Pandey; Sharma, 2018).

Liu et al (2018) observam que a biotização de sementes de soja com *K. pneumoniae* para o controle de nematoides, foi observado também potencial de promoção de crescimento de plantas com fixação de nitrogênio, produção de amônia, solubilização de fosfato e produção de sideróforos, favorecendo com sistema radicular bem desenvolvido e um aumento no peso fresco das plântulas de soja. Dutta et al. (2018) também apontam o potencial de promoção de crescimento da espécie bacteriana, além de indicar importante capacidade de eliminação de metais pesados.

Algumas espécies de *Brevundimonas* são rizobactérias conhecidas por sua tolerância a arsênio, sendo utilizada em estudos sobre biorremediação de solos. Além disso, há estudos

mostrando seu potencial na promoção de crescimento de plantas (SINGH et al., 2016; KUMAR; GERA, 2014).

Para Ranawat et al. (2021), a cepa *Enterobacter hormaechei* é uma solução verde para fertilizantes químicos, por seu potencial na fixação de N e solubilização de P e K insolúveis. Os autores observaram a inoculação de sementes de tomate *E. hormaechei* tiveram aumento de biomassa e o comprimento da parte aérea quando comparadas ao controle, favorecendo maior produtividade das culturas tratadas.

Já as bactérias do gênero *Methylobacterium sp.*, Abanda-Nkpwatt et al. (2006) as descrevem como onipresentes na natureza, pois provavelmente colonizam todas as plantas terrestres. Segundo os autores, as bactérias metilotróficas facultativos pigmentadas de rosa (pink-pigmented facultative methylotroph - PPFM), utilizam metanol gasoso emitido pelas plantas como fonte de carbono e energia, e em contrapartida promovem o crescimento de seu hospedeiro através da liberação de metabólitos. Grossi et al. (2020) classifica *Methylobacterium sp.* como promotora de crescimento de plantas (PGPR), e descreve seu potencial para aliviar o estresse salino e biocontrole contra *P. infestans*, *Botrytis cinerea* e *Fusarium graminearum* no cultivo *in vitro* de *Solanum tuberosum* L. cv., sugerindo uso de PPFM como estratégia potencial no manejo dessa cultura.

Kumar et al. (2016) afirmam que as bactérias metilotróficas possuem um papel significativo no ciclo biogeoquímico nos ecossistemas do solo, pois também melhoram a qualidade do ar usando compostos orgânicos voláteis, entre eles o diclorometano, formaldeído, metanol e o ácido fórmico. Os autores também descrevem que esse gênero possui potencial de promoção de crescimento de plantas por participar diretamente do ciclo de fósforo, nitrogênio e carbono.

Potencial de promoção de crescimento de endófitos bacterianos de camu-camu

A análise da produção de Ácido Indol acético (AIA) *in vitro* permitiu quantificar a capacidade dos isolados em produzir essa importante auxina, que está comumente associada a bactérias promotoras de crescimento. A capacidade de produção de AIA é usada como ponto de partida na seleção de bactérias promotoras de crescimento, assim como também a capacidade da produção de sideróforos, a solubilização de fosfato e a presença do gene *nifH* (YAN et al., 2018; TEIXEIRA et al. (2007).

A partir dos microrganismos isolados na seção anterior, provenientes da cultura de tecidos de camu-camu, foi analisado o comportamento quanto à capacidade de promoção de crescimento (Figura 5).

Tabela 3. Produção de AIA e Sideróforos, e Solubilização de Fosfato de Cálcio e Alumínio observada em isolados bacterianos da micropropagação de camu-camu*.

Isolado	AIA		Fosfato de Alumínio		Fosfato de Cálcio		Sideróforos
	($\mu\text{g.mL}^{-1}$) \pm DP	pH \pm DP	P (mg.L^{-1}) \pm DP	(%)**	IS	Classificação	PSU \pm DP
07A	8,35 \pm 0,32	3,94 \pm 0,13	0,627 \pm 0,01	25,73%	0,00 \pm 0,00	ND	58,91 \pm 0,92
07B	13,81 \pm 0,51	4,22 \pm 0,06	0,447 \pm 0,01	14,49%	0,00 \pm 0,00	ND	60,01 \pm 1,75
07C	2,53 \pm 0,01	3,33 \pm 0,08	0,968 \pm 0,01	47,04%	0,00 \pm 0,00	ND	43,01 \pm 0,61
07D	14,48 \pm 0,17	4,58 \pm 0,2	0,267 \pm 0,03	3,24%	0,00 \pm 0,00	ND	44,12 \pm 0,42
07E	10,05 \pm 1,53	4,37 \pm 0,13	0,151 \pm 0,05	4,74%	0,00 \pm 0,00	ND	43,59 \pm 0,82
07F	6,71 \pm 0,43	4,2 \pm 0,09	0,220 \pm 0,04	0,00%	0,00 \pm 0,00	ND	41,80 \pm 1,13
07G	0,73 \pm 0,00	4,26 \pm 0,04	0,568 \pm 0,01	22,03%	1,62 \pm 0,082	Baixo	47,41 \pm 1,25
10A	13,13 \pm 0,21	3,91 \pm 0,25	0,542 \pm 0,03	20,40%	0,00 \pm 0,00	ND	45,85 \pm 0,78
10B	13,83 \pm 0,11	3,85 \pm 0,06	0,577 \pm 0,02	22,62%	0,00 \pm 0,00	ND	45,33 \pm 0,72
10C	3,18 \pm 0,01	4,33 \pm 0,012	0,170 \pm 0,04	2,83%	0,00 \pm 0,00	ND	62,43 \pm 0,78
10D	2,59 \pm 0,00	4,14 \pm 0,2	0,464 \pm 0,07	15,52%	0,00 \pm 0,00	ND	41,86 \pm 1,11
10E	4,40 \pm 0,00	4,26 \pm 0,06	0,191 \pm 0,00	1,49%	0,00 \pm 0,00	ND	65,84 \pm 0,17
10F	3,30 \pm 0,01	3,15 \pm 0,28	0,108 \pm 0,03	0,68%	3,04 \pm 0,19	Médio	93,82 \pm 1,11
15A	2,87 \pm 0,17	5,18 \pm 0,77	0,480 \pm 0,00	16,56%	0,00 \pm 0,00	ND	28,74 \pm 0,89
15B	5,90 \pm 0,14	3,69 \pm 0,04	0,464 \pm 0,04	15,52%	0,00 \pm 0,00	ND	11,98 \pm 1,81
15C	1,77 \pm 0,01	4,13 \pm 0,13	0,274 \pm 0,01	3,68%	0,00 \pm 0,00	ND	38,22 \pm 1,49
15D	0,19 \pm 0,00	4,31 \pm 0,02	0,125 \pm 0,00	0,78%	0,00 \pm 0,00	ND	62,03 \pm 0,87
15E	0,90 \pm 0,00	3,36 \pm 0,04	0,213 \pm 0,00	1,33%	3,09 \pm 0,27	Médio	61,34 \pm 0,63
17A	7,93 \pm 0,41	3,6 \pm 0,03	0,629 \pm 0,06	25,88%	0,00 \pm 0,00	ND	69,77 \pm 1,02
17B	2,36 \pm 0,00	3,59 \pm 0,42	0,250 \pm 0,00	2,20%	0,00 \pm 0,00	ND	68,68 \pm 1,22
17C	4,99 \pm 0,01	3,34 \pm 0,03	0,421 \pm 0,07	12,86%	3,97 \pm 0,31	Médio	30,07 \pm 1,02
17D	5,56 \pm 0,02	3,25 \pm 0,00	0,890 \pm 0,01	42,15%	2,47 \pm 0,27	Médio	0,91 \pm 0,17
18A	10,44 \pm 0,43	2,77 \pm 0,05	0,156 \pm 0,01	3,36%	0,00 \pm 0,00	ND	50,51 \pm 1,00
18B	8,86 \pm 0,46	3,75 \pm 0,28	0,587 \pm 0,01	23,22%	0,00 \pm 0,00	ND	31,22 \pm 0,80
18C	1,57 \pm 0,08	2,88 \pm 0,06	1,429 \pm 0,13	75,89%	3,54 \pm 0,48	Médio	61,56 \pm 1,10
18D	0,00 \pm 0,00	3,02 \pm 0,06	0,930 \pm 0,06	44,67%	0,00 \pm 0,00	ND	56,36 \pm 0,53
18E	5,50 \pm 0,48	3,13 \pm 0,03	1,181 \pm 0,03	60,35%	0,00 \pm 0,00	ND	75,67 \pm 0,44
18F	4,57 \pm 0,52	3,14 \pm 0,03	1,074 \pm 0,071	53,70%	0,00 \pm 0,00	ND	61,91 \pm 0,44
18G	0,00 \pm 0,00	3,19 \pm 0,02	1,074 \pm 0,11	53,70%	0,00 \pm 0,00	ND	48,04 \pm 0,50
18H	8,47 \pm 0,36	3,64 \pm 0,07	0,393 \pm 0,06	11,08%	1,50 \pm 0,08	Baixo	42,84 \pm 1,40
18I	10,70 \pm 1,30	4,11 \pm 0,04	0,1607 \pm 0,07	10,05%	0,00 \pm 0,00	ND	26,31 \pm 0,35
18J	8,07 \pm 0,77	4,32 \pm 0,04	0,2483 \pm 0,02	15,52%	0,00 \pm 0,00	ND	67,92 \pm 0,46
18K	5,05 \pm 0,86	4,51 \pm 0,05	0,0353 \pm 0,00	2,20%	0,00 \pm 0,00	ND	16,08 \pm 0,52

18L	15,39 ± 1,37	4,34 ± 0,06	0,0343 ± 0,03	2,14%	0,00 ± 0,00	ND	40,55 ± 0,50
18M	0,00 ± 0,00	3,67 ± 0,04	0,3454 ± 0,04	21,59%	1,37 ± 0,09	Baixo	58,45 ± 0,20
18N	11,26 ± 1,04	3,81 ± 0,07	0,4330 ± 0,01	27,06%	0,00 ± 0,00	ND	64,17 ± 0,36
18O	7,62 ± 0,85	3,98 ± 0,04	0,2341 ± 0,03	14,63%	0,00 ± 0,00	ND	30,24 ± 0,87
18P	4,77 ± 0,02	4,00 ± 0,00	1,1574 ± 0,10	72,34%	0,00 ± 0,00	ND	53,42 ± 0,53
18Q	4,82 ± 0,01	4,04 ± 0,13	0,2009 ± 0,05	12,56%	0,00 ± 0,00	ND	35,15 ± 0,30
ERR680	6,09 ± 0,60	3,39 ± 0,02	0,5206 ± 0,01	32,54%	1,81 ± 0,03	Baixo	17,95 ± 1,80
BR 31223	-	-	-	-	-	-	28,53 ± 1,05

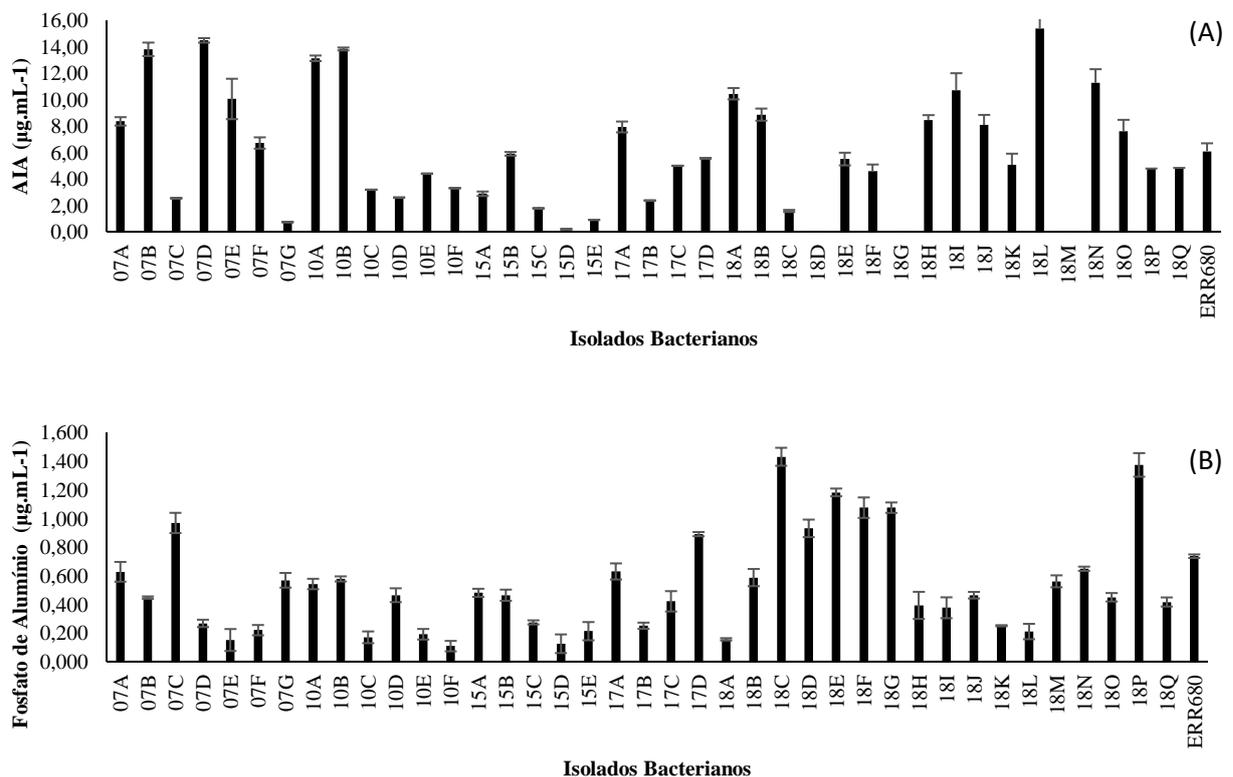
*Cada valor representa a média de três repetições e os desvios padrão da média; **Percentual de solubilização de fosfato insolúvel *in vitro*, com base na concentração disponibilizada de AlPO_4 ($1,6 \text{ g.L}^{-1}$).

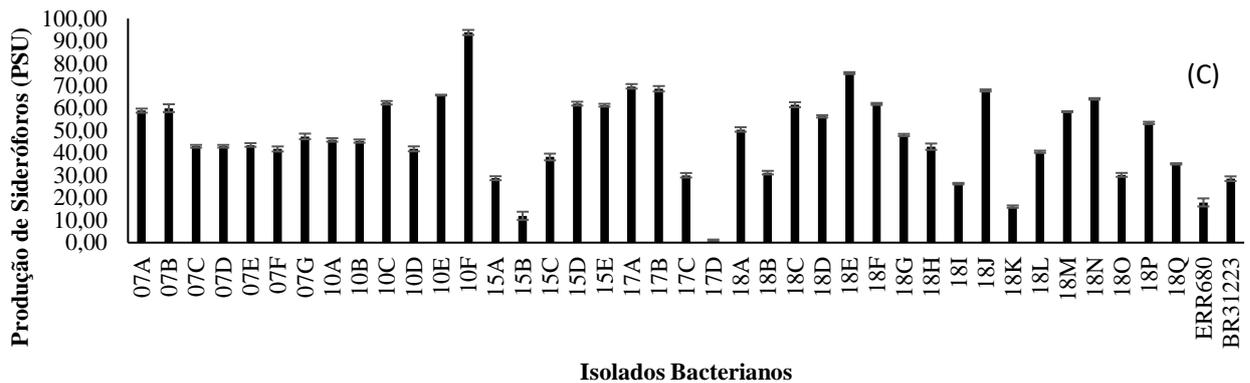
Assim como a capacidade da produção de AIA, a solubilização de fosfato por bactérias endofíticas e a presença do gene *nifH* são analisados quando se deseja conhecer o potencial na promoção de crescimento (Yan et al., 2018).

Notou-se que os isolados 07B, 07D, 10A, 10B e 18L apresentaram melhor capacidade de produção de AIA, sendo superior a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. A cepa 18L apresentou a maior produção de AIA ($13,95 \mu\text{g mL}^{-1}$), no entanto, a solubilização de fosfato foi um dos menores percentuais entre as demais cepas analisadas ($0,0343 \text{ mg L}^{-1}$, 2,15%). De modo geral, foi possível observar uma relação inversamente proporcional entre a produção de AIA e solubilização de fosfato. Quando analisados os isolados 18D, 18G, 18M e 18C, notou-se que estão entre os que apresentaram maior solubilização de fósforo, e, no entanto, tiveram baixa produção de AIA. O isolado 15B e 17A foram os que tiveram melhor equivalência entre as duas análises (Tabela 3).

Abaixo, na Figura 5, estão plotados no gráfico os resultados da Tabela 3. Nota-se que os isolados 07B, 07D, 07E, 10A, 10B, 18A, 18I, 18L e 18M apresentaram melhor capacidade de produção de AIA, sendo superior a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. A cepa 18L apresentou a maior produção de AIA ($15,39 \mu\text{g mL}^{-1}$), no entanto, a solubilização de fosfato foi um dos menores percentuais entre as demais cepas analisadas ($0,0343 \text{ mg L}^{-1}$, 2,15%)

Figura 5. Produção de AIA (A), Solubilização de Fosfato (B) e Produção de Sideróforos (C) observada em isolados bacterianos obtidos da micropropagação de camu-camu*.





De modo geral, foi possível observar uma relação inversamente proporcional entre a produção de AIA e solubilização de fosfato. Quando analisados os isolados 18D, 18G, 18M e 18C, notou-se que estão entre os que apresentaram maior solubilização de fósforo, e, no entanto, tiveram baixa produção de AIA. O isolado 17A foi o que teve melhor equivalência entre as três análises (Tabela 3; Figura 5).

Esse resultado também foi observado por Dias et al. (2009), com bactérias isoladas de mudas de morangos micropropagadas, sugerindo que as combinações entre esses microrganismos resultem em efeitos complementares ao desenvolvimento da planta. De modo semelhante, Yan et al. (2018), relatam que entre as bactérias endofíticas, nenhuma possuía todas as características de promoção de crescimento ao mesmo tempo, e sugere, portanto, que a promoção de crescimento da planta no ambiente não é impulsionada por uma única espécie, mas por várias bactérias simbióticas.

A análise da produção de sideróforos realizada pelo método de microplacas proposto por Arora e Verma (2017), permitiu análise não apenas qualitativa, mas também quantitativa, como pode ser observada na Tabela 3 e Figura 5C. Esta pesquisa observou que 38 dos 40 isolados apresentaram produção de sideróforos, e teve como destaque os isolados 10F e 18E, com 93,82 e 75,67 por cento de unidades de sideróforos (PSU), respectivamente.

O fósforo é um elemento essencial, e, depois do nitrogênio, é um dos nutrientes que mais limitam a produção agrícola, sendo encontrado na forma insolúvel, geralmente ligado cálcio, ferro e alumínio, o que o torna indisponível às plantas. O emprego de bactérias solubilizadoras é uma das alternativas para minimizar este problema, considerando que são capazes de transformar o fósforo insolúvel em solúvel e disponibilizar para as plantas (VAZQUEZ et al., 2000; BRAZ, NAHAS, 2012).

O Estado de Roraima possui, de modo geral, solos de pH ácido e baixa disponibilidade de nutrientes, entre eles o fósforo e outros nutrientes, sendo comumente necessário o emprego de adubos para o desenvolvimento da agricultura (MELO et al, 2017; MIRANDA, ABSY,

2000). Neste estudo foi possível identificar bactérias com potencial para solubilização de fosfato, as quais poderão ser empregadas não somente no camu-camu, mas também a outras culturas, concomitante ou como alternativa à adubação. Como microrganismo padrão, foi utilizado ERR680, isolado de raízes de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) e identificado como pertencente ao gênero *Bacillus*. Este estudo permitiu confirmar o potencial para solubilização de fosfato e produção de AIA na presença de triptofano observado por Chalita et al. (2019).

A solubilização de fosfato foi relatada por Johnston (1952), que identificou como mecanismo a produção de diferentes ácidos orgânicos por microrganismos, sendo responsáveis pelo aumento do potencial de solubilização do fosfato insolúvel. Vazquez et al. (2000) descreve a produção de diversos ácidos orgânicos, voláteis e não voláteis por microrganismos solubilizadores de fosfato, a saber: ácidos láctico, succínico, isobutírico, isovalérico, acético, butírico e capróico.

A produção de ácidos orgânicos pode explicar a alteração no pH descrita na Tabela 3, onde a cepa identificada como 18C reduziu o pH de 4,50 para 2,80 e teve maior potencial de solubilização, correspondendo a 75% do fosfato insolúvel disponibilizado *in vitro*. Essa redução no pH também pode ser observada na 18A, sendo o isolado que mais acidificou o meio (pH 2,77) e, no entanto, foi a que apresentou um dos menores potenciais de solubilização do fosfato de alumínio (3,36%).

Isso pode ser explicado pela afinidade entre os ácidos orgânicos produzidos pelo microrganismo e o metal disponibilizado (Al^{3+}), pois ácidos orgânicos com apenas um grupo carboxílico (láctico, glucônico, propiônico, fumárico, acético) tem baixa capacidade de complexação, enquanto que os ácidos com dois ou mais grupos carboxílicos (málico, oxálico, tartárico, succínico, cítrico) possuem maior capacidade de complexação (MARRA, 2012; JONES, 1998). Faz-se necessário, portanto, identificar a composição dos ácidos orgânicos produzidos, especialmente pelas cepas ressaltadas, para maximização do processo de solubilização.

Na análise de solubilização de fosfato de ferro em meio sólido, houve crescimento bacteriano, mas não houve formação de halos de solubilização como era esperado. A análise não foi responsiva nem mesmo para o microrganismo padrão utilizado (ERR 680), entretanto, o estudo de Chalita (2019) não utilizou como fonte o fosfato de ferro, apenas fosfato de alumínio e cálcio. Similar ao resultado encontrado pelo autor, nesta pesquisa o microrganismo ERR680 apresentou baixa solubilização de fosfato de cálcio em meio sólido.

Bashan, Kamnev, e de-Bashan (2013) e também Costa e Melo (2005), sugerem a combinação de duas ou três fontes de fosfatos e diferentes meios, sejam líquidos ou sólidos, que permitam identificar melhor bactérias com capacidade de solubilizar fosfato. Os autores ainda relatam o uso de fosfato de cálcio para solos alcalinos, o fosfato de ferro e o fosfato de alumínio para solos ácidos e o uso de fitatos para solos ricos em fósforo orgânico. Ademais, recomendam a identificação das bactérias com abundante produção de ácidos orgânicos.

É interessante observar que não apenas endofíticos apresentam essa característica, mas há também cepas epifíticas que podem favorecer o desenvolvimento e adaptação das plantas de interesse, sugerem Madhaiyan et al. (2005). Os autores utilizaram cepas de bactérias metilotróficas facultativas pigmentadas de rosa (Pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria - PPFMs) isoladas de cana-de-açúcar como bioinoculantes na germinação de sementes e pulverização sobre a folhagem. O estudo permitiu observar aumento na taxa de germinação da semente, no crescimento inicial da cana-de-açúcar, no conteúdo de citocinina, assim como no aumento no rendimento da cana e na qualidade do açúcar.

Neste estudo, identificou-se uma das cepas como *Methylobacterium sp.*, que apresenta coloração rosa transparente, que foi observado seu comportamento na cultura de tecidos onde sua presença junto ao explante não demonstrou competição pelo meio de cultura nem modificando sua característica como foi observado com outras bactérias. Sua presença pode favorecer o crescimento do explante e brotação, considerando seu potencial na produção ou síntese de hormônios vegetais (MADHAIYAN et al., 2005).

A promoção de crescimento das plantas é um fenômeno impulsionado por uma relação benéfica entre planta e microrganismos, e segundo Qin et al. (2014) relata, há uma relação direta da presença desses microrganismos com as adaptações das plantas aos diferentes ambientes de cultivo, favorecendo o crescimento das plantas hospedeiras em ambientes desfavoráveis.

Nesse sentido, considerando que o camu-camu é uma espécie que ocorre naturalmente às margens de rios e lagos da Região Amazônica, e que como alternativa para a exploração econômica da espécie, os clones superiores selecionados para esse estudo foram adaptados às condições de terra firme em floresta de transição do estado de Roraima da Serra da Prata em Mucajaí (VILENA et al., 2018; ALMEIDA et al, 2014). É interessante avaliar a atuação dos microrganismos promotores de crescimento, na germinação de sementes, desenvolvimento da planta e sua ação antagônica frente a fitopatógenos, entre outros, de modo a identificar a função deles na adaptação e promoção de crescimento. Do mesmo modo, conhecer o seu potencial na biotização, a fim de identificar seu potencial no aumento da taxa de sobrevivência *in vitro*,

promoção de crescimento dos explantes e redução de perdas na fase de aclimação (QIN et al., 2014; DIAS et al., 2009; YAN et al., 2018; COSTA; MELO, 2005; KUSS et al., 2007).

CONCLUSÕES

Foi identificado 40 isolados de bactérias endófitas durante a micropropagação de cinco clones superiores de cacarí.

Trinta e quatro isolados bacterianos apresentaram produção de ácido indol acético (AIA) *in vitro*. Todos os isolados realizaram solubilização de fosfato de alumínio. A solubilização de fosfato de cálcio em meio sólido foi detectada em apenas sete dos 40 isolados, e variou entre baixa e média capacidade de solubilização. A análise de produção de sideróforos foi detectada em 38 dos 40 isolados. A análise para identificação das cepas com potencial para fixação de nitrogênio em plantas não identificou presença do gene *nifH* em nenhum dos isolados.

Este trabalho permitiu observar o potencial de promoção de crescimento de plantas das bactérias isoladas da cultura de tecidos de camu-camu, podendo ser uma alternativa futura aos fertilizantes químicos utilizados na agricultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, M. da C. R.; CASTRO, A. M.; CHAGAS, E. A.; SILVA, M. L. da; FLORES, P. S.; SILVA, S. da. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de segmentos caulinares de camu-camuzeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 22, 2012, Bento Gonçalves. Anais. 13692 SP.

ARAÚJO, M. C. R.; VENDRAME, W. A.; CHAGAS, E. A.; RIBEIRO, M. I. G.; VILACA, R. Preliminary Studies On *In vitro* Propagation of Camu-Camu (*Myrciaria dúbia*), an Important Medicinal Plant. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**. 128:52-54. 2015.

ARAÚJO, M. C. R.; CHAGAS, E. A.; RIBEIRO, M. I. G.; PINTO, S. T. S.; CHAGAS, P. C.; VENDRAME, W.; MOTA FILHO, A. B.; SOUZA, O. M. Micropropagation of caçari under different nutritive culture media, antioxidants, and levels of agar and pH. **African Journal of Biotechnology**. Vol. 15(33), pp. 1771-1780, 17 August, 2016. DOI: 10.5897/AJB2016.15417.

ARAÚJO, M. C. R.; Callus induction and pro-embryogenic mass formation in *Myrciaria dubia*, an important medicinal and nutritional plant. **Crop Breeding and Applied Biotechnology (Online)**, v. , p. , 2021.

Arora NK, Verma M. Modified microplate method for rapid and efficient estimation of siderophore produced by bacteria. 3 **Biotech**. 2017 Dec;7(6):381. doi: 10.1007/s13205-017-1008-y. Epub 2017 Oct 26. PMID: 29109926; PMCID: PMC5658296.

ALMEIDA, L. F. P.; YUYAMA, K.; CHAGAS, E. A.; LOZANO, R. M. B.; ALBUQUERQUE, T. C. S.; RODRIGUEZ, C. A.; QUEIROZ, F. B. Early Evaluation of Camu-Camu Subsamples in Transition Savanna/Forest Area. **Journal of Agricultural Science**, v. 6, p. 178-186, 2014.

BASHAN, Y.; KAMNEV, A. A.; DE-BASHAN, L. E. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. **Biology and Fertility of Soils** (2013) 49:465–479. DOI 10.1007/s00374-012-0737-7.

BRAZ, R. R.; NAHAS, E. Synergistic action of both *Aspergillus niger* and *Burkholderia cepacea* in co-culture increases phosphate solubilization in growth medium. **Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Letters**, Volume 332, Issue 1, July 2012, Pages 84–90. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2012.02580.x.

CATTELAN, A. J. Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal. Londrina: Embrapa Soja, 1999. 36p. ISSN: 1516-781X.

CHAGAS, E. A.; CARVALHO, A. S. C.; BACELAR-LIMA, C. G.; DUARTE, O. R.; NEVES, L. C.; ALBUQUERQUE, T. C. S. Ocorrência e distribuição geográfica de populações nativas de camu-camu no estado de Roraima. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2012, 22, Bento Gonçalves, Anais... Bento Gonçalves, RS: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 22. 2012.

CHAGAS, E. A.; FLORES, P. S.; CHAGAS, P. C.; COUCEIRO, M. A.; PASQUAL, M.; PIO, R.; ARAÚJO, M. C. R.; SILVA, M. L. Frutas nativas da Amazônia. In Pasqual, M. Chagas, E. A. Cultura de tecidos em espécies frutíferas. Boa Vista: Editora da UFRR, 2014. 280 p.

CHAGAS, E. A.; LOZANO, R. M. B.; CHAGAS, P. C.; LIMA, C. G. B.; GARCIA, M. I. R.; OLIVEIRA, J. V.; SOUZA, O. M.; MORAIS, B. S.; ARAUJO, M. C. R. Intraspecific variability of camu-camu fruit in native populations of northern Amazonia. **Crop Breeding and Applied Biotechnology (Online)**, v.15, p.265 - 271, 2015.

CHALITA, P. B.; FARIAS, E.; DO N. C.; COSTA, I. B. DA; SOUSA, B. F.; SANTOS, M. A. O.; ALBUQUERQUE, T. C. S.; VITAL, M. J. S.; SILVA, K. Characterization of bacterial endophytes from the roots of native and cultivated Brazil nut trees (*Bertholletia excelsa*). **Acta Amazonica** v. 49, n.4, p. 257 – 267, 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/1809-4392201804831>.

CID, L. P. B. Cultivo *in vitro* de plantas. 3ª ed.amp. – Brasília, DF: Embrapa, 2014. 325 p. Dias et al (2008)

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. p.17-51. in Cid, L. P. B. Cultivo *in vitro* de plantas. 3ª ed. ampl. - Brasília, DF: Embrapa, 2014. 325p.

COSTA, F. E. C.; MELO, I. S. ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS À PALMA E PROSPECÇÃO DO POTENCIAL DE SOLUBILIZAR FOSFATO E FIXAR NITROGÊNIO. **Agrotrópica** 17: 23 - 26. 2005. Centro de Pesquisas do Cacau, Ilhéus, Bahia, Brasil.

COSTA, M. G. C.; SHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; OTONI, W. C. Importância das contaminações e dos microrganismos endêmicos na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. In SHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. 446p.

DIAS; A. C. F.; COSTA, F. E. C.; ANDREOTE, F. D.; LACAVA, P. T.; TEIXEIRA, M. A.; ASSUMPCÃO, L. C.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; MELO, I. S. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** (2009) 25:189–195. DOI 10.1007/s11274-008-9878-0

EMBRAPA RORAIMA. Procedimento Operacional Padrão Técnico para Caracterização de Culturas Bacterianas. Protocolo 005.POP.005.LMS, Embrapa Roraima 2005.

- ESPOSITO-POLESI, N. P. Microrganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 9, n. 4, p. 533-541, out./dez. 2011.
- 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** (2017) 74:103–113 DOI 10.1007/s00284-016-1163-0.
- ESPOSITO-POLESI, N. P. Artigo de Revisão / Review Paper Contaminação versus manifestação endofítica: implicações no cultivo *in vitro* de plantas. **Rodriguésia** 71: e00562018. 2020. DOI: 10.1590/2175-7860202071072.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: A Computer Statistical Analysis System. **Ciência e Agrotecnologia, Lavras**, V.35, n.6, p.1039-1042, 2014.
- GRIGIO, M. L.; MOURA, E. A.; CHAGAS, E. A.; DURIGAN, M. F. B.; CHAGAS, P. C.; CARVALHO, G. F.; ZANCHETTA, J. J. Bioactive compounds in and antioxidant activity of camu-camu fruits harvested at different maturation stages during postharvest storage. **Acta Scientiarum. Agronomy**, vol. 43, e50997, 2021. 10.4025/actasciagron.v43i1.50997.
- JONES, D. L. Organic acids in the rhizosphere: a critical review. *Plant and Soil*. **The Hague**, v.205, p.25-44, 1998.
- Johnston, H. W. The solubilization of phosphate. I, The action of various organic compounds on dicalcium and tricalcium phosphates. **Reprinted from the Zealand Journal of Science and Technology**, Section B, Vol. 33, N°. 6, May, 1952.
- KIDUS, T.; TEKA, Z. Isolation, Characterization and Identification of Contaminant Bacteria from Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) *in vitro* Culture in Tigray Biotechnology Center, Mekelle, Ethiopia. **Journal of Bacteriology and Parasitology**, Vol.11 Iss.3 No: 1000372. 2020.
- KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M. L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético *in vitro* por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 42 (10), Out 2007. DOI: 10.1590/S0100-204X2007001000013.
- LEIFERT, C.; CASSELLS, A. C. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 2001. 37: 133–138.
- LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. **Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology**, vol. 1815, © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature, 2018. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4>.
- MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; LEE, H. S.; HARI, K.; SUNDARAM, S. P.; SA, T. M. Pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria accelerate germination, growth and yield of sugarcane clone Co86032 (*Saccharum officinarum* L.). **Biology and Fertility of Soils** (2005) 41: 350–358. DOI: 10.1007/s00374-005-0838-7.
- MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. IMPORTÂNCIA DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO E DE BIOCONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS PARA UMA AGRICULTURA SUSTENTÁVEL. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica*, Recife, vol. 1, p.89-111, 2004.
- MARRA, L. M. SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS POR BACTÉRIAS E SUA CONTRIBUIÇÃO NO CRESCIMENTO DE LEGUMINOSAS E GRAMÍNEAS. (Tese de Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras (UFLA). Lavras/MG. 2012. 142p.

- MELO, V. F.; SILVA, D. T.; EVALD, A.; ROCHA, P. R. R. Qualidade química e biológica do solo em diferentes sistemas de uso em ambiente de savana. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 11, n. 2, p. 101-110, abril-junho, 2017
- MIRANDA, I. S.; ABSY, M. L. FISIONOMIA DAS SAVANAS DE RORAIMA, BRASIL. **Acta Amazônica**, 30 (3): 423-440. 2000.
- NASCIMENTO, O. V.; SILVA, E. L. CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia* (HBK) McVaugh), a small Amazonian fruit rich in vitamin C and a supplement for immunity. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. e27810615877, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i6.15877.
- OLIVEIRA, H. S.; LEMOS, O. F.; MIRANDA, V.S.; MOURA, H.C.P.; CAMPELO, M.F.; SANTOS, L.R.R. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de brotos no processo de micropropagação de cultivares de bananeira (*Musa* spp.). **Acta Amazônica**. vol. 41(3) 2011: 369 – 376
- OLIVEIRA, A. S. Impacto do consumo de camu-camu (*Myrciaria dubia* (Kunth) Mc Vaugh) em adultos com síndrome metabólica em Boa Vista/RR. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2015. 80f
- QUAMBUSCHET, M.; PIRTTILÄ, 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**, Volume 34, 524–533, 2014. DOI:10.1093/treephys/tpu027.
- QUAMBUSCHET, M.; WINKELMANN, T. Bacterial Endophytes in Plant Tissue Culture: Mode of Action, Detection, and Control. In LOYOLA-VARGAS, V.M.; OCHOA-ALEJO, N. **Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology**, vol. 1815. ©Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature, 2018. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4>.
- QIN, S.; ZHANG, Y.; YUAN, B.; XU, P.; XING, K.; WANG, J.; JIANG, J. Isolation of ACC deaminase-producing habitat-adapted symbiotic bacteria associated with halophyte *Limonium sinense* (Girard) Kuntze and evaluating their plant growth-promoting activity under salt stress. **Plant Soil** (2014) 374:753–766. DOI 10.1007/s11104-013-1918-3.
- RYAN, R. P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D. J.; DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Letters**, 278 (2008) 1–9.
- RODRIGUES, E. P.; OLIVEIRA, A. L. M.; VIDAL, M. S.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; BALDANI, J.I. Obtenção e Seleção de Mutantes Tn5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Pal 5) com Alterações na Produção de Auxinas. **Seropédia: Embrapa Agrobiologia**, 2007. 20p.
- SARWAR, M.; KREMER, R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, 1995, 20, 282-285.
- SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; COSTA, F. H. S. Estratégias de seleção e uso de substâncias químicas microbianas para o controle de contaminantes da cultura de tecidos de plantas. In SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. 446p.
- SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. 446p.
- MOREIRA, A. L. L.; ARAÚJO, F. F. BIOPROSPECÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus* spp. COMO POTENCIAIS PROMOTORES DE CRESCIMENTO DE *Eucalyptus urograndis*. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.37, n.5, p.933-943, 2013.

- SILVA, A. V. S.; VILENA, J. O.; CHAGAS, E. A.; ARAÚJO, M. C. R.; GRIGIO, M. L.; GARCIA, M. I. R. Desempenho adaptativo de clones de caçari (*Myrciaria dubia*) em condições de terra firme no Estado de Roraima. Anais do XXX CBA Congresso Brasileiro de Agronomia. 12 a 15/Setembro/2017, Fortaleza-CE.
- SILVA, F. C. Manual de Análises Químicas de Solos, Plantas e Fertilizantes. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999. 370p.
- SILVA, M. L. da. Desinfestação e estabelecimento de sementes de *Myrciaria dubia* (H. B. K.) McVaugh germinadas *in vitro*. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Roraima. Boa Vista, 2012. 55 p.
- SILVA, M. L.; YUYAMA, K. Propagação vegetativa de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) utilizando estacas de diâmetro diferentes submetidas a diferentes concentrações de ácido naftaleno acético – ANA. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 51, 2000, Brasília, DF. Resumos. Manaus: SBB, 2000. p. 88.
- SUGUINO, E.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; ARAÚJO, P. S. R.; SIMÃO, S. Propagação vegetativa de camu-camu por meio de enxertia intergenérica na família Myrtaceae. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 12, p. 1477-1482, dez. 2003.
- VAZQUEZ, P.; HOLGUIN, G.; PUENTE, M. E.; LOPEZ-CORTES, A.; BASHAN, Y. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. **Biology and Fertility of Soils** (2000) 30:460–468 <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s003740050024.pdf>
- TEIXEIRA, M. A.; MELO, I. S.; VIEIRA, R. F.; COSTA, F. E. C.; HARAKAVA, R. MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS DE MANDIOCA DE ÁREAS COMERCIAIS E ETNOVARIEDADES EM TRÊS ESTADOS BRASILEIROS. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.1, p.43-49, jan. 2007.
- THOMAS, P.; KUMARI, S.; SWARNA, G.K.; GOWDA, T.K.S. Papaya shoot tip associated endophytic bacteria isolated from *in vitro* cultures and host-endophyte interaction *in vitro* and *in vivo*. **Canadian Journal of Microbiology**. Vol. 53, 2007.
- VILENA, J. O.; TAVEIRA, D.L.L.; CHAGAS, P.C.; CHAGAS, E.A.; ARAÚJO, M.C.R.; GARCIA, M.I.R. ADAPTAÇÃO DE CLONES DE CAÇARI NAS CONDIÇÕES DE FLORESTA DE TRANSIÇÃO DO ESTADO DE RORAIMA. Anais do II Simpósio de Propagação de Plantas e Produção de Mudas. 29 a 31/outubro/2018. Águas de Lindóia, SP.
- YAN, X.; WANG, Z.; MEI, Y.; WANG, L.; WANG, X.; XU, Q.; PENG, S.; ZHOU, Y.; WEI, C. Isolation, Diversity, and Growth-Promoting Activities of Endophytic Bacteria From Tea Cultivars of Zijuan and Yunkang-10. **Frontiers in Microbiology**, 21 August 2018. DOI: 10.3389/fmicd.2018.01848.
- YABLONSKAYA, M. I.; GINS, M. S.; MOLCHANOVA, M. A. *In vitro* Plants biotization. **RUDN Bulletin, Agronomy and Livestock series**, n 1 (2016), p.15-20. DOI: 10.22363/2312-797X-2016-1-15-20.
- YUTAMA, K.; AGUIAR, J. P. L.; YUYAMA, L. K. O. Camu-camu: um fruto fantástico como fonte de vitamina C. **Acta Amazônica**, 32 (1) Mar 2002. DOI: 10.1590/1809-43922002321174.
- YUYAMA, K.; MENDES, N. B.; VALENTE, J. P. Longevidade de sementes de camu-camu submetidas a diferentes ambientes e formas de conservação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 2, p. 601-607, 2011.
- Ranawat, B., Bachani, P., Singh, A., & Mishra, S. (2018). Enterobacter hormaechei as Plant Growth-Promoting Bacteria for Improvement in Lycopersicon esculentum. **Current Microbiology**, 78, 1208–1217. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02368-1>

- Singh, N., Marwa, N., Mishra, S. k., Mishra, J., Verma, P. C., Rathaur, S., & Singh, N. (2016). *Brevundimonas diminuta* mediated alleviation of arsenic toxicity and plant growth promotion in *Oryza sativa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 125, 25–34. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2015.11.020>
- Kumar, V., & Gera, R. (n.d.). *Isolation of a multi-trait plant growth promoting Brevundimonas sp. and its effect on the growth of Bt-cotton*. 3 **Biotech** (2014) 4:97–101. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0126-4>
- Dutta, P., Karmakar, A., Majumdar, S., & Roy, S. (2018). *Klebsiella pneumoniae* (HR1) assisted alleviation of Cd (II) toxicity in *Vigna mungo*: a case study of biosorption of heavy metal by an endophytic bacterium coupled with plant growth promotion. **Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration**, 3, 27. <https://doi.org/10.1007/s41207-018-0069-6>
- Kshetri, L., Pandey, P., & Dutt Sharma, G. (2018). *Rhizosphere mediated nutrient management in Allium hookeri Thwaites by using phosphate solubilizing rhizobacteria and tricalcium phosphate amended soil*. **JOURNAL OF PLANT INTERACTIONS**, 2018, VOL. 13, NO. 1, 256–269. <https://doi.org/10.1080/17429145.2018.1472307>
- J Pieterse, C. M., Rajamohan, G., Duan, Y., Liu, D., Chen, L., Zhu, X., Wang, Y., Xuan, Y., Liu, X., & Chen, L. (2018). *Klebsiella pneumoniae* SneBYK Mediates Resistance Against *Heterodera glycines* and Promotes Soybean Growth. **Front Microbiol**. 2018; 9: 1134. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01134>
- Safdarpour, F., & Khodakaramian, G. (2019). Assessment of antagonistic and plant growth promoting activities of tomato endophytic bacteria in challenging with *Verticillium dahliae* under in-vitro and in-vivo conditions. In **Biological Journal of Microorganism 7 th Year** (Vol. 7, Issue 28).
- Alexander, A., Singh, V. K., Mishra Id, A., & Jha, B. (2019). *Plant growth promoting rhizobacterium Stenotrophomonas maltophilia* BJ01 augments endurance against N 2 starvation by modulating physiology and biochemical activities of *Arachis hypogea*. **PLOS ONE** September 12, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222405>
- Manuela, G., Bettencourt, F., Degenhardt, J., Davila, G., Santos, D., Vânia, ., Vicente, A., Carlos, ., & Soccol, R. (2021). Metagenomic analyses, isolation and characterization of endophytic bacteria associated with *Eucalyptus urophylla* BRS07-01 *in vitro* plants. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 37, 3. <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03127-x>
- Kumar, M., Singh Tomar, R., Lade, H., & Paul, D. (2014). Methylo-trophic bacteria in sustainable agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 32. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2074-8>
- de Souza, R., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. P. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. In **Genetics and Molecular Biology** (Vol. 38, Issue 4, pp. 401–419). Brazilian Journal of Genetics. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>

CAPÍTULO II: ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS CONDIMENTARES E MEDICINAIS NO CONTROLE DE CONTAMINANTES DA MICROPROPAGAÇÃO DE *MYRCIARIA DUBIA*¹

RESUMO

A micropropagação de *Myrciaria dubia* tem como principal limitação à contaminação *in vitro*. Nesse sentido, o objetivo neste estudo foi determinar a ação dos óleos essenciais de quatro plantas condimentares e medicinais (Orégano, *Origanum vulgare* L.; Alho, *Allium sativum* L.; Citronela, *Cymbopogon nardus* L.; Gengibre, *Zingiber officinale* Rosc.) na redução de contaminação microbiana e sobre a taxa de sobrevivência dos explantes na micropropagação de camu-camu. A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais foi analisada sobre a contaminação *in vitro* na cultura de tecidos de camu-camu (*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh) nas concentrações de 0,5, 1, 2, 3 e 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$ em meio WPM, emulsificados com Polysorbate 80 (Tween 80) a 1%. Também foi analisada atividade antibacteriana dos óleos essenciais sobre cepas isoladas da cultura de tecidos de camu-camu nos métodos de difusão em ágar e microdiluição em caldo. A utilização de óleos essenciais permitiu redução na taxa de contaminação *in vitro* na cultura de tecidos, sendo observado que a partir da concentração de 2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ não houve manifestação de contaminantes fúngicos e redução significativa da taxa de contaminação bacteriana, à exceção de óleo essencial de gengibre que apresentou contaminação expressiva em todas as concentrações analisadas. Em ordem inversa à redução no crescimento microbiano *in vitro*, percebe-se o aumento da oxidação dos explantes à medida que aumentam as concentrações, tendo os óleos de citronela e orégano apresentado potencial fitotóxico desde as mais baixas concentrações. O óleo essencial de alho apresentou melhor balanceamento, com menor taxa de oxidação e maior controle de microrganismos na cultura de tecidos nas concentrações de 0,5 e 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Os óleos essenciais de orégano e citronela apresentaram melhor atividade antibacteriana no teste de difusão em ágar.

Termos para indexação: Camu-camu; Controle microbiano; Cultura de tecidos; Microrganismos.

Essential oils from condimentary and medicinal plants in the control of contaminants from the micropropagation of *Myrciaria dubia*

ABSTRACT

The main limitation of the micropropagation of *Myrciaria dubia* is *in vitro* contamination. In order to overcome contamination, the effect of essential oils was studied as an alternative to conventional chemical treatments. This study aimed to analyze the action of essential oils from four culinary and medicinal plants (Oregano, *Origanum vulgare* L.; Garlic, *Allium sativum* L.; Citronella, *Cymbopogon nardus* L.; Ginger, *Zingiber officinale* Rosc.) in reducing contamination, microbial growth and on the survival rate of explants in the micropropagation of micropropagation. The

¹ Artigo aceito para publicação conforme anexo, p. 121.

antimicrobial activity of essential oils was analyzed on the *in vitro* contamination of tissue culture from camu-camu (*Myrciaria dubia* (HBK) McVaugh) at concentrations of 0.5, 1, 2, 3 and 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$ in WPM medium, emulsified with 1% Polysorbate 80 (Tween 80). The antibacterial activity of essential oils on strains isolated from tissue culture of the game was also analyzed using agar diffusion and broth microdilution methods. The use of essential oils allowed a reduction in the rate of *in vitro* contamination in tissue culture, being observed that from the concentration of 2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ there was no manifestation of fungal contaminants and a significant reduction in the rate of bacterial contamination, with the exception of oil ginger essential that showed significant contamination in all analyzed concentrations. Inversely to the reduction in microbial growth *in vitro*, there is an increase in explant oxidation as concentrations increase, with citronella and oregano oils showing phytotoxic potential from the lowest concentrations. Garlic essential oil showed better balance, with lower oxidation rate and greater control of microorganisms in tissue culture at concentrations of 0.5 and 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Essential oils of oregano and citronella showed better antibacterial activity in the agar diffusion test.

Index terms: *Myrciaria dúbia*; Camu-camu; Tissue Culture; Microbial Control; Microorganisms.

INTRODUÇÃO

O Camu-camu (*Myrciaria dubia*) (Kunth) McVaugh é uma fruta silvestre que cresce nas margens inundáveis dos rios e lagos de toda a bacia Amazônica, seus frutos de coloração rosa a roxo escuro são de grande interesse comercial por seu potencial nutricional, agroindustrial e farmacológico, tais como: elevadas concentrações de ácido ascórbico; compostos minerais como o potássio, cálcio, magnésio e sódio; e compostos fenólicos (CHAGAS et al., 2015; SOUSA et al., 2015, GRIGIO et al., 2019; GRIGIO et al., 2021a, 2021b, 2021c). Devido a espécie apresentar excelentes teores de atividade antioxidante, capaz de minimizar o risco de incidência de algumas doenças crônicas, o que permite inserir na lista de alimentos funcionais (PETERS; VÁSQUEZ, 1986; VILLACHICA, 1996; YUYAMA et al., 2011; SOUSA et al., 2015; CHAGAS et al., 2015).

Apesar da espécie ser tradicionalmente propagada por sementes (INPA, 2017), a técnica não é interessante para o estabelecimento de plantios comerciais devido à falta de uniformidade gerada pela reprodução sexuada, o que impacta na variabilidade quanto à frutificação, ciclo de produção e inclusive alterações no teor de vitamina C entre os frutos de diferentes plantas (PASQUAL et al., 2012, CHAGAS et al., 2012). A estaquia

tem sido o método mais utilizado na propagação de camu-camu por permitir a manutenção das características genéticas das plantas matrizes, a uniformidade, o porte reduzido e também a precocidade de produção, tendo, no entanto, como principal dificuldade a multiplicação em larga escala (MOREIRA FILHO, 2009; CHAGAS et al., 2012; PASCOAL et al., 2012).

Araújo et al. (2015) apontam a micropropagação como alternativa para o processo de produção de mudas de camu-camu, que com o uso de técnicas de cultivo *in vitro* como organogênese e embriogênese somática é possível a multiplicação em larga escala de plantas idênticas durante todo o ano.

A micropropagação do camu-camu, segundo Araújo et al. (2012), apresenta dificuldades em obter culturas assépticas devido à alta taxa de contaminação microbiana que possui acelerado crescimento no meio de cultura, favorecendo à competição por nutrientes. O estudo indicou a necessidade de suplementação do meio com antibióticos, considerando que, mesmo após desinfestação, houve 70% de contaminação. O estudo também sugere que havia presença de bactérias endofíticas, que só foram detectadas no meio após semanas do estabelecimento *in vitro*. Nesse mesmo sentido, Palú et al. (2011) descrevem como um dos principais problemas da micropropagação da figueira, a contaminação dos explantes por bactérias endofíticas.

A utilização de óleos essenciais na cultura de tecidos é apontada por Hamdeni et al. (2021) e Samah et al. (2017) como uma importante estratégia no controle de contaminantes, tendo demonstrado eficiência no controle de fungos, bactérias e vírus. No entanto, para observação dessa bioatividade de óleos essenciais sobre os microrganismos, faz-se mister a análise prévia de espécies vegetais com esse potencial inibitório, com isso possibilita alternativas de inibição sobre os microrganismos endofíticos. (JASIM, SALIH, ATI, 2021; MEZIANI et al., 2019; ENNOURI et al., 2020).

Desse modo, este estudo teve como objetivo analisar o efeito dos óleos essenciais de Orégano, *Origanum vulgare* L.; Alho, *Allium sativum* L.; Citronela, *Cymbopogon nardus* L.; Gengibre, *Zingiber officinale* Rosc.) na redução de contaminação microbiana e sobre a taxa de sobrevivência dos explantes na micropropagação de camu-camu.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado em duas etapas: na primeira, foi realizada a extração dos óleos essenciais; e na segunda, foi analisada a atividade antimicrobiana na cultura de tecidos do camu-camu.

Extração dos óleos essenciais

A extração dos óleos essenciais (OEs) se deu pelo método de hidrodestilação, em aparelho de Clevenger. Foram utilizadas 500 g da amostra. Após 2 h de extração, o óleo obtido foi coletado, e acondicionado em frasco de vidro revestido com papel alumínio, previamente esterilizado. A extração foi realizada em triplicata, e foi avaliado o rendimento de cada espécie. Para a extração dos óleos essenciais foram utilizadas folhas, rizomas e bulbos frescos e secos, conforme descrito a seguir (Tabela 1).

Tabela 1. Plantas utilizadas para extração dos óleos essenciais

Nome Comum	Partes Utilizadas	Nome Científico
Orégano	Folhas secas	<i>Origanum vulgare</i> L.
Alho	Bulbos frescos	<i>Allium sativum</i> L.
Citronela	Folhas frescas	<i>Cymbopogon nardus</i> L.
Gengibre	Rizomas frescos	<i>Zingiber officinale</i> Rosc.

Isolamento de bactérias provenientes da cultura de tecidos de clones superiores de camu-camu

Cepas bacterianas de camu-camu foram isoladas no Laboratório de Microbiologia do Solo, LMS, da Embrapa Roraima e se deu pela detecção dependente da cultura de tecidos. No método, o isolamento foi realizado após manifestações bacterianas em micropropagação de camu-camu em meio de cultura WPM (Woody Plant Medium) (LLOYD, MCCOWN, 1980). As cepas foram isoladas em meio de cultura ágar nutriente em placas de Petri pelo método de esgotamento por estrias, incubadas a 28° C, por 10 dias, para posterior caracterização morfológica (tamanho, borda, superfície, elevação, cor, formato, brilho, coloração Gram, entre outras características) conforme Hungria e Silva (2011).

Óleos essenciais no controle de contaminantes isolados da micropropagação de camu-camu

Para esta etapa, foi utilizado o método de difusão por perfuração em ágar, o qual consiste em perfurar o meio de cultura sólido com auxílio de cilindros de 6 a 8 mm de diâmetro para a formação de poços onde serão aplicados os óleos essenciais que serão analisados. Após o meio solidificar, foram realizadas sementeiras com diluição de cada cepa diluído em meio líquido DYGS sem adição de ágar, a 10^4 UFC mL⁻¹. Após cerca de 30 min, os poços de 6 mm foram perfurados e preenchidos com 35 µL de solução-estoque de cada óleo essencial (Tabela 1), diluídas a uma concentração de 100 µL mL⁻¹ em água destilada com Tween 80® a 1%. Como controle foi empregado polissorbato 80 (Tween 80®) a 1%, sem óleo essencial (OSTROSKY et al., 2008).

Esta é considerada uma técnica qualitativa, e possibilita analisar se os microrganismos são susceptíveis ou resistentes à substância a ser analisada. Após incubação a 28 °C por 24 h, a leitura é realizada medindo o diâmetro do halo de inibição com paquímetro digital, podendo classificar o inóculo em suscetível (s) quando o halo é ≥ 8 mm, ou resistente (r) quando não há formação de halo ou foi inferior a 8mm, conforme esquema na Figura 1 (MICHELIN et al., 2005).

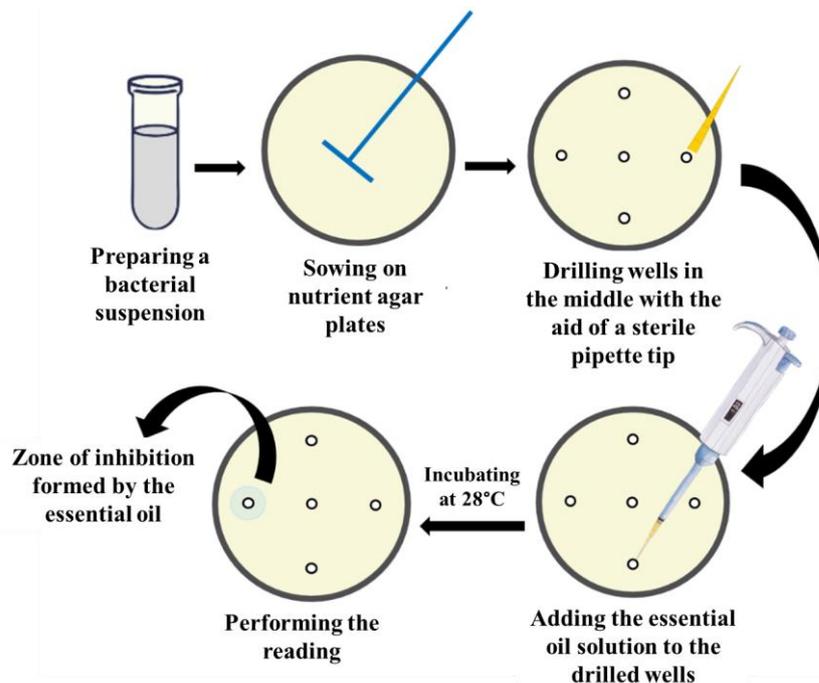


Figura 1. Esquema do método de Difusão em Discos de Papel (**Fonte:** Adaptado de Carneiro, 2020).

Óleos essenciais no controle *in vitro* de contaminantes na micropropagação de camu-camu

Os explantes de camu-camu foram coletados no Campo Experimental Serra da Prata (CESP), pertencente a Embrapa Roraima, localizado no município de Mucajaí-RR cuja localização geográfica da área experimental situa-se em W 60° 58'40''; N 2° 23'49''. Foram coletadas amostras em pontos aleatórios, priorizando plantas que não apresentassem nenhum sinal de injúria ou danos causados por possíveis patógenos. Após a coleta, os segmentos caulinares foram levados ao laboratório e passaram por pré-limpeza conforme descrito a seguir. Os explantes de camu-camu, oriundos de brotações novas com um par de gemas axilares e aproximadamente 4 cm de comprimento, foram lavados em água corrente, para lixiviação parcial de compostos fenólicos liberados por consequência do corte dos tecidos.

Posteriormente, os explantes foram imersos em solução de fungicida com 2 ml L⁻¹ Nativo® e 100 mg L⁻¹ do antioxidante ácido cítrico, conforme recomendação de Araújo et al. (2012), permanecendo nestas condições por 2 h.

Após esta etapa, em câmara de fluxo laminar, os segmentos caulinares passaram por processo de desinfecção como descrito na sequência a seguir: os explantes foram imersos em álcool 70% por 1 min; logo após, foram imersos em hipoclorito de sódio a 1,5% com 2 gotas de detergente neutro por 10 min; ao final, os explantes desinfectados passaram por tríplice lavagem com água destilada, deionizada e autoclavada (DDA) para retirada total dos produtos da superfície dos tecidos.

Após a assepsia, os explantes tratados foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio WPM suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificado por 7 g L⁻¹ de ágar, com pH ajustado para 5,6 e tendo sido autoclavado a 1,2 atm de pressão e 120 °C por 15 min. Após a autoclavagem, em câmara de fluxo laminar, os óleos essenciais (alho, gengibre, citronela e orégano) foram adicionados no meio de cultura, em diferentes concentrações: 0,5; 1, 2, 3 e 4 µL mL⁻¹. Para a emulsificação dos óleos no meio de cultura, foi acrescido de Polysorbate 80 (Tween 80) a 1%, após a completa homogeneização dos óleos no meio de cultura, procedeu-se a distribuição nos tubos de ensaio. À testemunha não foi adicionada óleo essencial.

Os explantes foram avaliados a cada 7 dias, para observação do aparecimento das manifestações microbianas e condições do explante, e o resultado final avaliado aos 30 dias de cultivo. Todos os explantes foram mantidos a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 16 h de $35\text{-}40 \mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$ fornecido por lâmpadas fluorescentes brancas frias. Para cada concentração de óleo essencial foi realizado um delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições composta por quatro explantes cada. O potencial fitotóxico do óleo essencial foi avaliado conforme o escurecimento e morte do explante, ao final dos 30 dias de cultivo *in vitro*.

O estudo foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial, sendo o primeiro fator tipos de óleos essenciais (O) com quatro níveis (alho, orégano, citronela, e gengibre) e o segundo fator doses de óleos (O) com nove níveis, distribuídos em três repetições com 10 explantes por unidade ou parcela experimental.

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste de F ($p \leq 0,05$). Os dados quantitativos foram submetidos à análise de regressão, e os dados qualitativos foram submetidos ao teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Utilizou-se o software SISVAR para análise dos dados (FERREIRA, 2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O emprego de óleos essenciais foi utilizado neste estudo para conhecer o potencial antimicrobiano na cultura de tecidos de camu-camu. Inicialmente foi realizada extração dos óleos essenciais (OE) de alho, gengibre, citronela e orégano, seguido da avaliação antimicrobiana sobre isolados bacterianos da cultura de tecidos do camu-camu.

Uso de Óleos essenciais no controle de bactérias isoladas da micropropagação de camu-camu

A avaliação da ação antibacteriana de óleos essenciais de citronela, orégano, gengibre e alho foi realizada primariamente pelo método de difusão por perfuração em ágar. Na Tabela 2, pode-se notar quais isolados foram considerados suscetíveis e quais foram resistentes aos óleos testados. Nos halos inferiores a 8mm, ou nhr (não houve resistência), os isolados bacteriano foram considerados resistentes ao óleo essencial empregado.

Tabela 2 - Ação bactericida de óleos essenciais em bactérias isoladas da cultura de tecidos de camu-camu, pelo método de difusão por perfuração em ágar*.

Isolado	Coloração Gram	Citronela (mm)	Orégano (mm)	Gengibre (mm)	Alho (mm)
07A	+	12,69 ± 1,97(s)	13,27 ± 1,01(s)	nh (r)	nh (r)
07B	+	9,45 ± 1,25(s)	10,81 ± 1,88(s)	nh (r)	nh (r)
07C	+	nh (r)	13,09 ± 1,00(s)	nh (r)	nh (r)
10A	+	21,55 ± 4,05(s)	10,41 ± 1,52(s)	11,01 ± 0,79(s)	nh (r)
10B	+	24,99 ± 4,99(s)	17,61 ± 2,16(s)	14,07 ± 2,91(s)	10,23 ± 1,63(s)
15A	+	9,28 ± 3,39(s)	11,76 ± 1,31(s)	nh (r)	nh (r)
15B	+	39,03 ± 3,57(s)	9,98 ± 0,12(s)	nh (r)	nh (r)
17A	+	20,95 ± 1,32(s)	12,25 ± 3,78(s)	11,59 ± 0,39(s)	nh (r)
18A	+	10,33 ± 0,41(s)	12,87 ± 1,69(s)	nh (r)	nh (r)
18B	+	12,44 ± 1,25(s)	12,72 ± 0,95(s)	13,34 ± 1,44(s)	nh (r)
18O	+	9,30 ± 0,93(s)	10,95 ± 0,383(s)	nh (r)	nh (r)

*Cada valor representa a média de três repetições e os desvios padrão da média; (r): resistente; (s): suscetível; nh: não houve formação de halo de inibição.

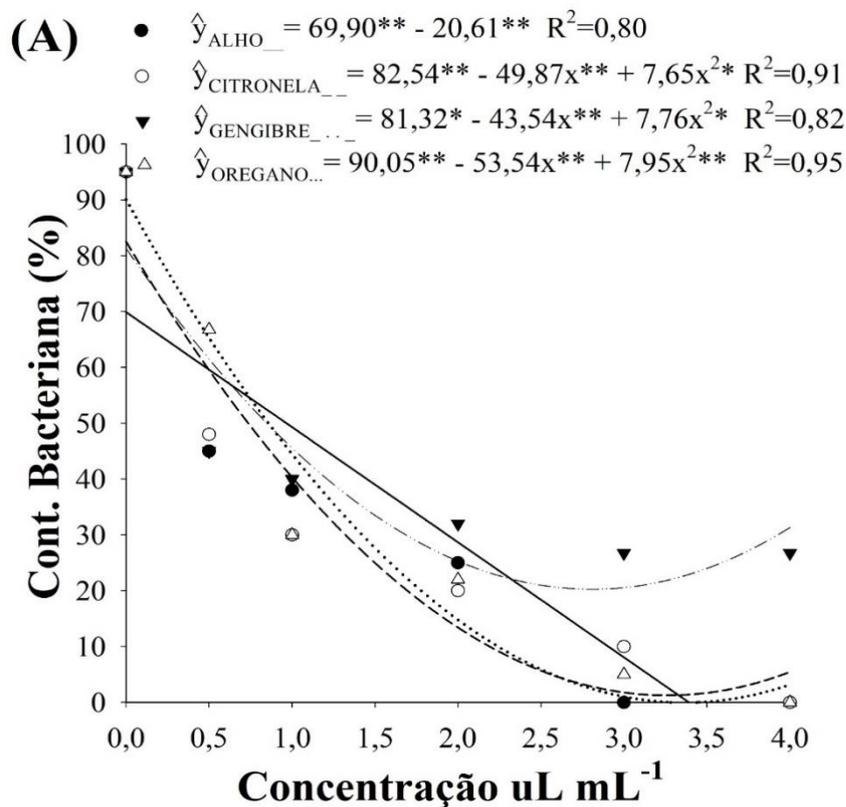
Similar aos resultados encontrados por Santos et al. (2011) em seu estudo, o óleo essencial de orégano proporcionou controle sobre todos os microrganismos analisados, enquanto o OE de alho apresentou uma seletividade, proporcionando os maiores halos de inibição sobre algumas espécies de bactérias e nenhuma inibição em outras.

O óleo essencial de citronela apresentou controle seletivo sobre os isolados bacterianos analisados, resultado similar ao encontrado por Silveira et al. (2012) e Martins et al. (2009). Os óleos essenciais de gengibre e alho mostraram baixa eficiência no controle desses microrganismos pelo método de difusão nas concentrações utilizadas. Ainda assim, é possível notar que o isolado 07C foi considerado suscetível apenas a orégano.

O OE de gengibre apresentou atividade antimicrobiana de forma seletiva, com efetividade apenas sobre quatro dos 11 isolados bacterianos analisados. Em seu estudo, Cutrim et al. (2019) afirmam que é essencial identificar a coloração Gram dos isolados, considerando que muitos estudos apontam maior resistência de bactérias Gram-negativas aos óleos essenciais, do que as bactérias Gram-positivas. Essa resistência é comumente relacionada a uma membrana externa à parede celular das bactérias Gram-negativas, composta de polissacarídeos, que lhe confere menor permeabilidade a compostos hidrofóbicos, que é o caso dos óleos essenciais (CUTRIM et al., 2019;

PROBST, 2012; BARBOSA et al., 2015). Neste estudo foi possível observar, na Tabela 2, que todas os isolados foram identificados como coloração Gram Positivo, no entanto, essa característica não explica a baixa efetividade do óleo essencial de gengibre, e mas possivelmente esteja relacionada às espécies bacterianas.

Em continuidade, os óleos essenciais foram analisados quanto a seu potencial antimicrobiano *in vitro* na cultura de tecidos de camu-camu. O estudo permitiu observar que a redução na taxa de contaminação na micropropagação da espécie foi proporcional ao aumento da concentração do óleo essencial empregado, à exceção do tratamento com óleo essencial de gengibre que apresentou alta contaminação microbiana em todas as concentrações analisadas (Figuras 2A e 2B).



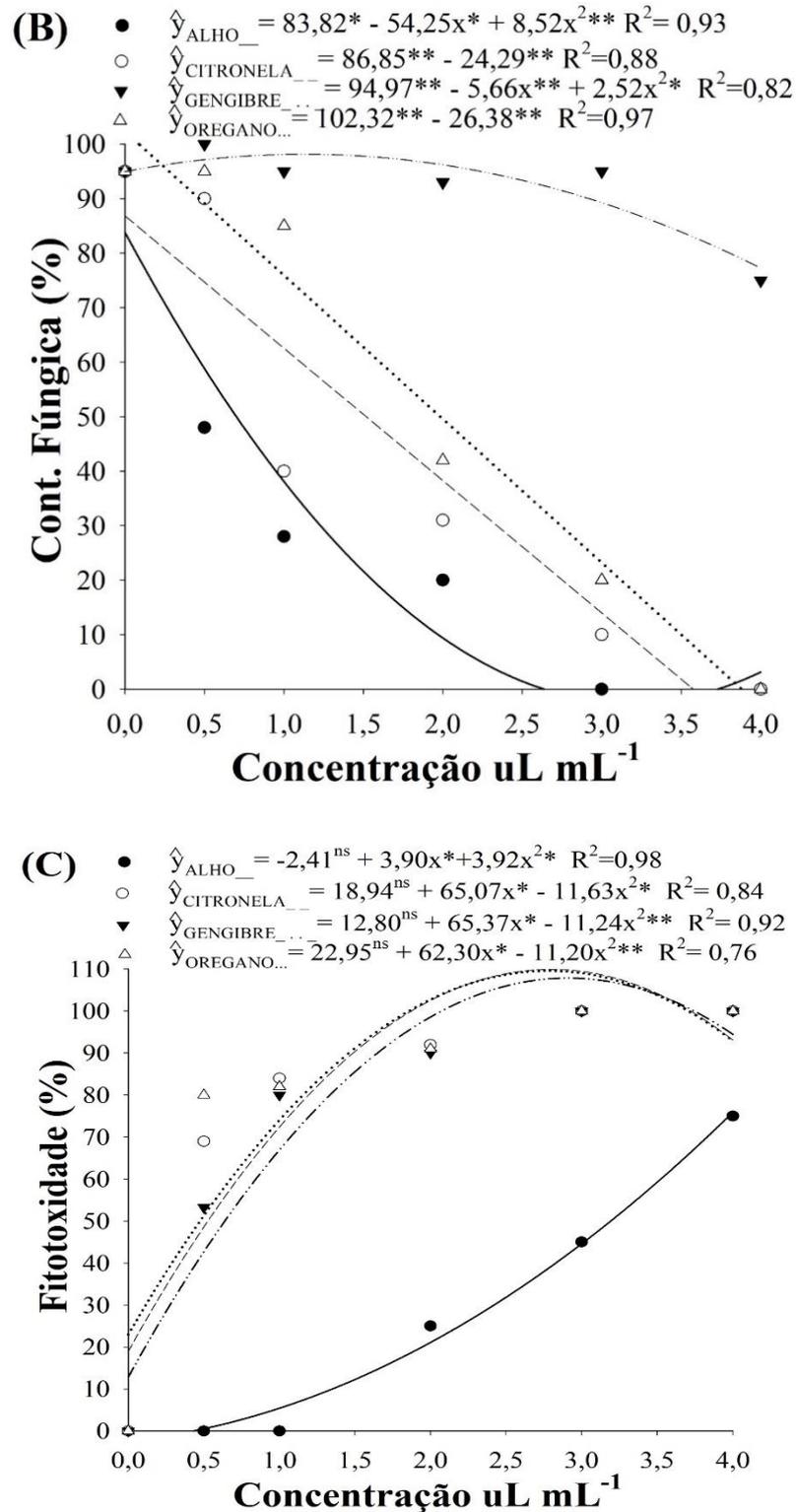


Figura 2 - Atividade antimicrobiana e oxidação de óleos essenciais na cultura de tecidos de camu-camu.

O óleo essencial de alho apresentou efetividade no controle fúngico desde a concentração de $1 \mu\text{L mL}^{-1}$ (Figura 2B). Também foi observada a redução na contaminação por bactérias, não havendo, no entanto, o controle total como observado

para contaminação fúngica, à exceção do óleo essencial de citronela nas concentrações de 3 e 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$ em que o controle de bactérias foi efetivo (Figura 2A).

Em ordem inversa à redução de contaminação com o aumento na concentração dos óleos essenciais, percebeu-se o aumento da oxidação dos explantes à medida que aumentam as concentrações, sendo observado o escurecimento do explante, tendo os óleos de citronela e orégano apresentado potencial fitotóxico desde as mais baixas concentrações (Figura 2C).

Resultados semelhantes foram encontrados por Taghizadeh, Solgi e Shahrjerdi (2016), onde o uso de óleos essenciais de eugenol, carvacrol e timol reduziu a contaminação *in vitro* por bactérias e fungos na micropropagação de morango. No entanto, os autores também relatam que essa adição ao meio de cultura aumentou a oxidação dos explantes, havendo uma interação significativa entre a concentração dos óleos essenciais e os sintomas de fitotoxicidade, ou seja, quanto maior a concentração dos OE, maior o percentual de oxidação. Neste estudo, os óleos de orégano e citronela apresentaram fitotoxicidade desde as menores concentrações, sendo necessário, portanto, a identificação de concentração mínima inibitória que não provoque danos aos explantes e que seja eficaz no controle de contaminantes (Figura 2C).

O emprego de óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas também foi empregado por Meziani et al. (2019) na cultura de tecidos de tamareiras. Foram empregados óleos de alecrim, tomilho, artemísia e outras espécies com potencial antimicrobiano. Os autores observaram que na fase de multiplicação todas as concentrações utilizadas foram capazes de inibir o crescimento de bactérias endofíticas, mas que as maiores concentrações foram tóxicas para os explantes. Ennouri et al. (2020) relatam que os óleos essenciais de orégano e tomilho foram eficazes no controle fúngico sem apresentar fitotoxicidade para o explante nas concentrações de 0,15 $\mu\text{L mL}^{-1}$, e por não interferirem no processo de regeneração e diferenciação dos tecidos vegetais.

Na Figura 2C, foi possível observar que o uso de óleo essencial de alho na cultura de tecidos de camu-camu resultou em menor percentual de oxidação quando comparado aos demais óleos essenciais utilizados neste estudo. Esse resultado pode ser em decorrência da presença majoritária de compostos organossulfurados, apontados por Mnayer et al. (2014) e Amagase (2006) como constituintes com expressiva atividade

antioxidante. O estudo de Botas (2017), avaliando o potencial antioxidante e antibacteriano de quatro variedades de alho, identificaram que o alho branco apresentou as maiores propriedades antioxidantes, enquanto que a atividade antimicrobiana, no entanto, não foi satisfatória, tendo mostrado baixa atividade bactericida.

O OE de gengibre não foi satisfatório em nenhuma das concentrações, apresentando atividade fitotóxica e baixa eficiência na atividade antimicrobiana (Figura 2). Diferente do estudo de Cutrim et al. (2019), que identificaram atividade antioxidante e antimicrobiana nos óleos essenciais e extratos hidroalcoólicos de gengibre e alecrim.

No estudo relatado por Jasim, Salih, e Ati (2021), a utilização de óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris* L.), hortelã (*Mentha piperita* L.), cânfora (*Cinnamomum camphora*), Colocynthis (*Citrullus colocynthis*) e rúcula (*Eruca vesicaria*) foi empregado contra contaminação por fungos na cultura de tecidos. O estudo indicou a inibição do crescimento micelial de forma eficaz a partir de 2 mL 100 mL⁻¹ para os óleos de tomilho e hortelã, enquanto os óleos essenciais de cânfora, colocíntida e rúcula apresentaram menor potencial de inibição *in vitro*. No entanto, de forma similar a este trabalho, foi identificado alto percentual de fitotoxidade sobre os explantes, causando mortalidade significativa dos mesmos.

Samah et al. (2017) atribuem à atividade antimicrobiana do óleo essencial a seu caráter lipofílico, que pode facilitar a absorção pelos tecidos vegetais, melhorando o controle de contaminantes endofíticos, mas que, dependendo da composição e do aumento da concentração, essa mesma característica pode causar fitotoxidade aos explantes. Os autores descrevem como estratégia à alta taxa de oxidação, o emprego de nanoemulsões de eugenol, os quais foram eficazes no controle de fungos e vírus contaminantes da cultura de tecidos e não mostraram nenhum efeito negativo na regeneração. O emprego de nanoemulsões de eugenol favoreceram com inibição de contaminação fúngica e também possibilitaram plântulas livres de vírus após cinco semanas de cultivo *in vitro*. O estudo obteve como resultado final a melhoria no crescimento e enraizamento na presença de ácido indol-3-butírico, e maior taxa de sobrevivência na fase de aclimação.

Com base no estudo desenvolvido, foi possível observar o efeito dos óleos essenciais no controle de contaminantes e na taxa de fitotoxidade sobre explantes na

cultura de tecidos de camu-camu. A seguir, é possível observar o efeito fitotóxico dos óleos essenciais de alho (Figura 3A) e citronela (Figura 3B) na concentração de $1 \mu\text{L mL}^{-1}$ nos explantes de camu-camu:

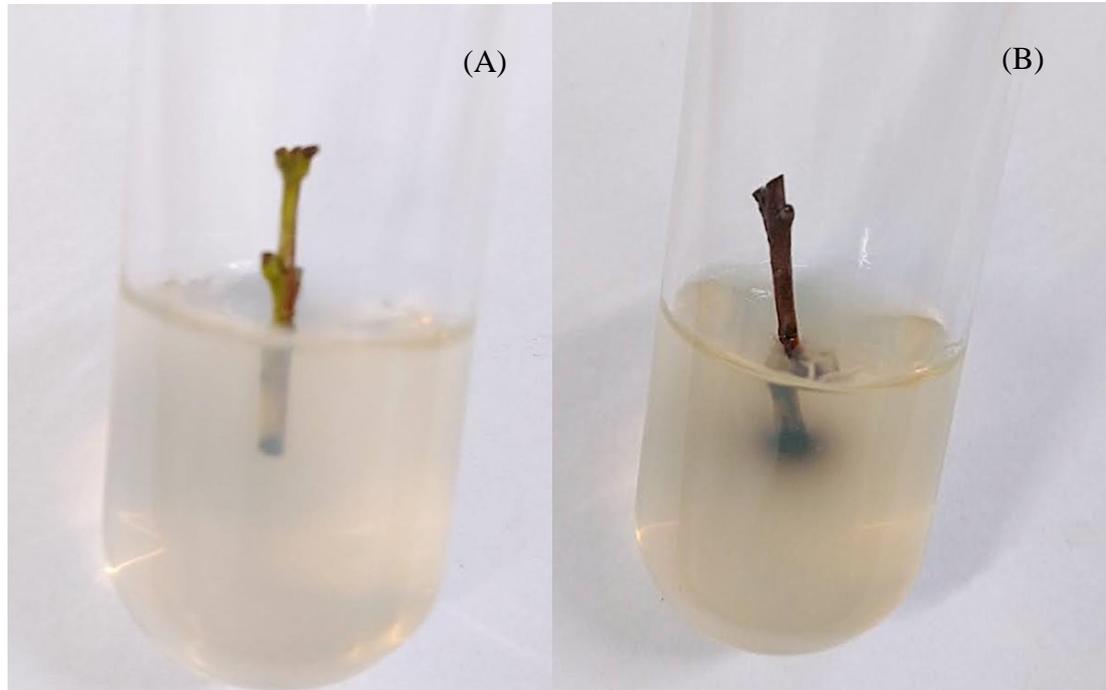


Figura 3 – Avaliação do efeito fitotóxico dos óleos essenciais sobre o explante na cultura de tecidos de camu-camu. (A) Explante de camu-camu sob efeito de óleo essencial de alho; (B) Explante de camu-camu sob efeito de óleo essencial de citronela;

O óleo essencial de alho, mostrou ser o melhor tratamento *in vitro*, com baixa taxa de oxidação e melhor efetividade contra microrganismos na microprogagação de camu-camu, apesar de na análise de difusão em ágar não ter correspondido ao melhor tratamento antibacteriano. Isso pode ser atribuído à característica do óleo essencial do alho ser resinoso e mais denso que os demais. A baixa fitotoxidade do óleo essencial de alho favorece sua utilização na cultura de tecidos, podendo portanto, ser usado na suplementação, substituindo ou somado a outros agentes antimicrobianos, no sucesso do cultivo *in vitro* de camu-camu devido às suas propriedades antioxidantes, antibacterianas e antifúngicas.

CONCLUSÕES

Os óleos essenciais de orégano e citronela apresentaram melhor atividade antibacteriana no teste de difusão por perfuração em ágar. Já na cultura de tecidos, os

óleos essenciais de alho, citronela e orégano apresentaram melhor controle na inibição do crescimento micelial e significativa redução na contaminação bacteriana. Apesar da efetividade no controle microbiano desses óleos, o óleo essencial de alho foi o que apresentou menor fitotoxicidade aos explantes e melhor balanço entre fitotoxicidade e controle microbiano, sendo indicado, portanto, como melhor tratamento *in vitro* em concentrações entre 0,5 e 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMAGASE, H. Clarifying the Real Bioactive Constituents of Garlic. **The Journal of Nutrition**, Oxford, v.136, n.3, p.716S–725S, 2006.

ARAÚJO, M.C.R.; VENDRAME, W.A.; CHAGAS, E.A.; RIBEIRO, M.I.G.; VILACA, R. Preliminary Studies On *In vitro* Propagation of Camu-Camu (*Myrciaria dúbia*), an Important Medicinal Plant. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Florida, n.128, p.52-54, 2015.

ARAÚJO, M.C.R.; CHAGAS, E.A.; RIBEIRO, M.I.G.; PINTO, S.T.S.; CHAGAS, P.C.; VENDRAME, W.; MOTA FILHO, A.B.; SOUZA, O.M. Micropropagation of caçari under different nutritive culture media, antioxidants, and levels of agar and pH. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v.15, n.33, p.1771-1780, 2016. DOI: 10.5897/AJB2016.15417.

ARAÚJO, M.C.R. Callus induction and pro-embryogenic mass formation in *Myrciaria dubia*, an important medicinal and nutritional plant. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v.21, n.3, p. 1-8, 2021.

BARBOSA, L.N.; PROBST, I.S.; ANDRADE, B.F.M.T.; ALVES, F.C.B.; ALBANO, M.; CUNHA, M.L.R.S.; DOYAMA, J.T.; RALL, V.L.M.; FERNANDES JÚNIOR, A. *In vitro* Antibacterial and Chemical Properties of Essential Oils Including Native Plants from Brazil against Pathogenic and Resistant Bacteria. **Journal of Oleo Science**, Tokyo, v.64, n.3, p.289-298, 2015.

BAYDAR, H.; SAĞDIÇ, O; ÖZKAN, G.; KARADOĞAN, T. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, Karlsruhe, v.15, n.3, p.169-172, 2004.

BOTAS, J.C.S. **Caracterização química e propriedades bioativas de *Allium sativum* L. com diferentes proveniências e processamentos**. (Dissertação) Instituto Politécnico de Bragança, Universidade de Salamanca. 2017. 61p.

CHORIANOPOULOS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; ALIGIANNIS, N.; MITAKU, S.; NYCHAS, G.-J.; HAROUTOUNIAN, S.A. Essential oils of satureja, origanum, and thymus species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.52, n.26, p.8261-8267, 2004.

CARNEIRO, F.B.; BASILIO JÚNIOR, I.D.; LOPES, P.Q.; MACÊDO, R.O. Variação da quantidade de β -cariofileno em óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng., Lamiaceae, sob diferentes condições de cultivo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.20, n.4, p.600-606, 2010.

CUTRIM, E.S.M.; TELES, A.M.; MOUCHREK, A.N.; MOUCHREK FILHO, V.E.; EVERTON, G.O. Avaliação da Atividade Antimicrobiana e Antioxidante dos Óleos Essenciais e Extratos Hidroalcoólicos de *Zingiber officinale* (Gengibre) e *Rosmarinus officinalis* (Alecrim) **Revista Virtual de Química**, Niterói, v.11, n.1, p.60-81, 2019.

CHAGAS, E.A.; CARVALHO, A.S.C.; BACELAR-LIMA, C.G.; DUARTE, O.R.; NEVES, L.C.; ALBUQUERQUE, T.C.S. Ocorrência e distribuição geográfica de populações nativas de camu-camu no estado de Roraima. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2012, 22, Bento Gonçalves, Anais... Bento Gonçalves, RS: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 22. 2012.

CHAGAS, E.A., LOZANO, R.M.B., CHAGAS, P.C., BACELAR-LIMA, C.G., GARCIA, M.I.R., OLIVEIRA, J.V., SOUZA, O.M., MORAIS, B.S., ARAÚJO, M. DA C. DA R. Intraspecific variability of camu-camu fruit in native populations of northern Amazonia. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v.15, n.4, p.265–271, 2015.

EMBRAPA RORAIMA. Procedimento Operacional Padrão Técnico para Caracterização de Culturas Bacterianas. Protocolo 005.POP.005.LMS, Embrapa Roraima 2005.

ENNOURI, A.; LAMIRI, A.; ESSAHLI, M.; BENCHEQROUN, S.K. Chemical Composition of Essential Oils and Their Antifungal Activity in Controlling *Ascochyta rabiei*. **Journal of Agricultural Science and Technology**, Tehran, v.22, n.5, p.1371-1381, 2020.

FERREIRA, D.F. Sisvar: A Computer Statistical Analysis System. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.6, p.1039-1042, 2014.

GRIGIO, M.L.; MOURA, E.A.; CARVALHO, G.F.; ZANCHETTA, J.J.; CHAGAS, P.C.; CHAGAS, E.A.; DURIGAN, M.F.B. Nutraceutical potential, qualitative and acceptability of different camu-camu popsicle. **Journal of Food Processing and Preservation**, London, v.45, n.3, e15305, 2021.

- GRIGIO, M.L.; MOURA, E.A.; CARVALHO, G.F.; ZANCHETTA, J.J.; CHAGAS, P.C.; CHAGAS, E.A.; DURIGAN, M.F.B. Nutraceutical potential, quality and sensory evaluation of camu-camu pure and mixed jelly. **Food Science and Technology**, Campinas, v.41, fst.03421, 2021.
- GRIGIO, M.L.; MOURA, E.A.; CHAGAS, E.A.; DURIGAN, M.F.B.; CHAGAS, P.C.; CARVALHO, G.F.; ZANCHETTA, J.J. Bioactive compounds in and antioxidant activity of camu-camu fruits harvested at different maturation stages during postharvest storage. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.43, e50997, 2021.
- HUNGRIA, M. SILVA, K. Manual de Curadores de Germoplasma – Micro-organismos: Rizóbios e Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal. – Brasília, DF: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 2011. 21 p.
- JAKIEMIU, E.A.R. **Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.)**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008, 89p.
- JASIM, N.S.; SALIH, A.M.; ATI, M-A. Evaluating the efficiency of plants essential oils against Common fungal contamination affecting tissue culture of date palms (*Phoenix Dactylifera* L.) by *in vitro* culture. **Research Journal of Chemistry and Environment**, New Delhi, v.25, n.6, 40-45, 2021.
- KANG, R.; HELMS, R.; STOUT, M.J.; JABER, H.; NAKATSU, T. Vietnamese culinary herbs in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, New Delhi, v.40, n.1, p.2328-2332, 1992.
- MNAYER, D.; FABIANO-TIXIER, A.-S.; PETITCOLAS, E.; HAMIEH, T.; NEHME, N.; FERRANT, C.; FERNANDEZ, X.; CHEMAT, F. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of six essentials oils from the Alliaceae family. **Molecules**, Basel, v.19, n.12, p.20034-20053, 2014.
- MEZIANI, R.; MAZRI, M.A.; ESSARIOUI, A.; ALEM, C.; DIRIA, G.; GABOUN, F.; IDRISSEY. H.E.; LAAGUIDI, M.; JAITI, F. Towards a new approach of controlling endophytic bacteria associated with date palm explants using essential oils, aqueous and methanolic extracts from medicinal and aromatic plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, Gewerbestrasse, v.137, n.4, p.285-295, 2019.
- MICHELIN, D.C.; MORESCHI, P.E.; LIMA, A.C.; NASCIMENTO, G.G.F.; PAGANELLI, M.O.; CHAUD, M.V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.15, n.4, p.316-320, 2005.

- OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.; E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.18, n.2, 301-307, 2008.
- PALÚ, E.G.; CORRÊA, L.S.; SUZUKI, A.N. BOLIANI, A.C. Uso de antibióticos para o controle de bactérias endógenas visando à micropropagação da figueira. Propagação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.33, n.2, p.587-592, 2011.
- CHAGAS, E.A.; FLORES, P.S.; CHAGAS, P.; COUCEIRO, M.A; PASQUAL, M.; PIO, R.; ARAÚJO, M.C.R.; SILVA, M.L. Fruteiras Nativas da Amazônia. In: PASQUAL, M.; CHAGAS, E.A. (Org.). *Cultura de Tecidos em Espécies Frutíferas*. 1ed.Boa Vista-RR: Editora UFRR, 2014, v. 1, p. 89-110.
- Lloyd, G. and McCown, B.H. Commercially-Feasible Micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by Use of Shoot-Tip Culture. **Combined Proceedings-International Plant Propagator's Society**, 1980, 30, 421-427.
- PETERS, C.M. & VASQUEZ, A. Estudios ecologicos de camu-camu (*Myrciaria dubia*) I. producción de frutos en poblaciones naturales. **Acta Amazônica**, Manaus, v.16/17, número único, p.161-174, 1986/1987.
- PINEDO, P.M.; RAMIREZ, N.; BLASCO, M.L. **Notas preliminares sobre el araza (*Eugenia stipitata*), frutal nativo de la Amazonia Peruana**. Lima: Instituto Nacional de Investigación Agrária, 1981, 58 p. (Publicación Miscelánea, n.229)
- PROBST, I.S. **Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu. - Botucatu: [s.n.], 2012.
- QUAMBUSCH, M; PIRTTILÄ, 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**, Oxford, v.34, n.5, p.524-533, 2014.
- QUAMBUSCH, M.; WINKELMANN, T. **Bacterial Endophytes in Plant Tissue Culture: Mode of Action, Detection, and Control**. *Plant Cell Culture Protocols*, p.69-88. In: LOYOLA-VARGAS, V.M.; OCHOA-ALEJO, N. (Orgs.) *Methods in Molecular Biology*, v.1815. Gewerbestrasse: Springer Nature, 2018.
- SILVA, J.P.L.; DUARTE-ALMEIDA, J.M.; PEREZ, D.V.; FRANCO, B.D.G.M. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella Enteritidis*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.30, Supl.1, p.136-141, 2010.

- SILVEIRA, E.B.; GOMES, A.M.A; MARIANO, R.L.R.; SILVA NETO, E.B. Bacterização de sementes e desenvolvimento de mudas de pepino. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.2, p.217-221, 2004.
- SIVROPOULOU, A.; PAPANIKOLAOU, E.; NIKOLAOU, C.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.44, n.5, p.1202-1205, 1996.
- SOUSA, R. C.P.; CHAGAS, E.A.; GUIMARÃES, P.V.P.; NASCIMENTO FILHO, W.B., MELO FILHO, A.A. Minerals in Aqueous extract of the coproducts *Myrciaria dubia* (Kunth.) McVaugh, Myrtaceae. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v.7, n.4, p.1299–1305, 2015.
- MOKBEL, S.A.; KHALIL, A.A.; EL-SHAZLY, M.A. Efficiency of eugenol oil nanoemulsion against Banana bunchy top virus and contamination with fungi in plant tissue culture. **Arab Journal of Biotechnology**, Giza, v.20, n.1, 33-50, 2017.
- TAGHIZADEH, M.; SOLGI, M.; SHAHRJERDI, I. Various aspects of essential oils application for pathogens controlling in Strawberry *in vitro* culture. **Academia Journal of Agricultural Research**, West Yorkshire, v.4, n.11, p.667-674, 2016. DOI: 10.15413/ajar.2016.0118.
- ULTEE, A.; SLUMP, R.A.; STEGING, G.; SMID, E.J. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.63, n.5, 620-4, 2000.
- VILLACHICA, H. **El cultivo del camu-camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. McVaugh) em la Amazonia Peruana**. Lima: Tratado de cooperación Amazônica, 95p. 1996.
- YUYAMA, K.; MENDES, N.B.; VALENTE, J.P. Longevidade de sementes de camu-camu submetidas a diferentes ambientes e formas de conservação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.33, n.2, p.601-607, 2011.
- YUYAMA, K. A cultura de camu-camu no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.33, n.2, p.335-690, 2011.

CAPÍTULO III: USO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS CONDIMENTARES E MEDICINAIS NO CONTROLE DE BACTÉRIAS ISOLADAS DA CULTURA DE TECIDOS DE CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh)

Resumo

A micropropagação de *Myrciaria dubia* tem como principal limitação à contaminação *in vitro*. A fim de superar a contaminação, o efeito dos óleos essenciais foi estudado como alternativa aos tratamentos químicos convencionais. Este estudo teve como objetivo determinar a concentração mínima inibitória dos óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais (orégano, citronela, Gengibre, melaleuca, eucalipto, alecrim e artemísia) contra isolados bacterianos da cultura de tecidos de camu-camu nos métodos de difusão em ágar e microdiluição em caldo. Também foi analisada a ação dos óleos essenciais de orégano, melaleuca, alecrim e Artemísia nas concentrações de 0,25 e 0,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ em meio WPM, emulsificados com Polysorbate 80 (Tween 80) a 1%. Os óleos essenciais de orégano, melaleuca, artemísia e alecrim apresentaram melhor potencial bactericida no método de difusão em ágar e foram selecionados para avaliação da menor concentração inibitória *in vitro* pelo método de microdiluição em caldo. Nesta etapa, a menor densidade bacteriana foi observada para os óleos essenciais de orégano e melaleuca na concentração de 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$, com 0,473 e 0,878 nm, respectivamente. O uso de óleos essenciais favoreceu a redução na taxa de contaminação *in vitro* na cultura de tecidos, sendo observado que a menor percentual de contaminação por fungos sob ação dos óleos essenciais de Artemísia e orégano nas concentrações de 0,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$, com 25 e 35% respectivamente. O melhor controle de manifestação bacteriana *in vitro* foi observado com adição dos óleos essenciais de orégano e alecrim nas concentrações de 0,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$, com 10 e 15% respectivamente. Foi observada a taxa de brotação dos explantes na presença dos óleos essenciais de orégano (25%), alecrim (35%) e melaleuca (70%). Apenas os óleos essenciais de orégano e melaleuca nas concentrações de 0,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ causaram fitotoxicidade nos explantes, com 7 e 14% respectivamente.

Palavras-chave: Camu-camu; Controle microbiano; Cultura de tecidos; Microrganismos; Óleos Essenciais.

INTRODUÇÃO

O camu-camu (*Myrciaria dubia*) (Kunth) McVaugh é uma fruta nativa da amazônia, conhecida por possuir elevadas concentrações de ácido ascórbico e ser rico em compostos fenólicos e minerais como potássio, cálcio, magnésio e sódio (CHAGAS et al., 2015; SOUSA et al., 2015, GRIGIO et al., 2019; GRIGIO et al., 2021a, 2021b, 2021c).

A espécie, que cresce às margens de rios e lagos da região amazônica, chama atenção por sua importante atividade antioxidante, capaz de minimizar o risco de incidência de doenças crônicas, o que permite inserir na lista de alimentos funcionais (PETERS; VÁSQUEZ, 1986; VILLACHICA, 1996; YUYAMA et al., 2011; SOUSA et al., 2015; CHAGAS et al., 2015).

Apesar de ser tradicionalmente propagado por sementes (INPA, 2017), a técnica não é interessante para o estabelecimento de plantios comerciais devido à falta de uniformidade gerada pela reprodução sexuada, o que impacta na variabilidade quanto à frutificação, ciclo de

produção e inclusive alterações no teor de vitamina C entre os frutos de diferentes plantas (PASQUAL et al., 2012, CHAGAS et al., 2012).

Atualmente a propagação por estaquia tem sido o método mais utilizado na propagação de caçari por permitir a manutenção das características genéticas das plantas matrizes, a uniformidade, o porte reduzido e também a precocidade de produção, tendo, no entanto, como principal dificuldade a multiplicação em larga escala (MOREIRA FILHO, 2009; CHAGAS et al., 2012; PASCOAL et al., 2012).

Araújo et al. (2015) aponta a micropropagação como alternativa para o processo de produção de mudas de camu-camu, que com o uso de técnicas de cultivo *in vitro* como organogênese e embriogênese somática é possível a multiplicação em larga escala de plantas idênticas durante todo o ano.

A micropropagação do camu-camu, segundo Araújo et al. (2012), apresenta dificuldades em obter culturas assépticas devido à alta taxa de contaminação microbiana que possui acelerado crescimento no meio de cultura, favorecendo à competição por nutrientes. O estudo indicou a necessidade de suplementação do meio com antibióticos, considerando que, mesmo após desinfestação, houve 70% de contaminação. O estudo também sugere que havia presença de bactérias endofíticas, que só foram detectadas no meio após semanas do estabelecimento *in vitro*. Nesse mesmo sentido, Palú et al (2011) descreve como um dos principais problemas da micropropagação da figueira, a contaminação dos explantes por bactérias endofíticas.

A utilização de óleos essenciais na cultura de tecidos é apontado por Hamdeni et al. (2021) e Samah et al. (2017) como uma importante estratégia no controle de contaminantes, tendo demonstrado eficiência no controle de fungos, bactérias e vírus. É necessário, no entanto, se identificar a espécie medicinal e aromática potencial e sua concentração *in vitro*, que promova o controle de manifestações microbianas sem afetar a viabilidade do explante. Portanto, o uso de óleos essenciais pode oferecer novas oportunidades para o desenvolvimento de estratégias eficazes de controle de contaminações por microrganismos endofíticos (JASIM, SALIH, ATI, 2021; MEZIANI et al., 2019; ENNOURI et al., 2020).

Desse modo, este estudo teve como objetivo analisar o efeito de óleos essenciais de sete plantas condimentares e medicinais (Orégano, *Origanum vulgare*; Melaleuca, *Melaleuca alternifolia*; Citronela, *Cymbopogon nardus*; Gengibre, *Zingiber officinale*; Artemísia, *Artemisia vulgaris*; Alecrim, *Salvia rosmarinus*; Eucalipto, *Eucalyptus citriodora*) e de Extrato aquoso de Própolis, na redução de contaminação microbiana e sobre a taxa de sobrevivência dos explantes na micropropagação de camu-camu.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em três etapas: na primeira, foi realizada a extração dos óleos essenciais; na segunda, foi analisada a atividade antibacteriana sobre isolados da cultura de tecidos de camu-camu para determinação da concentração mínima inibitória, e por último foi determinada a atividade antimicrobiana na cultura de tecidos do camu-camu.

Extração e análise da composição química dos óleos essenciais

- Método de Extração dos óleos essenciais (OEs): O processo de extração dos OEs foi realizado empregando-se o método de hidrodestilação, em aparelho de Clevenger. Foram utilizadas 500 g da amostra. Após 2 horas de extração, o óleo obtido foi coletado, e acondicionado em frasco de vidro revestido com papel alumínio, previamente esterilizado. A extração foi realizada em triplicata, e foi avaliado o rendimento de cada espécie. Para a extração dos óleos essenciais foram utilizadas folhas, rizomas e bulbos frescos e secos.

Isolamento, caracterização e identificação de bactérias provenientes da cultura de tecidos de camu-camu

Cepas bacterianas de camu-camu foram isoladas no Laboratório de Microbiologia do Solo, LMS, da Embrapa Roraima, em meio de cultura ágar nutriente em placas de petri, pelo método de esgotamento por estrias. Em seguida, foram cultivados em ágar nutrientes para caracterização morfológica (tamanho, borda, superfície, elevação, cor, formato, brilho) a fim de separar em grupos primários segundo protocolo 005.POP.005.LMS da Embrapa Roraima que descreve o Procedimento Operacional Padrão Técnico para Caracterização de Culturas Bacterianas.

Óleos essenciais no controle *in vitro* de contaminantes da micropropagação de camu-camu

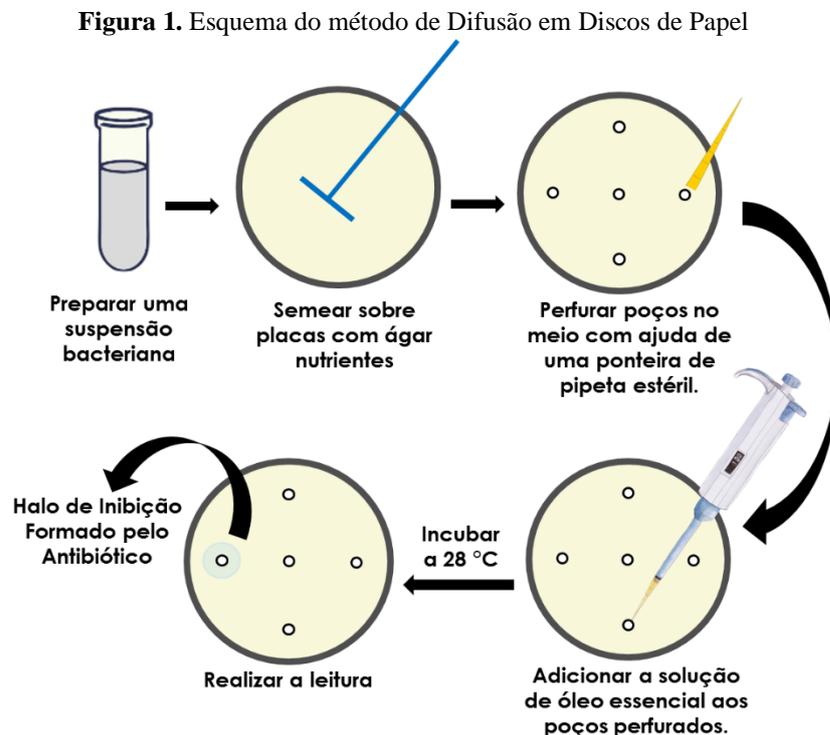
Para esta etapa, foram utilizados dois métodos diferentes para análise do potencial de óleos essenciais no controle *in vitro* de isolados bacterianos da cultura de tecidos do camu-camu. Primeiramente foi utilizado o método de difusão por perfuração em ágar, e em seguida os melhores resultados foram selecionados para o método de diluição em caldo para identificação de concentração mínima inibitória.

Método de Difusão por Perfuração em Ágar

Para este método foi utilizado o meio de cultura DYGS, e consiste em perfurar o meio de cultura sólido com auxílio de cilindros de 6 a 8 mm de diâmetro para a formação de poços

onde serão aplicados os óleos essenciais que serão analisados. Após o meio solidificar, foram realizadas sementeiras com diluição de cada cepa diluído a 10^4 UFC.mL⁻¹ em meio líquido DYGS sem adição de ágar. Após cerca de 30 minutos, os poços de 6 mm foram perfurados e preenchidos com 35 µL de solução-estoque de cada óleo essencial (Tabela 1), diluídas a uma concentração de 100 µL.mL⁻¹ em água destilada com Tween 80® a 10%. Como controle foi empregado polissorbato 80 (Tween 80®) a 10%, sem óleo essencial (OSTROSKY et al, 2008).

Esta é considerada uma técnica qualitativa, e possibilita analisar se os microrganismos são susceptíveis ou resistentes à substância a ser analisada. Após incubação a 28 °C por 24 horas, a leitura é realizada medindo o diâmetro do halo de inibição com paquímetro digital, podendo classificar o inóculo em suscetível (s) quando o halo é ≥ 8 mm, ou resistente (r) quando não há formação de halo ou foi inferior a 8mm, conforme esquema na Figura 1 (MICHELIN et al., 2005).



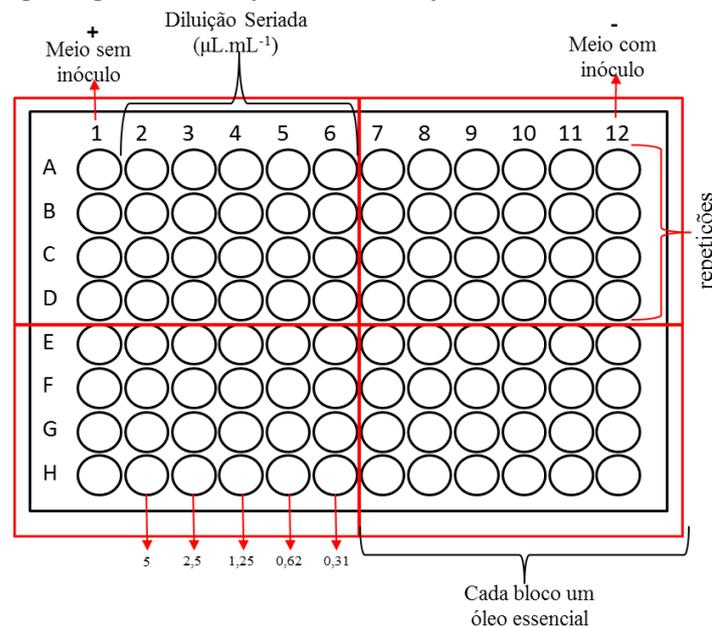
Fonte: Adaptado de Carneiro, 2020

Método de Diluição em Caldo para identificação de concentração mínima inibitória

Para este método foram utilizadas soluções-estoque de óleos essenciais preparadas previamente nas concentrações de 100 µL mL⁻¹, e as diluições seriadas foram realizadas com meio de cultura em microplaca. O preparo da microplaca (tipo ELISA de fundo U) consistiu em preencher todos os poços com 150 µL de meio líquido DYGS. No segundo poço adicionadas alíquotas (150,0 µL) de solução-estoque de óleos essenciais a partir da segunda coluna, que foram homogeneizadas e metade do volume da segunda coluna foi transferido para a terceira

coluna e homogeneizado, e assim, por conseguinte, até a última coluna com óleos essenciais. Nesta etapa foram utilizados quatro óleos essenciais, em cinco concentrações (5; 2,5; 1,25; 0,62 e 0,31 $\mu\text{L mL}^{-1}$), com quatro repetições cada concentração, para identificação da concentração mínima inibitória. Para emulsificação foi utilizado Tween® 80 ou polissorbato 80 ($\text{C}_{64}\text{H}_{124}\text{O}_{26}$) a 10% com meio de cultura. A inoculação dos isolados foi realizada com adição de 1 μL de suspensão bacteriana em cada poço, conforme esquema na Figura 2.

Figura 2. Esquema para identificação de concentração mínima inibitória de óleos essenciais



As placas foram mantidas em incubadora com agitação, a 28 °C por 24 horas para crescimento bacteriano. Após esse período, a densidade bacteriana foi medida por espectrofotometria em leitor de ELISA (Leitora Automática de Microplacas de 96 Poços - Mod. Tp Reader - ThermoPlate), a 450nm. A concentração mínima inibitória (CMI) foi identificada na concentração em que não houve crescimento bacteriano em comparação com o controle negativo (meio com inóculo, sem óleo essencial) e positivo (meio sem inóculo, sem óleo essencial). Foi medida, também por espectrofotometria, a densidade da microdiluição dos sem óleo essencial em cada concentração e sua possível influência sobre o resultado de cada tratamento.

Óleos essenciais no controle *in vitro* de contaminantes na micropropagação de camu-camu

Os explantes de camu-camu foram coletados no Campo Experimental Serra da Prata (CESP), da Embrapa Roraima, que fica localizado no município de Mucajaí/RR cuja localização geográfica da área experimental situa-se em W 60° 58'40''; N 2° 23'49''. Foram coletadas amostras em pontos aleatórios, priorizando plantas que não apresentassem nenhum

sinal de injúria ou danos causados por possíveis patógenos. Após a coleta, os segmentos caulinares foram levados ao laboratório e passaram por uma pré-limpeza. Os explantes de camu-camu, oriundos de brotações novas com um par de gemas axilares e aproximadamente 4 cm de comprimento, foram lavados em água corrente, para lixiviação parcial de compostos fenólicos liberados por consequência do corte dos tecidos. Posteriormente, foram imersos em solução de fungicida com 2 ml L⁻¹ Nativo® e 100 mg L⁻¹ do antioxidante ácido cítrico, conforme recomendação de Araújo et al. (2012), permanecendo nestas condições por 2 horas.

Após esta etapa, em câmara de fluxo laminar, os segmentos caulinares passaram por processo de desinfestação como descrito na sequência a seguir: os explantes foram imersos em álcool 70% por 1 minuto; logo após, foram imersos em hipoclorito de sódio a 1,5% com 2 gotas de detergente neutro por 10 minutos; ao final, os explantes desinfestados passaram por tríplice lavagem com água destilada, deionizada e autoclavada (DDA) para retirada total dos produtos da superfície dos tecidos.

Após a assepsia, os explantes tratados foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio WPM suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose, solidificado por 7 g L⁻¹ de ágar, com pH ajustado para 5,6 e tendo sido autoclavado a 1,2 atm de pressão e 120 °C por 15 minutos. Após a autoclavagem, em câmara de fluxo laminar, os óleos essenciais (alho, gengibre, citronela e orégano) foram adicionados no meio de cultura, em diferentes concentrações: 0,5; 1, 2, 3 e 4 µL mL⁻¹. Para a emulsificação dos óleos no meio de cultura, foi acrescido de Polysorbate 80 (Tween 80) a 10%, após a completa homogeneização dos óleos no meio de cultura, procedeu-se a distribuição nos tubos de ensaio. À testemunha não foi adicionado óleo essencial.

Os explantes foram avaliados a cada 7 dias, para observação das manifestações microbianas e condições do explante, e o resultado final avaliado aos 30 dias. Todas os explantes foram mantidos a 25 ± 2 ° C com fotoperíodo de 16 h de 35-40 µmol m⁻² s⁻¹ fornecido por lâmpadas fluorescentes brancas frias. Para cada concentração de óleo essencial foi realizado um delineamento inteiramente casualizado com 5 repetições composta por quatro explantes cada. Os dados foram analisados por meio do SISVAR (FERREIRA, 2014) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey à P = 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os óleos de plantas condimentares e medicinais são comumente utilizados no controle de contaminantes microbianos, por conterem em sua composição constituintes com forte efeito bactericida. A avaliação da ação antibacteriana de óleos essenciais foi realizada primariamente pelo método de difusão por perfuração em ágar. Na Tabela 1 pode-se notar quais isolados foram considerados suscetíveis (s) e quais foram resistentes (r) aos óleos testados.

Tabela 1. Ação bactericida de óleos essenciais em bactérias isoladas da cultura de tecidos de camu-camu, pelo método de difusão por perfuração em ágar*

Isolado	Halo de Inibição (mm)							
	Citronela	Orégano	Gengibre	Artemísia	Melaleuca	Alecrim	Eucalipto	Própolis
07A	0,00r ± 0,00	13,46s ± 0,37	0,00r ± 0,00	12,19s ± 3,62	19,87s ± 3,46	11,94s ± 1,26	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00
07B	0,00r ± 0,00	20,26s ± 3,33	0,00r ± 0,00	11,52s ± 2,66	41,32s ± 8,24	11,41s ± 2,54	17,25s ± 1,10	21,73s ± 3,45
07C	0,00r ± 0,00	17,82s ± 2,87	0,00r ± 0,00	14,21s ± 3,11	22,61s ± 2,77	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00
07D	0,00r ± 0,00	11,64s ± 0,03	11,19s ± 2,53	11,27s ± 1,28	23,43s ± 4,13	12,53s ± 3,97	10,92s ± 1,45	0,00r ± 0,00
07E	0,00r ± 0,00	12,92s ± 0,51	0,00r ± 0,00	10,13s ± 0,29	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00
07F	0,00r ± 0,00	18,16s ± 0,85	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00	19,52s ± 4,01	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00
07G	0,00r ± 0,00	16,29s ± 2,27	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00	27,15s ± 1,10	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00
10A	0,00r ± 0,00	15,48s ± 0,55	0,00r ± 0,00	16,21s ± 3,24	16,18s ± 2,19	9,58s ± 0,91	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00
10B	0,00r ± 0,00	19,87s ± 3,56	0,00r ± 0,00	16,40s ± 2,05	37,78s ± 5,11	10,08s ± 1,33	9,86s ± 1,07	0,00r ± 0,00
10C	0,00r ± 0,00	14,28s ± 1,20	0,00r ± 0,00	10,56s ± 0,05	20,59s ± 3,25	11,55s ± 2,15	8,63s ± 0,58	0,00r ± 0,00
10D	0,00r ± 0,00	18,81s ± 4,39	0,00r ± 0,00	9,36s ± 0,15	35,54s ± 5,42	15,53s ± 2,40	12,17s ± 0,28	9,70s ± 1,25
10E	0,00r ± 0,00	10,64s ± 1,18	10,93s ± 0,30	0,00r ± 0,00	15,54s ± 1,03	9,12s ± 0,80	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00
10F	0,00r ± 0,00	16,59s ± 5,48	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00	15,77s ± 2,89	13,09s ± 2,15	14,89s ± 1,68	0,00r ± 0,00
15A	0,00r ± 0,00	15,10s ± 1,61	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00	22,22s ± 2,25	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00
15B	10,16s ± 1,69	19,24s ± 3,13	10,90s ± 0,52	11,31s ± 1,99	22,91s ± 4,69	13,42s ± 2,60	11,10s ± 1,99	0,00r ± 0,00
15C	0,00r ± 0,00	20,65s ± 4,01	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00	37,72s ± 2,86	12,15s ± 3,45	11,20s ± 0,90	0,00r ± 0,00
15D	0,00r ± 0,00	26,05s ± 1,16	0,00r ± 0,00	15,60s ± 2,11	18,65s ± 1,20	15,28s ± 3,81	14,68s ± 1,67	0,00r ± 0,00
15E	0,00r ± 0,00	25,46s ± 4,01	14,54s ± 0,83	0,00r ± 0,00	22,60s ± 2,46	12,65s ± 0,94	12,11s ± 2,17	12,44s ± 2,39
15F	0,00r ± 0,00	18,94s ± 4,20	0,00r ± 0,00	15,91s ± 2,97	17,71s ± 2,48	16,15s ± 1,98	17,72s ± 1,26	0,00r ± 0,00
17A	0,00r ± 0,00	15,19s ± 0,77	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00	17,41s ± 5,79	11,67s ± 3,98	8,66s ± 0,60	0,00r ± 0,00
17B	0,00r ± 0,00	21,38s ± 0,67	0,00r ± 0,00	20,79s ± 0,22	21,69s ± 4,47	12,01s ± 3,24	14,41s ± 2,98	24,31s ± 3,05
17C	0,00r ± 0,00	18,88s ± 2,49	11,23s ± 0,17	13,77s ± 2,20	28,88s ± 5,90	13,09s ± 2,05	11,32s ± 1,38	0,00r ± 0,00
17D	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00	16,07s ± 3,52	0,00r ± 0,00	18,78s ± 3,21	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00	18,16s ± 3,04
18A	0,00r ± 0,00	16,38s ± 2,38	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00	25,16s ± 3,89	14,76s ± 3,83	14,63s ± 2,74	0,00r ± 0,00
18B	14,54s ± 3,00	27,13s ± 4,17	0,00r ± 0,00	14,04s ± 1,83	15,77s ± 1,67	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00	19,96s ± 3,07

18C	0,00r ± 0,00	19,39s ± 3,18	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00	14,45s ± 2,93	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00
18D	0,00r ± 0,00	20,21s ± 3,43	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00	14,82s ± 3,32	14,06s ± 2,65	13,81s ± 2,82	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00
18E	10,50s ± 1,20	21,07s ± 4,87	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00	16,33s ± 3,44	16,02s ± 1,08	19,01s ± 4,91	25,61s ± 2,81	0,00r ± 0,00
18F	0,00r ± 0,00	16,34s ± 0,14	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00	55,88s ± 6,91	15,58s ± 4,00	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00
18G	10,07s ± 0,89	25,04s ± 5,92	11,59s ± 0,59	0,00r ± 0,00	30,88s ± 1,24	38,56s ± 3,30	13,23s ± 0,99	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00
18H	0,00r ± 0,00	15,12s ± 0,80	0,00r ± 0,00	9,10s ± 0,36	26,68s ± 7,50	11,34s ± 0,66	9,85s ± 0,75	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00
18I	0,00r ± 0,00	19,41s ± 0,59	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00	14,69s ± 2,01	12,92s ± 3,13	10,93s ± 1,11	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00
18J	0,00r ± 0,00	10,53s ± 1,31	0,00r ± 0,00	12,12s ± 1,60	27,37s ± 4,65	9,30s ± 0,76	9,39s ± 1,66	8,25s ± 0,61	0,00r ± 0,00
18K	0,00r ± 0,00	17,97s ± 2,70	0,00r ± 0,00	8,87s ± 1,87	22,40s ± 3,60	12,31s ± 1,84	10,40s ± 0,69	9,48s ± 1,40	0,00r ± 0,00
18L	0,00r ± 0,00	21,87s ± 1,30	0,00r ± 0,00	14,03s ± 2,85	25,62s ± 4,10	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00
18M	0,00r ± 0,00	11,52s ± 0,86	13,58s ± 2,06	11,51s ± 0,76	23,67s ± 0,94	11,98s ± 0,36	11,57s ± 0,06	9,22s ± 0,65	0,00r ± 0,00
18N	0,00r ± 0,00	13,97s ± 2,06	9,70s ± 0,15	0,00r ± 0,00	24,80s ± 3,04	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00
18O	0,00r ± 0,00	12,77s ± 1,00	0,00r ± 0,00	13,69s ± 2,32	28,74s ± 4,14	14,71s ± 0,48	0,00r ± 0,00	8,75s ± 0,23	0,00r ± 0,00
18P	0,00r ± 0,00	16,50s ± 2,89	8,65s ± 0,99	9,53s ± 1,18	30,84s ± 8,42	20,08s ± 2,69	8,76s ± 0,65	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00
18Q	0,00r ± 0,00	13,53s ± 1,63	8,58s ± 0,59	8,22s ± 0,52	30,33s ± 4,33	12,23s ± 2,40	12,88s ± 2,30	0,00r ± 0,00	0,00r ± 0,00
Média	1,13	17,45	3,17	7,26	23,81	10,37	7,73	4,19	
CV %)	52,4	22,48	25,30	25,14	46,25	20,88	23,42	38,73	

*Cada valor representa a média de três repetições e os desvios padrão da média.

Santos et al. (2011) relata que em seu estudo o óleo essencial de orégano proporcionou controle sobre todos os microrganismos analisados, proporcionando os maiores halos de inibição. De modo similar, Silveira et al. (2012) e Martins et al. (2009) identificaram que o óleo essencial de citronela apresentou controle seletivo de microrganismos. Os óleos essenciais de gengibre e citronela e o extrato de própolis mostraram baixa eficiência no controle desses microrganismos pelo método de difusão nas concentrações utilizadas. É importante destacar ainda assim, é possível notar que o isolado 07E foi considerado suscetível apenas aos OE de orégano e Artemísia, e os isolados 07F, 07G, 15A e 18C apenas ao OE de orégano e melaleuca.

O OE de citronela e de gengibre apresentaram atividade antimicrobiana de forma seletiva. Do mesmo modo o extrato aquoso de própolis demonstrou efetividade apenas sobre 10 dos 40 isolados analisados. Essa resistência, é comumente relacionada a uma membrana externa à parede celular das bactérias Gram-negativas, composta de polissacarídios, que lhe confere menor permeabilidade a compostos hidrofóbicos, que é o caso dos óleos essenciais (CUTRIM et al., 2019; PROBST, 2012; BARBOSA et al, 2015).

Uso de óleos essenciais no controle bacteriano *in vitro* pelo método de microdiluição em caldo

No emprego do método de difusão em disco, os óleos essenciais que apresentaram melhor resposta foram Melaleuca, Orégano, Artemísia e Alecrim. Estes óleos essenciais foram selecionados para análise da concentração mínima inibitória, a partir da diluição seriada de 0,25 a 4,00 μ L ml⁻¹.

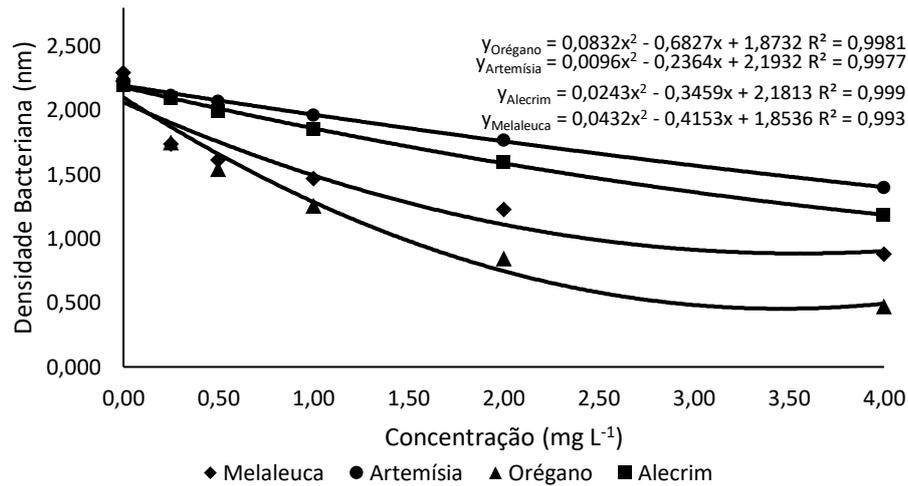
Na Tabela 4 e Figura 3, foi possível observar a influência da diluição sob a densidade bacteriana nas concentrações de cada óleo essencial utilizado.

Tabela 2. Ação bactericida de óleos essenciais em bactérias isoladas da cultura de tecidos de camu-camu, pelo método de microdiluição em caldo

Concentração (mg L ⁻¹)	Densidade Bacteriana (nm)			
	Melaleuca	Artemísia	Orégano	Alecrim
0,00	2,295 ± 0,04	2,215 ± 0,25	2,285 ± 0,04	2,196 ± 0,25
0,25	1,641 ± 0,06	2,115 ± 0,24	1,750 ± 0,02	2,100 ± 0,25
0,50	1,615 ± 0,05	2,071 ± 0,27	1,543 ± 0,04	2,00 ± 0,26
1,00	1,468 ± 0,04	1,962 ± 0,24	1,260 ± 0,03	1,853 ± 0,28
2,00	1,227 ± 0,03	1,769 ± 0,24	0,850 ± 0,07	1,600 ± 0,20
4,00	0,878 ± 0,02	1,400 ± 0,23	0,473 ± 0,02	1,184 ± 0,22
CV (%)	3,25	13,58	3,49	14,31
Média Geral	1,337	1,807	1,778	1,710

*Cada valor representa a média de três repetições e os desvios padrão da média.

Figura 3. Análise da Concentração Mínima Inibitória de óleos essenciais no controle de isolados bacterianos de cultura de tecidos de camu-camu.



Na Tabela 3 e Figura 3, notou-se a diferença entre as médias, os quais foram significativos pelo teste de Tukey, ao nível de 5% ($p < 0,05$). Os óleos essenciais de Alecrim e Artemísia apresentaram as médias mais altas de densidade bacteriana nas concentrações utilizadas. Nenhum dos OE controlaram completamente o crescimento bacteriano pelo método utilizado, mas fica claro a redução da densidade bacteriana à medida que aumenta a concentração dos óleos no meio de cultura. O estudo sugere que orégano e melaleuca demonstraram melhor eficiência no controle bacteriano.

A análise da concentração mínima inibitória permite encontrar a concentração mínima que tem potencial de controle de microrganismos *in vitro*. Para Meziani et al. (2019), além de encontrar o óleo essencial de melhor potencial antimicrobiano é essencial encontrar a concentração ideal que não apenas controlem a contaminação *in vitro* na cultura de tecidos, mas também não cause fitotoxicidade aos explantes o que geralmente interfere no processo de regeneração e até mesmo morte do material vegetativo.

Óleos essenciais no controle *in vitro* de contaminantes na micropropagação de camu-camu

Nesta fase, foram selecionadas as menores concentrações dos óleos analisados na etapa anterior, a fim de observar o potencial antimicrobiano e fitotóxico na cultura de tecidos de camu-camu. O estudo permitiu observar a redução na taxa de contaminação na micropropagação da espécie, sendo observado que a partir da concentração de $2\mu\text{L mL}^{-1}$ não houve manifestação de contaminantes fúngicos, à exceção de óleo essencial de gengibre que apresentou contaminação microbiana significativa em todas as concentrações analisadas. O óleo essencial de melaleuca apresentou efetividade no controle fúngico desde a concentração de $1\mu\text{L mL}^{-1}$. Também foi observada a redução na contaminação por bactérias, não havendo, no

entanto, o controle total como observado para contaminação fúngica, à exceção do óleo essencial de citronela nas concentrações de 3 e 4 $\mu\text{L mL}^{-1}$ em que o controle de bactérias foi efetivo. Em ordem inversa à redução de contaminação com o aumento na concentração dos óleos essenciais, percebe-se o aumento da oxidação dos explantes à medida que aumentam as concentrações, tendo os óleos de citronela e orégano apresentado potencial fitotóxico desde as mais baixas concentrações.

A seguir, na Tabela 3, observa-se a ação dos óleos testados sobre a oxidação, brotação, contaminação fúngica e contaminação bacteriana.

Tabela 3. Ação dos óleos essenciais sobre a cultura de tecidos de camu-camu*

Óleo Essencial	Oxidação (%)	Brotação (%)	Contaminação Fúngica (%)	Contaminação Bacteriana (%)
Artemísia	0,00b	5,00c	58,33ab	31,67a
Alecrim	0,00b	23,33b	76,67a	23,33a
Melaleuca	2,33ab	41,67a	68,33ab	33,33a
Orégano	4,67a	21,67b	56,67b	18,33a
CV (%)	193,43	71,81	30,20	76,55
Média	1,75	22,92	65,00	26,67

*Valores seguidos de letras iguais não diferem entre si na mesma coluna, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

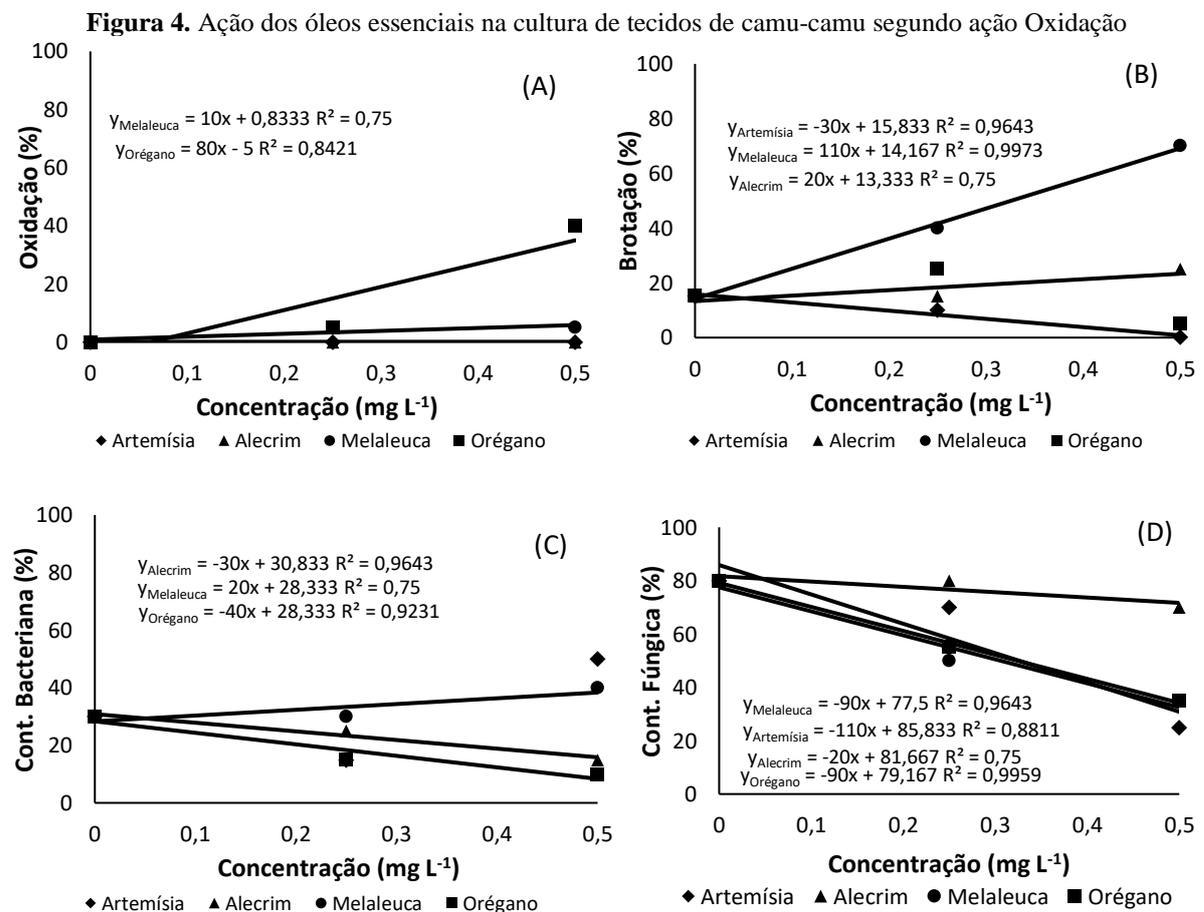
Meziani et al. (2019), analisaram os óleos de alecrim, tomilho, artemísia e outras espécies com potencial antimicrobiano e observaram que na fase de multiplicação *in vitro* todas as concentrações utilizadas foram capazes de inibir o crescimento de bactérias endofíticas, mas que as maiores concentrações foram tóxicas para os explantes. Ennouri et al. (2020) relatam que os óleos essenciais de orégano e tomilho foram eficazes no controle fúngico sem apresentar fitotoxicidade para o explante nas concentrações de 0,15 $\mu\text{L mL}^{-1}$, e por não interferirem no processo de regeneração e diferenciação dos tecidos vegetais.

Resultados semelhantes foram determinados por Taghizadeh, Solgi e Shahrjerdi (2016), onde o uso de óleos essenciais de eugenol, carvacrol e timol reduziu a contaminação *in vitro* por bactérias e fungos na micropropagação de morango. No entanto, os autores também relatam que essa adição ao meio de cultura aumentou a oxidação dos explantes, havendo uma interação significativa entre a concentração dos óleos essenciais e os sintomas de fitotoxicidade, ou seja, quanto maior a concentração dos óleos, maior o percentual de oxidação. Neste estudo, os óleos de orégano e citronela apresentaram fitotoxicidade desde as menores concentrações, sendo necessário, portanto, a identificação de concentração mínima inibitória que não provoque danos aos explantes.

O emprego de óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas também foi empregado por Meziani et al. (2019) para a na cultura de tecidos de tamareiras. Foram

empregados óleos de alecrim, tomilho, artemísia e outras espécies com potencial antimicrobiano. Os autores observaram que na fase de multiplicação todas as concentrações utilizadas (0,1–1%) foram capazes de inibir o crescimento de bactérias endofíticas, mas que as maiores concentrações foram tóxicas para os explantes. Ennouri et al. (2020) relatam que os óleos essenciais de orégano e tomilho foram eficazes no controle fúngico sem apresentar fitotoxicidade para o explante nas concentrações de $0,15\mu\text{L mL}^{-1}$, e por não interferirem no processo de regeneração e diferenciação dos tecidos vegetais.

A seguir, são observados os efeitos da concentração dos óleos essenciais na cultura de tecidos. Na Figura 3A, foi possível observar que o uso de óleo essencial de alecrim na cultura de tecidos de camu-camu resultou em menor percentual de oxidação quando comparado aos demais óleos essenciais utilizados neste estudo.



O OE de gengibre não foi satisfatório em nenhuma das concentrações, apresentando atividade fitotóxica e baixa eficiência na atividade antimicrobiana. Diferente do estudo de Cutrim et al. (2019), que identificou atividade antioxidante e antimicrobiana nos óleos essenciais e extratos hidroalcoólicos de gengibre e alecrim. O estudo identificou como

constituintes majoritários α -zingibereno e geraniol para OE de gengibre e os constituintes cânfora e 1,8-cineol para OE de alecrim.

Jasim, salih, e ati (2021) descrevem a utilização de óleos essenciais de tomilho (*Thymus vulgaris* L.), hortelã (*Mentha piperita* L.), cânfora (*Cinnamomum camphora*), Colocynthis (*Centropetalum colocynthis*) e rúcula (*Eruca vesicaria*) contra contaminação por fungos na cultura de tecidos. O estudo indica a inibição do crescimento micelial de forma eficaz a partir de 2 mL 100mL⁻¹ para os óleos de tomilho e hortelã, enquanto que os óleos essenciais de cânfora, colocíntida e rúcula apresentaram menor potencial de inibição *in vitro*. No entanto, foi identificado alto percentual de fitotoxicidade sobre os explantes, causando mortalidade significativa dos mesmos. Samah et al. (2017) descreve como possível explicação a ação do óleo essencial a seu caráter lipofílico, que pode facilitar a absorção pelos tecidos vegetais, melhorando o controle de contaminantes endofíticos, mas que, dependendo da composição e do aumento da concentração, também pode causar fitotoxicidade aos explantes.

Com base no estudo desenvolvido, foi possível observar o efeito dos óleos essenciais no controle de contaminantes e sobre a taxa de sobrevivência dos explantes na cultura de tecidos de camu-camu. O óleo essencial de melaleuca, mostrou ser o melhor tratamento *in vitro*, com baixa taxa de oxidação e melhor efetividade contra microrganismos em baixas concentrações, podendo ser usado na suplementação do meio de cultura, substituindo ou somado a outros produtos químicos, no sucesso do cultivo *in vitro* de camu-camu devido às suas propriedades antioxidantes, antibacterianas e antifúngicas.

CONCLUSÕES

Os óleos essenciais de orégano e melaleuca apresentaram melhor atividade antibacteriana no teste de difusão por perfuração em ágar. O óleo essencial de orégano apresentou maior controle na inibição do crescimento micelial na cultura de tecidos e significativa redução na contaminação bacteriana. Os óleos essenciais de melaleuca e alecrim apresentam melhor balanceamento entre taxa de fitotoxicidade e de brotação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMAGASE, H. Clarifying the Real Bioactive Constituents of Garlic. **The Journal of Nutrition**, Volume 136, Issue 3, March 2006, Pages 716S–725S. <https://doi.org/10.1093/jn/136.3.716S>.
- ARAÚJO, M. C. R.; VENDRAME, W. A.; CHAGAS, E. A.; RIBEIRO, M. I. G.; VILACA, R. Preliminary Studies On *In vitro* Propagation of Camu-Camu (*Myrciaria dúbia*), an

- Important Medicinal Plant. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**. 128:52-54. 2015.
- ARAÚJO, M. C. R.; CHAGAS, E. A.; RIBEIRO, M. I. G.; PINTO, S. T. S.; CHAGAS, P. C.; VENDRAME, W.; MOTA FILHO, A. B.; SOUZA, O. M. Micropropagation of caçari under different nutritive culture media, antioxidants, and levels of agar and pH. **African Journal of Biotechnology**. Vol. 15(33), pp. 1771-1780, 17 August, 2016. DOI: 10.5897/AJB2016.15417.
- ARAÚJO, M. C. R.; Callus induction and pro-embryogenic mass formation in *Myrciaria dubia*, an important medicinal and nutritional plant. **Crop Breeding and Applied Biotechnology (Online)**, v., p. , 2021.
- BARBOSA, L. N.; PROBST, I. S.; ANDRADE, B. F. M. T.; ALVES, F. C. B.; ALBANO, M.; CUNHA, M. L. R. S.; DOYAMA, J. T.; RALL, V. L. M.; FERNANDES JÚNIOR, A. *In vitro* Antibacterial and Chemical Properties of Essential Oils Including Native Plants from Brazil against Pathogenic and Resistant Bacteria. **Journal of Oleo Science**, 64, (3) 289-298 (2015). <https://doi.org/10.5650/jos.ess14209>.
- BAYDAR, H. et al. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, v. 15, n. 3, p. 169-172, 2004.
- BOTAS, J. C. S. Caracterização química e propriedades bioativas de *Allium sativum* L. com diferentes proveniências e processamentos. (Dissertação) Instituto Politécnico de Bragança, Universidade de Salamanca. 2017. 61p.
- CHORIANOPOULOS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; ALIGIANNIS, N.; MITAKU, S.; NYCHAS, G.-J.; HAROUTOUNIAN, S. A. Essential oils of *satureja*, *origanum*, and *thymus* species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 26, p. 8261-8267, 2004.
- CARNEIRO, F. B.; BASILIO JÚNIOR, I. D.; LOPES, P. Q.; MACÊDO, R. O. Variação da quantidade de β -cariofileno em óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng., Lamiaceae, sob diferentes condições de cultivo. **Rev. bras. farmacogn.** 20 (4) Set 2010. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000400021>
- CUTRIM, E. S. M.; TELES, A. M.; MOUCHREK, A. N.; MOUCHREK FILHO, V. E.; EVERTON, G. O. Avaliação da Atividade Antimicrobiana e Antioxidante dos Óleos Essenciais e Extratos Hidroalcoólicos de *Zingiber officinale* (Gengibre) e *Rosmarinus officinalis* (Alecrim) **Rev. Virtual Quim.**, 2019, 11 (1), 60-81.
- CHAGAS, E. A.; CARVALHO, A. S. C.; BACELAR-LIMA, C. G.; DUARTE, O. R.; NEVES, L. C.; ALBUQUERQUE, T. C. S. Ocorrência e distribuição geográfica de populações nativas de camu-camu no estado de Roraima. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2012, 22, Bento Gonçalves, Anais... Bento Gonçalves, RS: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 22. 2012.
- CHAGAS, E.A., LOZANO, R.M.B., CHAGAS, P.C., BACELAR-LIMA, C.G., GARCIA, M.I.R., OLIVEIRA, J.V., SOUZA, O.M., MORAIS, B.S., ARAÚJO, M. DA C. DA R. Intraspecific variability of camu-camu fruit in native populations of northern Amazonia. **Crop Breed. Appl. Biotechnol.** 2015, 15, 265–271. <https://doi.org/10.1590/1984-70332015v15n4a44>
- EMBRAPA RORAIMA. Procedimento Operacional Padrão Técnico para Caracterização de Culturas Bacterianas. Protocolo 005.POP.005.LMS, Embrapa Roraima 2005.

- ENNOURI, A.; LAMIRI, A.; ESSAHLI, M.; BENCHEQROUN, S. K. Chemical Composition of Essential Oils and Their Antifungal Activity in Controlling *Ascochyta rabiei*. **J. Agr. Sci. Tech.** (2020) Vol. 22(5): 1371-1381
- FERREIRA, D. F. Sisvar: A Computer Statistical Analysis System. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, V.35, n.6, p.1039-1042, 2014.
- GRIGIO, M. L, MOURA, E.A., CARVALHO, G.F., ZANCHETTA, J.J., CHAGAS, P.C., CHAGAS, E.A., DURIGAN, M.F.B. Nutraceutical potential, qualitative and acceptability of different camu-camu popsicle. **J. Food Process. Preserv.** 45, e15305, 2021a. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15305>
- GRIGIO, M. L; MOURA, E. A.; CARVALHO, G. F.; ZANCHETTA, J. J.; CHAGAS, P. C.; CHAGAS, E. A.; DURIGAN, M. F. B. Nutraceutical potential, quality and sensory evaluation of camu-camu pure and mixed jelly. **Food Sci. Technol.** 41, fst.03421, 2021b. <https://doi.org/10.1590/fst.03421>
- GRIGIO, M. L; MOURA, E.A.; CHAGAS, E.A.; DURIGAN, M.F.B.; CHAGAS, P.C.; CARVALHO, G.F.; ZANCHETTA, J.J. Bioactive compounds in and antioxidant activity of camu-camu fruits harvested at different maturation stages during postharvest storage. **Acta Sci. Agron.** 43, e50997, 2021c. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v43i1.50997>
- JAKIEMIU, E. A. R. **UMA CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DO ÓLEO ESSENCIAL E DO EXTRATO DE TOMILHO (*Thymus vulgaris* L.)**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal do Paraná. 2008, 89 f.
- JASIM, N. S.; SALIH, A. M.; ATI, M-A. Evaluating the efficiency of plants essential oils against Common fungal contamination affecting tissue culture of date palms (*Phoenix Dactylifera* L.) by *in vitro* culture. **Research Journal of Chemistry and Environment.** Vol. 25 (6) June (2021).
- JAKIEMIU, E. A. R. Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.). 2008, 90p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- KANG R, HELMS R, STOUT MJ, JABER H, NAKATSU T. Vietnamese culinary herbs in the United States. **J Agric Food Chem** 1992, 40: 2328-2332.
- MNAYER, D.; FABIANO-TIXIER, A.-S.; PETITCOLAS, E.; HAMIEH, T.; NEHME, N.; FERRANT, C.; FERNANDEZ, X.; CHEMAT, F. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of six essentials oils from the Alliaceae family. **Molecules**, 2014, 19, 20034-20053. Doi: [doi: 10.3390/molecules191220034](https://doi.org/10.3390/molecules191220034).
- MEZIANI, R.; MAZRI, M. A.; ESSARIOUI, A.; ALEM, C.; DIRIA, G.; GABOUN, F.; IDRISY, H. E.; LAAGUIDI, M.; JAITI, F. Towards a new approach of controlling endophytic bacteria associated with date palm explants using essential oils, aqueous and methanolic extracts from medicinal and aromatic plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, 2019volume 137, p. 285–295.
- MICHELIN, D. C.; MORESCHI, P. E.; LIMA, A. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; PAGANELLI, M. O.; CHAUD, M. V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Rev Bras Farmacogn** 2005, 15: 316-320.
- OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M.; E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Braz J. Pharmacogn.** 18(2): Abr./Jun. 2008.
- PALÚ, E.G.; CORRÊA, L. S.; SUZUKI, A.N. BOLIANI, A.C. **Uso de antibióticos para o controle de bactérias endógenas visando à micropropagação da figueira**. Propagação Rev. Bras. Frutic. 33 (2) Jun 2011. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452011000200031>.

- PASQUAL, M. CHAGAS, E. A. Cultura de tecidos em espécies frutíferas. Boa Vista: Editora da UFRR, 2014. 280 p.
- PETERS, C.M. & VASQUEZ, A. 1986/1987. Estudios ecologicos de camu-camu (*Myrciaria dubia*) I. producción de frutos en poblaciones naturales. Acta Amazônica. 16/17:161-174.
- PINEDO, P. M.; RAMIREZ, N.; BLASCO, M. L. Notas preliminares sobre el araza (*Eugenia stipitata*), frutal nativo de la Amazônia Peruana, Pub. Misc. 229, **Instituto Nacional de Investigación Agrária**. Lima, Peru. 58p, 1981.
- PROBST, I. S. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS E AVALIAÇÃO DE POTENCIAL SINÉRGICO. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu. – Botucatu : [s.n.], 2012
- QUAMBUSCH, M; PIRTTILÄ, 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**, Volume 34, 524–533, 2014. DOI:10.1093/treephys/tpu027.
- QUAMBUSCH, M.; WINKELMANN, T. Bacterial Endophytes in Plant Tissue Culture: Mode of Action, Detection, and Control. In LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. **Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology**, vol. 1815. ©Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature, 2018. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4>.
- SILVA, J. P. L.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; PEREZ, D. V.; FRANCO, B. D. G.M. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella Enteritidis*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 30(Supl.1): 136-141, maio 2010.
- SILVEIRA, E.B.; GOMES, A.M.A; MARIANO, R.L.R.; SILVA NETO, E.B. Bacterização de sementes e desenvolvimento de mudas de pepino. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.2, p.217-221, abril-junho 2004.
- SIVROPOULOU, A.; PAPANIKOLAOU, E.; NIKOLAOU, C.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M.. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 1202-1205, 1996.
- SOUSA, R. C. P.; CHAGAS, E. A.; GUIMARÃES, P. V. P.; NASCIMENTO FILHO, W. B., MELO FILHO, A.A. Minerals in Aqueous Extract of the Coproducts *Myrciaria dubia* (Kunth.) McVaugh, Myrtaceae. **Rev. Virtual Química** 7, 1299–1305, 2015. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150072>.
- SAMAH A. MOKBEL, S. A.; KHALIL, A. A.; EL-SHAZLY, M. A. Efficiency of eugenol oil nanoemulsion against Banana bunchy top virus and contamination with fungi in plant tissue culture. **Arab J. Biotech.**, Vol. 20, No. (1) January (2017): 33-50.
- TAGHIZADEH, M.; SOLGI, M.; SHAHRJERDI, I. Various aspects of essential oils application for pathogens controlling in Strawberry *in vitro* culture. **Academia Journal of Agricultural Research** 4 (11): 667-674, November, 2016. DOI: 10.15413/ajar.2016.0118.
- ULTEE, A.; SLUMP, R. A.; STEGING, G.; SMID, E. J. Antimicrobial activity of carvacrol toward *Bacillus cereus* on rice. *J Food Prot.* 2000 May; 63(5):620-4. doi: 10.4315/0362-028x-63.5.620.
- VILLACHICA, H.L. 1996. El cultivo del camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) en la Amazonia peruana. Mirigraf, Lima.
- YUYAMA, K.; MENDES, N. B.; VALENTE, J. P. Longevidade de sementes de camu-camu submetidas a diferentes ambientes e formas de conservação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 2, p. 601-607, 2011.
- YUYAMA, k. A cultura de camu-camu no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**. vol.33 no.2 Jaboticabal June, 2011.

CAPÍTULO IV: USO DE ANTIBIÓTICOS NO CONTROLE DE BACTÉRIAS ISOLADAS DA MICROPROPAGAÇÃO DE *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh.

Resumo

A micropropagação do camu-camu ainda apresenta dificuldades em obter culturas assépticas devido à alta taxa de contaminação bacteriana. Neste estudo objetivou-se analisar o comportamento *in vitro* de cinco clones de camu-camu quanto à contaminação microbiana e oxidação dos explantes, assim como a identificação e controle com antibióticos das bactérias isoladas da cultura. Foram selecionadas bactérias provenientes de explantes de camu-camu, após 30 dias de cultivo em meio WPM. As manifestações bacterianas foram selecionadas para isolamento pelo método de esgotamento por estrias em meio DYGS. Para análise do controle bacteriano *in vitro*, foram realizados dois testes: teste de difusão em discos com oito antibióticos: Estreptomicina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), Cefalexina ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$), Amoxicilina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), Ampicilina ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), Vancomicina ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$), Cefotaxima ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$), Ceftriaxona ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) e Rifampicina ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$), em concentrações fixas, com três repetições; e pelo teste de diluição em caldo por microdiluição para identificação da concentração mínima inibitória, onde foram utilizados Cefalexina, Ceftriaxona e Rifampicina isolados e combinados, todos nas concentrações de 12,5, 25, 50, 100 e 200mg L⁻¹, com quatro repetições. A contaminação bacteriana na cultura de tecidos de camu-camu foi considerada alta (80%). Foram isolados um total de 40 isolados bacterianos provenientes de cinco clones de camu-camu e foi possível observar que há uma variação entre os isolados no que diz respeito à resistência e suscetibilidade a cada antibiótico. Os antibióticos Ceftriaxona, Cefalexina e Rifampicina, promoveram maior halo de inibição no teste de difusão em disco de papel. Na análise de concentração mínima inibitória, a Cefalexina isolada apresentou menor controle no crescimento bacteriano e a combinação dos antibióticos Cefalexina, Ceftriaxona e Rifampicina resultou no melhor controle das cepas bacterianas assim como a Ceftriaxona isolada. O estudo identificou que tratamentos com diferentes antibióticos combinados permite ampliar a inibição de diferentes microrganismos.

Palavras-chave: Camu-camu; Antibióticos; Cultura de tecidos; Controle bacteriano.

Abstract

Camu-camu micropropagation still presents difficulties in obtaining aseptic cultures due to the high rate of bacterial contamination. This study aimed to analyze the *in vitro* behavior of five camu-camu clones regarding microbial contamination and oxidation of explants, as well as the identification and antibiotic control of bacteria isolated from the culture. Bacteria from camu-camu explants were selected after 30 days of cultivation in WPM medium. Bacterial manifestations were selected for isolation by the streak stripping method in DYGS medium. To analyze the bacterial control *in vitro*, two tests were performed: disk diffusion test with eight antibiotics: Streptomycin ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), Cephalexin ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$), Amoxicillin ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), Ampicillin ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), Vancomycin ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$), Cefotaxime ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$), Ceftriaxone ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) and Rifampicin ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$), at fixed concentrations, with three repetitions; and by the broth dilution test by microdilution to identify the minimum inhibitory concentration, where Cefalexin, Ceftriaxone and Rifampicin were used alone and in combination, all at concentrations of 200, 100, 50, 25, and 12.5 mg L⁻¹, with four repetitions. Bacterial contamination in camu-camu tissue culture was considered high (80%). A total of 40 bacterial isolates from five camu-camu clones were isolated and it was possible to observe that there is

a variation between the isolates with regard to resistance and susceptibility to each antibiotic. The antibiotics Ceftriaxone, Cefalexin and Rifampicin, promoted greater inhibition halo in the paper disk diffusion test. In the analysis of minimum inhibitory concentration, Cefalexin alone showed less control on bacterial growth and the combination of antibiotics Cephalexin, Ceftriaxone and Rifampicin resulted in better control of bacterial strains as well as Ceftriaxone alone. The study identified that treatments with different antibiotics combined allow to amplify the inhibition of different microorganisms.

Keywords: Camu-camu; Antibiotics; Tissue culture; Bacterial control.

INTRODUÇÃO

A cultura de tecidos vegetais, apesar do seu alto custo de implementação e manutenção, é considerada como um dos melhores métodos de propagação em larga escala. Seu sucesso, no entanto, está diretamente ligado ao desenvolvimento de protocolos com as melhores condições nutricionais e de controle de contaminantes *in vitro* das espécies de interesse, sendo este último a principal causa de perdas econômicas em laboratórios de cultura de tecidos vegetais, sejam comerciais ou científicos (KHAN et al., 2018).

Araújo et al. (2015) aponta a micropropagação como alternativa para o processo de formação de mudas de camu-camu, que com o uso de técnicas de cultivo *in vitro* como organogênese e embriogênese somática é possível a multiplicação em larga escala de plantas idênticas durante todo o ano. Araújo et al. (2021) avaliou a multiplicação *in vitro* da espécie via embriogênese somática a partir de diferentes concentrações de citocinina (BAP) e auxina (2,4-D) em dois meios diferentes (MS e WPM), identificando como melhor formação de calos ou massas pró-embriogênicas em seguimentos caulinares, não diferenciando, no entanto o tipo de meio, e obtendo os melhores resultados nas maiores concentrações de 2,4D independente da concentração de BAP no meio.

A micropropagação do camu-camu, segundo Araújo et al. (2012), ainda apresenta dificuldades em obter culturas assépticas devido à alta taxa de contaminação microbiana que possui acelerado crescimento no meio de cultura, favorecendo à competição por nutrientes. O estudo indicou a necessidade de suplementação do meio com antibióticos, considerando que, mesmo após desinfestação, houve 70% de contaminação. O estudo também sugere que havia presença de bactérias endofíticas, que só foram detectadas no meio após semanas do estabelecimento *in vitro*.

A contaminação microbiana resulta na maioria das vezes no crescimento variável das plântulas, redução de brotação e de enraizamento, assim como necrose dos tecidos e mortalidade das plântulas (LEIFERT, CASSELLS, 2001; ODUTAYO et al., 2007). Young,

Hutchins e Canfield (1984) apontaram dificuldades na esterilização da superfície de plantas lenhosas para produzir culturas axênicas, apontando como solução o uso de antibióticos.

Segundo Scherwinski-Pereira (2010), o insucesso na redução de contaminação tem sido a principal perda de produtividade em laboratórios de cultura de tecidos. O uso de antibióticos, muitas vezes não elimina completamente os contaminantes, mas apenas reduz a um nível baixo de detecção, podendo se manifestar novamente nos subcultivos posteriores. Por isso o autor sugere a combinação de técnicas, como a termoterapia e quimioterapia, assim como o isolamento e identificação desses microrganismos, a fim de minimizar os danos à cultura *in vitro* de uma cultura.

Leone et al. (2019) afirma que a migração natural de bactérias endofíticas está associada à exudação dos tecidos das plantas para colonizar o meio de cultura e competir por nutrientes com as plântulas, podendo haver a redução no vigor fisiológico quando não há o tratamento com antibióticos. Os autores analisaram o efeito de quatro antibióticos sobre o vigor, crescimento e brotação *in vitro* de *Eucalyptus cloeziana* F. Muell., e notaram que alguns antibióticos além de não controlar o crescimento bacteriano ainda afetaram o desenvolvimento dos explantes. O meio de cultura suplementado com 400ug.mL⁻¹ de Timetin favoreceu tanto o controle bacteriano quanto o vigor do explante.

É necessário, no entanto, avaliar o efeito dos antibióticos, destacam Scherwinski-Pereira e Fortes (2003), pois apesar de muitos se mostrarem efetivos no controle de contaminantes bacterianos, há antibióticos que geram efeitos fitotóxicos severos, afetando muitas vezes o crescimento e multiplicação *in vitro*.

A contaminação bacteriana na cultura de tecidos de camu-camu foi observada na etapa de estabelecimento *in vitro*, resultando na maioria das vezes na dificuldade de avanços à multiplicação. Desse modo, no presente estudo, foram analisados o comportamento *in vitro* de cinco clones de camu-camu quanto à contaminação microbiana e oxidação, assim como a identificação e controle com antibióticos das bactérias isoladas da cultura.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e preparo do material vegetal

Os explantes foram coletados no Campo Experimental Serra da Prata (CESP) na cidade de Mucajaí-RR (22°56'23.4''S 48°34'11.6''W). Foram coletadas 40 amostras de cada um dos clones identificados como UAT0796, UAT1096, UAT1596, UAT1796 e UAT1896, em pontos aleatórios, priorizando plantas que não apresentassem nenhum sinal de injúria ou danos causados por possíveis patógenos.

Após a coleta, os segmentos caulinares com aproximadamente 4 cm de comprimento, foram levados ao laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Roraima, foram imersos em solução de fungicida com 2 ml L⁻¹ Nativo® e 100 mg L⁻¹ do antioxidante ácido cítrico, conforme recomendação de Araújo et al. (2015), permanecendo nestas condições por 2 horas. Após esta etapa, em câmara de fluxo laminar, os explantes passaram por processo de desinfestação: os explantes foram imersos em álcool 70% por 1 minuto e em seguida imersos em hipoclorito de sódio a 1,5% com duas gotas de detergente neutro por 10 minutos e tríplice enxague com água destilada, deionizada e autoclavada (DDA) para retirada total dos produtos da superfície dos tecidos (Figura 1).

Figura 1. Segmentos caulinares de camu-camu (A), Processo de desinfestação dos explantes em solução fungicida Nativa® (B), Explantes de camu-camu após assepsia (C).



Condições de cultivo

Após a assepsia, os explantes tratados foram inoculados em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio WPM, suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e 100 mg L⁻¹ de ácido cítrico, solidificado por 7 g L⁻¹ de ágar, com pH ajustado para 5,6 e tendo sido autoclavado a 1,2 atm de pressão e 120 °C por 15 minutos.

Todos os explantes foram mantidos a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 16 h de 35-40 μmol m⁻¹s⁻¹ fornecido por lâmpadas fluorescentes brancas frias. Os explantes foram avaliados a cada sete dias, para observação quanto ao aparecimento de microrganismos na fase de estabelecimento *in vitro* de camu-camu.

Nesta etapa também foi analisado, com delineamento inteiramente casualizado com oito repetições e cinco explantes cada, as seguintes variáveis: oxidação dos explantes, contaminação bacteriana e contaminação fúngica. Os dados foram analisados por meio do SISVAR (FERREIRA, 2014) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a P = 0,05.

Isolamento, caracterização e identificação bactérias isoladas da cultura de tecidos de camu-camu

O isolamento dos microrganismos da cultura de tecidos de camu-camu foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Solo, da Embrapa Roraima e se deu por detecção dependente da cultura de tecidos. Os tubos provenientes da micropropagação de clones de camu-camu que apresentaram manifestação bacteriana foram reservados para isolamento e identificação em meio de cultura DYGS em placas de Petri, pelo método de esgotamento por estrias (QUAMBUSCH, WINKELMANN, 2018).

Caracterização morfológica

Os isolados bacterianos de camu-camu foram cultivados em ágar nutrientes para caracterização morfológica (tamanho, borda, superfície, elevação, cor, formato, brilho das colônias) a fim de separar os isolados em grupos primários seguindo protocolo 005.POP.005.LMS (2005) da Embrapa Roraima que descreve o Procedimento Operacional Padrão Técnico para Caracterização de Culturas Bacterianas.

Métodos de Controle Bacteriano *in vitro*

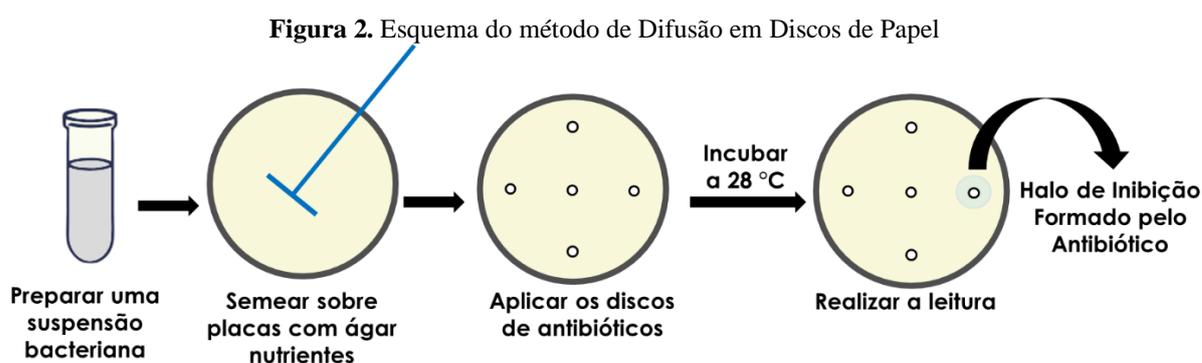
Após seleção e identificação morfológica dos isolados, foi realizado o experimento para controle bacteriano *in vitro* visando a eliminação desses microrganismos na micropropagação do camu-camu. O trabalho foi conduzido no Laboratório de Microbiologia de Solos da Embrapa Roraima, em Boa Vista, Roraima, entre os meses de fevereiro de 2020 a agosto de 2021. Os contaminantes bacterianos isolados, foram semeados em meio líquido DYGS e incubadas sob agitação por 48 horas para posterior utilização nos tratamentos de controle antibacteriano. Foram instalados dois experimentos visando o controle bacteriano.

No experimento 1 realizou-se o método de difusão em discos de papel. Esse é um método qualitativo, e consiste na aplicação de um disco de papel-filtro de 6 mm impregnado com antimicrobiano sobre o ágar com o inóculo. O meio de cultura ágar nutriente é distribuído em placas de Petri, e após o resfriamento, cerca de 5 μL do inóculo crescido em meio DYGS líquido é aplicado sobre a placa e espalhado com auxílio de alça de Drigalski. Após essa etapa, os discos de papel foram aplicados sobre o meio de cultura com o inoculante e as placas dispostas em incubadora a 28°C.

Para esta análise foram utilizados discos de oito antibióticos: estreptomicina (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$), cefalexina (30 $\mu\text{g mL}^{-1}$), amoxicilina (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$), ampicilina (10 $\mu\text{g mL}^{-1}$), vancomicina (30

$\mu\text{g mL}^{-1}$), cefotaxima ($30 \mu\text{g mL}^{-1}$), ceftriaxona ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) e rifampicina ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$), em concentrações fixas, com três repetições para cada antibiótico.

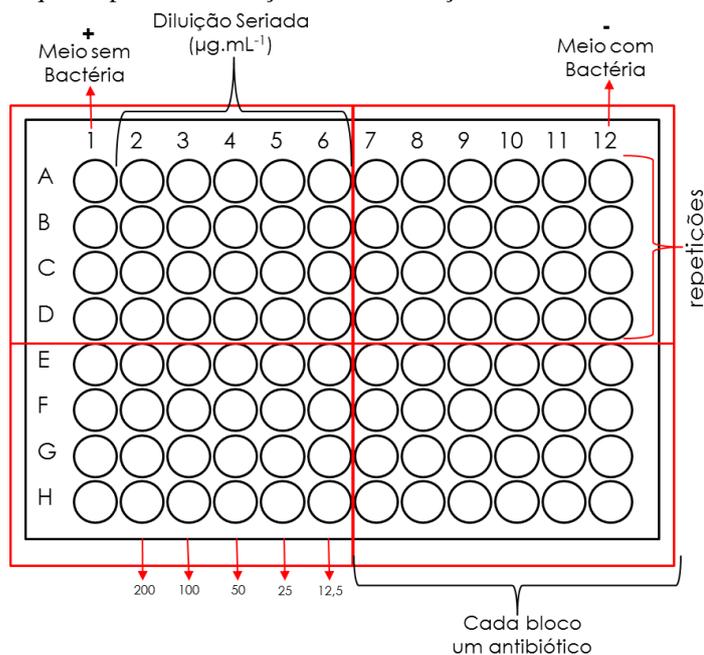
A leitura das placas foi realizada após 24 horas de incubação, para avaliar a difusão do antimicrobiano no meio de cultura. A leitura realizada medindo o diâmetro do halo de inibição permitiu classificar o inóculo em suscetível (S) quando o halo foi superior a 8 mm, ou resistente (R) quando não houve formação de halo ou foi inferior a 8 mm (Carneiro, 2020), conforme esquema na Figura 2.



No experimento 4, utilizou-se o método de diluição em caldo para identificação da concentração mínima inibitória (CMI). O método de diluição em caldo por microdiluição utiliza microplacas do tipo ELISA, com 96 poços, com volume até $300 \mu\text{L}$, e considera a proporção de crescimento do inóculo no meio líquido e a concentração da substância utilizada para seu controle (OSTROSKY et al., 2008).

Soluções-estoque de antibióticos foram preparadas previamente nas concentrações de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, e as diluições seriadas foram realizadas com meio de cultura em microplaca. O preparo da microplaca (tipo ELISA fundo U) consistiu em preencher todos os poços com $150 \mu\text{L}$ de meio líquido DYGS e adicionadas alíquotas ($150 \mu\text{L}$) de solução-estoque de antibióticos a partir da segunda coluna, que foram homogeneizadas e metade do volume da segunda coluna foi transferido para a terceira coluna e homogeneizado, e assim, por conseguinte, até a última coluna com antibióticos. Nesta etapa foram utilizados três antibióticos independentes (Cefalexina, Ceftriaxona e Rifampicina) e uma combinação com três antibióticos (Cefalexina, Ceftriaxona e Rifampicina) em cinco concentrações ($200, 100, 50, 25$ e $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$), com quatro repetições cada concentração, para identificação da concentração mínima inibitória. A inoculação dos isolados foi realizada com adição de $1 \mu\text{L}$ de suspensão bacteriana em cada poço, conforme esquema na Figura 3.

Figura 3. Esquema para identificação de concentração mínima inibitória de antibióticos



As placas foram mantidas em incubadora com agitação, a 28 °C por 24 horas para crescimento bacteriano. Após esse período, a densidade bacteriana foi medida por espectrofotometria em leitor de ELISA (Leitora Automática de Microplacas de 96 Poços - Mod. Tp Reader - ThermoPlate), a 450 nm. A concentração mínima inibitória foi identificada na concentração em que houve menor densidade bacteriana por absorvância (nm) em comparação com o controle negativo (meio com inóculo, sem antibiótico) e positivo (meio sem inóculo, sem antibiótico). Foi medida, também por espectrofotometria, a densidade da microdiluição dos antibióticos em cada concentração e sua possível influência sobre cada tratamento (OLIVEIRA et al., 2009; SANTOS FILHO, 2019).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Micropropagação de Clones Superiores de Camu-camu

Verificou-se uma importante diferenciação no que diz respeito à oxidação e contaminação fúngica entre os genótipos, tendo destaque os clones UAT0796 e UAT1596, que apresentaram maior resistência ao processo de desinfestação e menor percentual de contaminação fúngica *in vitro*. A contaminação bacteriana, no entanto, não apresentou diferenças significativas entre os clones, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Contaminação fúngica, bacteriana e porcentagem de oxidação em explantes de camu-camu na fase de estabelecimento *in vitro*.

Genótipos	Oxidação (%)	Percentual de Contaminação	
		Cont. Fúngica (%)	Cont. Bacteriana (%)
UAT0796	47,5b	35,0b	87,5a
UAT1096	75,0ab	57,5ab	95,0a
UAT1596	50,0b	47,5ab	95,0a
UAT1796	82,5a	80,0a	90,0a
UAT1896	75,0ab	52,5ab	87,5a

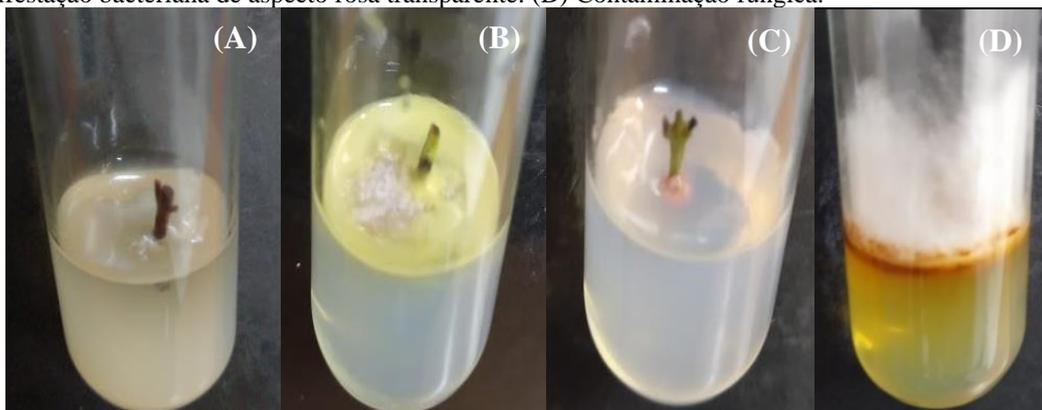
*Valores seguidos de letras iguais não diferem entre si na mesma coluna, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

O método de micropropagação clonal de plantas difere significativamente das tecnologias tradicionais por sua velocidade e alto coeficiente de reprodução, bem como pela possibilidade de obtenção de um material de plantio homogêneo e livre de vírus. No entanto, é preciso a melhoria de métodos para romper com a principal limitação para o estabelecimento *in vitro* de clones superiores de camu-camu atualmente: a contaminação fúngica e bacteriana (ARAÚJO et al., 2012; YABLONSKAYA, GINS, MOLCHANOVA, 2016).

Cid (2014) considera a fase de estabelecimento na micropropagação, também conhecida como fase 0 (zero), como uma das fases mais críticas da cultura de tecidos. O principal desafio consiste em obter plântulas assépticas e viáveis, livres de contaminação por fungos e bactérias e da oxidação que acarreta no escurecimento do explante (OLIVEIRA et al., 2011).

Na Figura 4 foi possível observar a diversidade de microrganismos que se manifestaram nas primeiras semanas da fase de estabelecimento *in vitro*. Na Figura 4A é perceptível a oxidação do explante, possivelmente devido ao processo de desinfestação e contaminação bacteriana. Já na Figura 4D, com contaminação fúngica, fica claro o quanto essa contaminação pode afetar a micropropagação, pois, o seu crescimento sempre muito rápido, supera o do explante, que fica totalmente encoberto pelo fungo.

Figura 4. Manifestação bacteriana no estabelecimento *in vitro* de camu-camu: (A) Manifestação bacteriana com aspecto branco leitoso; (B) Manifestação mista, bacteriana e fúngica, bactéria de aspecto amarela opaco; (C) Manifestação bacteriana de aspecto rosa transparente. (D) Contaminação fúngica.



Palú et al. (2011) descreve como um dos principais problemas da micropropagação da figueira, a contaminação dos explantes por bactérias endofíticas e por isso sugere o seu controle através da suplementação dos meios de cultura com antibióticos.

Neste estudo, a manifestação bacteriana foi considerada alta, apresentando mais de 80%, concordando com Araújo et al. (2012) e Ribeiro (2021), que apontam a contaminação bacteriana como principal limitação para o estabelecimento da cultura *in vitro*.

Isolamento, caracterização e identificação de bactérias da cultura de tecidos de Camu-camu

As cepas bacterianas foram selecionadas da micropropagação de cada genótipo de camu-camu estudado, para isolamento e identificação. Foram isolados um total de 40 cepas bacterianas, sendo nomeados conforme a nomenclatura do genótipo e ordem de isolamento, tendo sido, por exemplo, o isolado 07A o primeiro isolado bacteriano do genótipo UAT07, e assim sucessivamente (Tabela 2).

Tabela 2. Caracterização do morfotipo das colônias bacterianas isoladas da cultura de tecidos de camu-camu

Isolado	Gênero	Cor	Brilho	Transparência	Consistência	Tamanho Colônia
07A	<i>Erwinia</i>	creme	brilhante	translúcida	viscosa	2-4mm
07B	<i>Micrococcus</i>	amarela	brilhante	opaca	seca	2-4mm
07C	<i>Enterobacter</i>	creme	brilhante	translúcida	viscosa	2-4mm
07D	Não Identificado	creme	fosco	opaca	seca	2-4mm
07E	<i>Microbacterium</i>	amarela	brilhante	translúcida	viscosa	2-4mm
07F	<i>Microbacterium</i>	amarela	brilhante	translúcida	viscosa	2-4mm
07G	<i>Bacillus</i>	creme	brilhante	opaca	viscosa	2-4mm
10A	<i>Bacillus</i>	branco leitoso	brilhante	opaca	viscosa	2-4mm
10B	Não Identificado	amarela	brilhante	translúcida	viscosa	2-4mm
10C	<i>Stenotrophomonas</i>	creme	brilhante	transparente	viscosa	>5mm
10D	Não Identificado	esbranquiçada	brilhante	transparente	viscosa	2-4mm
10E	Não Identificado	creme	fosco	translúcida	viscosa	2-4mm
10F	Não Identificado	creme	fosco	opaca	viscosa	≥5mm
15A	Não Identificado	branca	fosco	opaca	seca	≥5mm
15B	<i>Bacillus</i>	branca	fosca	opaca	seca	2-4mm
15C	Não Identificado	esbranquiçada	fosca	opaca	seca	2-4mm
15D	Não Identificado	esbranquiçada	fosca	translúcida	viscosa	2-4mm
15E	Não Identificado	creme	brilhante	transparente	viscosa	2-4mm
15F	Não Identificado	creme	brilhante	opaca	viscosa	≥5mm
17A	<i>Bacillus</i>	creme	fosca	translúcida	viscosa	≥5mm
17B	<i>Bacillus</i>	branca	brilhante	translúcida	viscosa	>5mm
17C	<i>Enterobacter</i>	creme	brilhante	translúcida	viscosa	2-4mm
17D	<i>Klebsiella</i>	branca	brilhante	translúcida	viscosa	2-4mm
18A	Não Identificado	rosa	brilhante	translúcida	viscosa	2-4mm
18B	<i>Bacillus</i>	branca	brilhante	opaca	seca	2-4mm
18C	<i>Klebsiella</i>	branca	brilhante	opaca	aquosa	2-4mm
18D	<i>Klebsiella</i>	branca	brilhante	opaca	aquosa	≥5mm
18E	Não Identificado	amarela	brilhante	translúcida	viscosa	2-4mm
18F	Não Identificado	creme	fosca	translúcida	viscosa	2-4mm
18G	<i>Klebsiella</i>	creme	brilhante	translúcida	viscosa	2-4mm
18H	<i>Bacillus</i>	branca	brilhante	opaca	viscosa	Média
18I	Não Identificado	amarela	brilhante	translúcida	viscosa	2-4mm

18J	<i>Brevundimonas</i>	creme	brilhante	translúcida	viscosa	2-4mm
18K	<i>Bacillus</i>	branca	brilhante	opaca	viscosa	≥5mm
18L	Não Identificado	amarela	brilhante	translúcida	viscosa	2-4mm
18M	<i>Bacillus</i>	branca	fosca	opaca	seca	2-4mm
18N	<i>Bacillus</i>	branca	fosca	opaca	aquosa	≥5mm
18O	<i>Methylobacterium</i>	rosa	brilhante	translúcida	viscosa	2-4mm
18P	Não Identificado	amarela	brilhante	transparente	viscosa	2-4mm
18Q	Não Identificado	amarela	fosca	translúcida	viscosa	2-4mm

O estudo permitiu observar a diversidade entre os isolados bacterianos, com variações entre coloração, forma, brilho, transparência, consistência das colônias, entre outros. É importante destacar que todos os isolados apresentaram crescimento classificado como “muito rápido”, com aparecimento das colônias com um dia de inoculação.

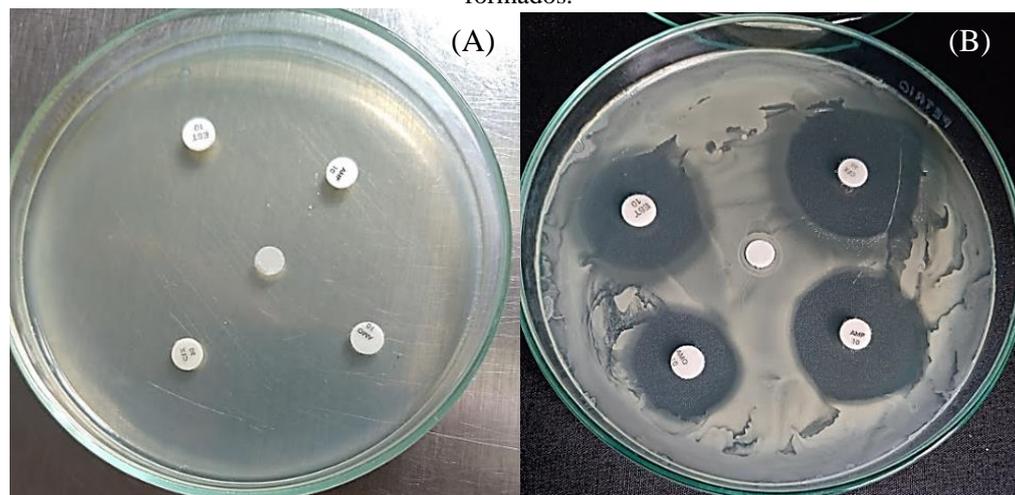
Para Cassels (2016), é essencial conhecer os contaminantes da cultura de tecidos, pois geralmente crescem muito rapidamente impedindo uma ação corretiva a tempo. O autor sugere que é possível recuperar os explantes contaminados transplantando-os para meios de cultura contendo antibióticos. É essencial isolar, identificar e testar a sensibilidade das bactérias isoladas a antibióticos pelos métodos de difusão em ágar e identificar a concentração mínima inibitória por microdiluição em série.

Neste estudo, o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA indicou semelhança com os gêneros *Erwinia*, *Micrococcus*, *Enterobacter*, *Microbacterium*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Stenotrophomonas*, *Brevundimonas* e *Methylobacterium*, que são apresentadas espécies amplamente citadas na literatura como promotoras de crescimento de plantas.

Uso de antibióticos no controle bacteriano *in vitro* pelo método de difusão em disco

Foi possível analisar a suscetibilidade dos microrganismos ao método de difusão em disco para oito antibióticos diferentes, os quais foram distribuídos na placa de Petri para avaliação do halo de inibição de crescimento formado em volta do disco de antibiótico (Figura 5).

Figura 5. Uso de antibióticos por difusão em disco sobre bactérias isoladas da cultura de tecidos de camu-camu. (A) Placa de Petri logo após a inoculação. (B) Placa de Petri após 24h da inoculação, com halos de inibição formados.



Na Tabela 3 foi possível observar que os antibióticos Cefalexina, Cefotaxima, Ceftriaxona e Rifampicina apresentaram formação média de maior halo, demonstrando melhor potencial de inibição *in vitro*. É importante destacar que os isolados 18M, 18P e 18Q foram resistentes a todos antibióticos testados, 18A foi suscetível a Ceftriaxona e Rifampicina, e 10E e 18G foram susceptíveis apenas a Rifampicina.

Tabela 3. Ação de antibióticos pelo método de difusão em disco em bactérias isoladas da micropropagação de camu-camu*

Isolado	Halo de Inibição (mm)								
	Estreptomicina (10µg mL ⁻¹)	Cefalexina (30µg mL ⁻¹)	Amoxicilina (10µg mL ⁻¹)	Ampicilina (10µg mL ⁻¹)	Vancomicina (30µg mL ⁻¹)	Cefotaxima (30µg mL ⁻¹)	Ceftriaxona (10µg mL ⁻¹)	Rifampicina (5µg mL ⁻¹)	
07A	28,07 ± 2,13	25,26 ± 0,65	20,69 ± 0,40	32,17 ± 3,10	11,28 ± 0,38	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	12,80 ± 0,22	
07B	0,00 ± 0,00	31,29 ± 2,08	22,33 ± 1,13	29,48 ± 1,84	24,60 ± 0,48	0,00 ± 0,00	11,09 ± 0,43	26,71 ± 1,19	
07C	17,24 ± 0,78	15,53 ± 0,04	0,00 ± 0,00	10,75 ± 0,10	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	12,85 ± 0,79	14,03 ± 0,40	
07D	32,57 ± 0,09	33,42 ± 1,77	8,29 ± 0,52	17,99 ± 0,39	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	13,12 ± 0,45	
07E	0,00 ± 0,00	10,09 ± 0,05	29,53 ± 1,29	22,12 ± 1,87	14,27 ± 0,63	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	14,49 ± 1,19	
07F	23,32 ± 1,85	24,34 ± 0,21	10,02 ± 0,76	24,80 ± 0,13	11,33 ± 0,62	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	13,51 ± 1,01	
07G	20,75 ± 0,51	29,36 ± 0,41	33,53 ± 0,40	35,11 ± 0,27	23,37 ± 0,43	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	15,01 ± 0,93	
10A	20,25 ± 1,23	26,95 ± 0,09	16,55 ± 0,88	24,81 ± 0,71	22,85 ± 0,59	12,39 ± 2,04	25,81 ± 1,25	21,77 ± 1,40	
10B	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	26,80 ± 0,89	10,23 ± 0,07	16,41 ± 0,70	25,43 ± 0,74	
10C	0,00 ± 0,00	17,31 ± 0,96	18,92 ± 0,38	12,27 ± 0,19	0,00 ± 0,00	29,53 ± 0,79	30,28 ± 1,02	9,62 ± 0,24	
10D	11,91 ± 0,12	19,73 ± 1,28	0,00 ± 0,00	8,94 ± 0,76	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	
10E	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	11,05 ± 1,30	
10F	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	27,48 ± 1,08	33,38 ± 0,80	10,55 ± 0,27	
15A	18,51 ± 0,84	25,29 ± 0,79	0,00 ± 0,15	9,45 ± 1,40	17,27 ± 0,64	10,31 ± 1,18	12,95 ± 1,44	14,92 ± 0,25	
15B	0,00 ± 0,00	33,46 ± 0,07	29,21 ± 1,55	30,47 ± 0,88	22,19 ± 0,74	16,15 ± 0,23	17,41 ± 0,44	19,59 ± 1,35	
15C	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	15,77 ± 0,53	18,39 ± 0,70	13,68 ± 0,36	
15D	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	50,54 ± 0,32	38,97 ± 0,22	15,86 ± 1,18	
15E	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	21,05 ± 1,18	22,33 ± 1,52	11,05 ± 0,46	
15F	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	19,40 ± 1,72	17,91 ± 0,85	13,50 ± 0,51	
17A	9,40 ± 1,72	30,39 ± 0,83	25,17 ± 1,23	32,23 ± 1,68	22,50 ± 1,07	0,00 ± 0,00	17,10 ± 0,19	25,18 ± 0,43	
17B	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	33,07 ± 1,40	33,34 ± 0,93	13,32 ± 1,35	
17C	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	35,77 ± 1,79	34,39 ± 4,42	12,62 ± 0,80	
17D	0,00 ± 0,00	11,92 ± 1,14	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	13,30 ± 0,32	0,00 ± 0,00	10,37 ± 1,09	12,81 ± 0,98	
18A	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	12,12 ± 0,64	14,01 ± 0,82	
18B	8,03 ± 0,23	24,10 ± 0,24	12,97 ± 3,08	20,11 ± 0,97	20,26 ± 0,99	15,18 ± 0,45	13,43 ± 1,60	19,52 ± 0,87	
18C	0,00 ± 0,00	11,58 ± 1,55	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	34,49 ± 1,63	33,61 ± 0,12	13,16 ± 0,19	
18D	15,54 ± 0,27	17,16 ± 0,87	18,27 ± 0,48	19,63 ± 0,85	0,00 ± 6,70	31,23 ± 1,46	34,17 ± 2,36	11,45 ± 1,28	
18E	15,61 ± 1,21	23,37 ± 0,51	18,09 ± 1,20	19,97 ± 2,84	0,00 ± 0,00	23,11 ± 0,54	22,99 ± 0,39	0,00 ± 0,00	
18F	30,77 ± 1,46	50,21 ± 0,42	19,92 ± 0,55	30,66 ± 1,09	12,15 ± 0,84	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	14,02 ± 0,67	
18G	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	11,04 ± 0,91	
18H	14,90 ± 0,86	27,14 ± 0,52	22,01 ± 1,74	20,14 ± 0,48	11,07 ± 1,58	33,34 ± 0,82	34,99 ± 0,34	11,74 ± 0,27	
18I	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	32,78 ± 1,59	33,08 ± 0,51	12,17 ± 1,11	

18J	19,79 ± 0,51	22,24 ± 0,50	21,58 ± 0,74	23,01 ± 1,49	0,00 ± 0,00	36,29 ± 2,72	33,46 ± 1,54	15,66 ± 0,50
18K	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	12,76 ± 0,75	37,46 ± 0,21	30,40 ± 11,12	12,54 ± 0,86
18L	17,12 ± 1,23	21,42 ± 4,48	22,86 ± 0,83	23,74 ± 1,42	0,00 ± 0,00	36,26 ± 0,42	34,94 ± 0,82	13,01 ± 0,81
18M	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
18N	15,52 ± 1,15	18,36 ± 1,19	18,46 ± 0,92	18,71 ± 0,63	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
18O	22,52 ± 0,93	29,75 ± 0,18	13,13 ± 2,28	11,18 ± 1,59	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
18P	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
18Q	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Média	8,55	14,49	9,54	11,94	6,65	14,05	15,90	12,22
CV (%)	8,76	6,81	9,00	8,55	17,27	6,50	12,87	6,37

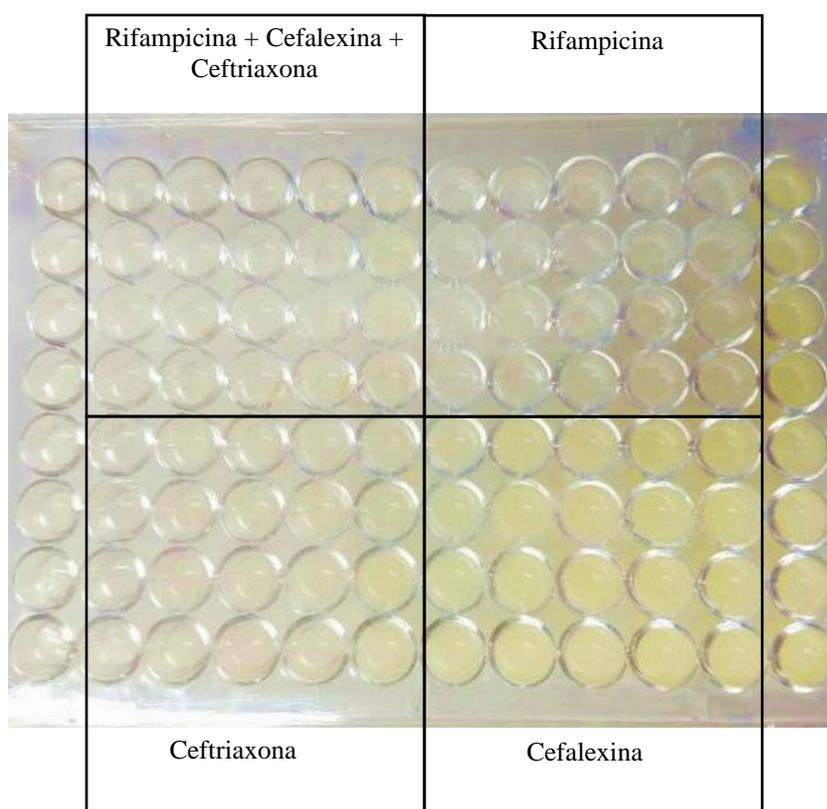
*Cada valor representa a média de três repetições e os desvios padrão da média.

Essa variação no comportamento dos isolados sob os antibióticos permite compreender porque muitas vezes há insucessos na inserção de antibióticos ao meio de cultura, e considerar que a combinação dos antibióticos com melhor potencial no controle de contaminantes pode favorecer o controle *in vitro* durante a micropropagação, considerando a diversidade de bactérias na cultura de tecidos do camu-camu (REED; TANPRASERT, 1995; OLIVEIRA et al., 2009).

Uso de antibióticos no controle bacteriano in vitro pelo método de microdiluição em caldo

Após o emprego do método de difusão em disco, foram selecionados os antibióticos com melhor resposta na primeira etapa do estudo, que foram Rifampicina, Ceftriaxona e Cefalexina, para serem testados isoladamente e combinados, em diluição seriada de 200 mg L⁻¹ a 12,5 mg L⁻¹. O antibiótico Cefotaxima, apesar de ter apresentado excelentes resultados, não foi selecionado para esta etapa devido ser de uso exclusivamente hospitalar. Na Figura 6 foi possível observar a influência da diluição sob a densidade bacteriana nas concentrações de cada antibiótico utilizado.

Figura 6. Avaliação da concentração mínima inibitória de antibióticos pelo microdiluição em caldo em bactérias isoladas da cultura de tecidos de camu-camu.



Na Tabela 4 notou-se a diferença entre as médias, os quais foram significativos pelo teste de Tukey, ao nível de 5% ($p < 0,05$). O estudo sugere que a Ceftriaxona teve melhor eficiência no controle de microrganismos, e a combinação de Ceftriaxona, Cefalexina e Rifampicina potencializou o controle bacteriano.

Tabela 4. Avaliação da densidade microbiana (nm) sob diferentes antibióticos pelo método de microdiluição em caldo*

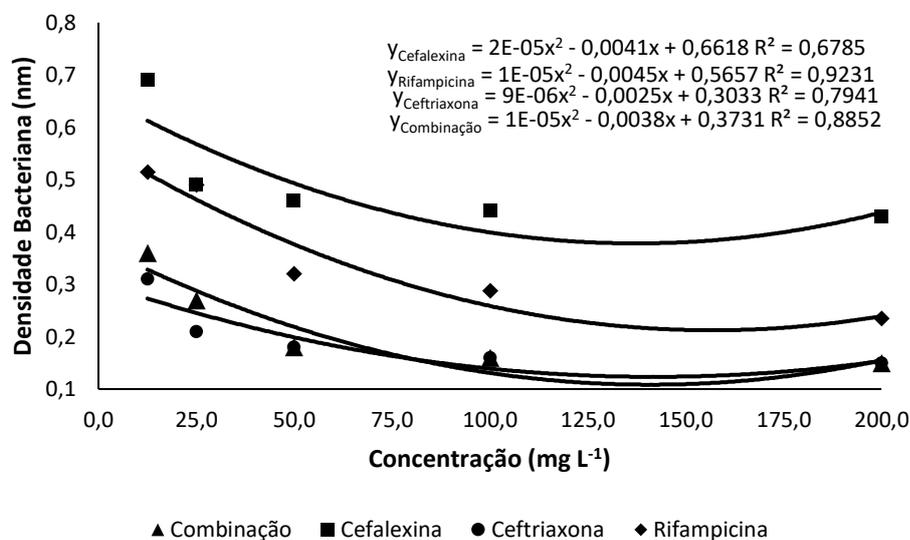
Concentração (mg L ⁻¹)	Densidade Bacteriana (nm)			
	Combinação**	Rifampicina	Ceftriaxona	Cefalexina
0,0	1,36a	1,78a	1,36a	1,77a
12,5	0,36b	0,52b	0,31b	0,69b
25,0	0,28b	0,48b	0,21bc	0,49b
50,0	0,18c	0,32bc	0,18c	0,46b
100,0	0,16c	0,29c	0,17c	0,43b
200,0	0,15c	0,24c	0,16c	0,43b
CV	50,100	40,56	57,37	38,77
Média Geral	0,41	0,60	0,40	0,71

*Cada valor representa a média de quatro repetições. **Combinação: corresponde à combinação dos Antibióticos Rifampicina, Ceftriaxona e Cefalexina.

Na Figura 7 é possível observar a densidade bacteriana em cada concentração a partir da absorbância (nm), sendo notório que Cefalexina isolada resultou ser menos satisfatória, apesar de, no teste de difusão, ter sido promissora. Os demais tratamentos apresentaram um

comportamento similar, em que à medida que aumentou a concentração dos antibióticos, menor foi a densidade bacteriana observada. A combinação dos três antibióticos mostra similaridade com o resultado obtido para o antibiótico Ceftriaxona.

Figura 3. Análise da Concentração Mínima Inibitória em isolados bacterianos de cultura de tecidos de camu-camu.



A análise permitiu observar como tratamentos mais satisfatórios, o antibiótico Ceftriaxona e a combinação de Cefalexina+Ceftriaxona+Rifampicina, com melhor controle bacteriano em cerca de 145 mg.L^{-1} , conforme avaliação da derivação quadrática da regressão. A combinação de antibióticos já é amplamente empregada e foi relatada por Reed e Tanprasert (1995), como vantajosas devido a uma ação sinérgica sobre os isolados bacterianos presentes.

É perceptível que a combinação de antibióticos favoreceu o controle dos microrganismos presentes. O estudo de Oliveira et al. (2009) também observou a variação na resposta entre diferentes bactérias quanto à sensibilidade a cada antibiótico e a resposta de cada uma delas a diferentes antibióticos.

CONCLUSÕES

Houve elevada contaminação bacteriana na cultura de tecidos de camu-camu.

Os antibióticos cefalexina, ceftriaxona, cefotaxima e rifampicina apresentaram os melhores resultados no teste de difusão em disco, com formação de maior halo de inibição. Houve isolados bacterianos que não tiveram seu crescimento inibido por nenhum dos antibióticos utilizados por esse método.

Nas concentrações diluídas, pelo teste de microdiluição, a cefalexina isolada apresentou menor inibição do crescimento bacteriano. Foi realizada a combinação de antibióticos com

melhor potencial independente pelo teste de difusão, e a combinação de cefalexina com ceftriaxona e rifampicina resultou no melhor controle das cepas bacterianas, similar ao resultado com o emprego de ceftriaxona isolada.

O estudo identificou que tratamentos com diferentes antibióticos combinados permite ampliar a inibição de diferentes microrganismos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, M. da C. R.; CASTRO, A. M.; CHAGAS, E. A.; SILVA, M. L. da; FLORES, P. S.; SILVA, S. da. Desinfestação e estabelecimento *in vitro* de segmentos caulinares de camu-camuzeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 22, 2012, Bento Gonçalves. Anais. 13692 SP.
- ARAÚJO, M. C. R.; VENDRAME, W. A.; CHAGAS, E. A.; RIBEIRO, M. I. G.; VILACA, R. Preliminary Studies On *In vitro* Propagation of Camu-Camu (*Myrciaria dúbia*), an Important Medicinal Plant. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**. 128:52-54. 2015.
- ARAÚJO, M. C. R.; CHAGAS, E. A.; RIBEIRO, M. I. G.; PINTO, S. T. S.; CHAGAS, P. C.; VENDRAME, W.; MOTA FILHO, A. B.; SOUZA, O. M. Micropropagation of caçari under different nutritive culture media, antioxidants, and levels of agar and pH. **African Journal of Biotechnology**. Vol. 15(33), pp. 1771-1780, 17 August, 2016. DOI: 10.5897/AJB2016.15417.
- ARAÚJO, M. C. R.; Callus induction and pro-embryogenic mass formation in *Myrciaria dubia*, an important medicinal and nutritional plant. **Crop Breeding and Applied Biotechnology (Online)**, v., p., 2021.
- ALMEIDA, L. F. P.; YUYAMA, K.; CHAGAS, E. A.; LOZANO, R. M. B.; ALBUQUERQUE, T. C. S.; RODRIGUEZ, C. A.; QUEIROZ, F. B. Early Evaluation of Camu-Camu Subsamples in Transition Savanna/Forest Area. **Journal of Agricultural Science**, v. 6, p. 178-186, 2014.
- BASHAN, Y.; KAMNEV, A. A.; DE-BASHAN, L. E. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. **Biology and Fertility of Soils** (2013) 49:465–479. DOI 10.1007/s00374-012-0737-7.
- BRAZ, R. R.; NAHAS, E. Synergistic action of both *Aspergillus niger* and *Burkholderia cepacea* in co-culture increases phosphate solubilization in growth medium. **Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Letters**, Volume 332, Issue 1, July 2012, Pages 84–90. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2012.02580.x.
- BRUNTON, L. L. et al. (eds.). Goodman & Gilman: manual de farmacologia e terapêutica. Tradução: Carla Vorratz, Carlos H. Cosendey, Ademar V. Fonseca, Geraldo Serra, Marco Valejo, Maria E. Moreira, Patrícia Lydie e Sérgio Setúbal. Porto Alegre: ANGH, 2010.
- CATTELAN, A. J. Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal. Londrina: Embrapa Soja, 1999. 36p. ISSN: 1516-781X.
- CHAGAS, E. A.; CARVALHO, A. S. C.; BACELAR-LIMA, C. G.; DUARTE, O. R.; NEVES, L. C.; ALBUQUERQUE, T. C. S. Ocorrência e distribuição geográfica de populações nativas de camu-camu no estado de Roraima. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA, 2012, 22, Bento Gonçalves, Anais... Bento Gonçalves, RS: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 22. 2012.

- CHAGAS, E. A.; FLORES, P. S.; CHAGAS, P. C.; COUCEIRO, M. A.; PASQUAL, M.; PIO, R.; ARAÚJO, M. C. R.; SILVA, M. L. Frutas nativas da Amazônia. In Pasqual, M. Chagas, E. A. Cultura de tecidos em espécies frutíferas. Boa Vista: Editora da UFRR, 2014. 280 p.
- CHAGAS, E. A.; LOZANO, R. M. B.; CHAGAS, P. C.; LIMA, C. G. B.; GARCIA, M. I. R.; OLIVEIRA, J. V.; SOUZA, O. M.; MORAIS, B. S.; ARAUJO, M. C. R. Intraspecific variability of camu-camu fruit in native populations of northern Amazonia. **Crop Breeding and Applied Biotechnology (Online)**, v.15, p.265 - 271, 2015.
- CHALITA, P. B.; FARIAS, E.; DO N. C.; COSTA, I. B. DA; SOUSA, B. F.; SANTOS, M. A. O.; ALBUQUERQUE, T. C. S.; VITAL, M. J. S.; SILVA, K. Characterization of bacterial endophytes from the roots of native and cultivated Brazil nut trees (*Bertholletia excelsa*). **Acta Amazonica** v. 49, n.4, p. 257 – 267, 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/1809-4392201804831>.
- CID, L. P. B. Cultivo *in vitro* de plantas. 3ª ed.amp. – Brasília, DF: Embrapa, 2014. 325 p. Dias et al (2014)
- CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. p.17-51. in Cid, L. P. B. Cultivo *in vitro* de plantas. 3ª ed. ampl. - Brasília, DF: Embrapa, 2014. 325p.
- COSTA, F. E. C.; MELO, I. S. ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS À PALMA E PROSPECÇÃO DO POTENCIAL DE SOLUBILIZAR FOSFATO E FIXAR NITROGÊNIO. **Agrotrópica** 17: 23 - 26. 2005. Centro de Pesquisas do Cacau, Ilhéus, Bahia, Brasil.
- COSTA, M. G. C.; SHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; OTONI, W. C. Importância das contaminações e dos microrganismos endêmicos na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. In SHERWINSKI-PEREIRA, J.E. contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. 446p.
- DIAS; A. C. F.; COSTA, F. E. C.; ANDREOTE, F. D.; LACAVA, P. T.; TEIXEIRA, M. A.; ASSUMPCÃO, L. C.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; MELO, I. S. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** (2009) 25:189–195. DOI 10.1007/s11274-008-9878-0
- EMBRAPA RORAIMA. Procedimento Operacional Padrão Técnico para Caracterização de Culturas Bacterianas. Protocolo 005.POP.005.LMS, Embrapa Roraima 2005.
- ESPOSITO-POLESI, N. P. Microrganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 9, n. 4, p. 533-541, out./dez. 2011.
- 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** (2017) 74:103–113 DOI 10.1007/s00284-016-1163-0.
- ESPOSITO-POLESI, N. P. Artigo de Revisão / Review Paper Contaminação versus manifestação endofítica: implicações no cultivo *in vitro* de plantas. **Rodriguésia** 71: e00562018. 2020. DOI: 10.1590/2175-7860202071072.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: A Computer Statistical Analysis System. **Ciência e Agrotecnologia, Lavras**, V.35, n.6, p.1039-1042, 2014.
- GRIGIO, M. L.; MOURA, E. A.; CHAGAS, E. A.; DURIGAN, M. F. B.; CHAGAS, P. C.; CARVALHO, G. F.; ZANCHETTA, J. J. Bioactive compounds in and antioxidant activity of camu-camu fruits harvested at different maturation stages during postharvest storage. **Acta Scientiarum. Agronomy**, vol. 43, e50997, 2021. 10.4025/actasciagron.v43i1.50997.

- JONES, D. L. Organic acids in the rhizosphere: a critical review. *Plant and Soil*. **The Hague**, v.205, p.25-44, 1998.
- Johnston, H. W. The solubilization of phosphate. I, The action of various organic compounds on dicalcium and tricalcium phosphates. **Reprinted from the Zealand Journal of Science and Technology**, Section B, Vol. 33, N°. 6, May, 1952.
- KIDUS, T.; TEKA, Z. Isolation, Characterization and Identification of Contaminant Bacteria from Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) *in vitro* Culture in Tigray Biotechnology Center, Mekelle, Ethiopia. **Journal of Bacteriology and Parasitology**, Vol.11 Iss.3 No: 1000372. 2020.
- KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M. L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético *in vitro* por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 42 (10), Out 2007. DOI: [10.1590/S0100-204X2007001000013](https://doi.org/10.1590/S0100-204X2007001000013).
- LEIFERT, C.; CASSELLS, A. C. 2001. Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. **In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, 37: 133–138.
- Ferraz Leone, G., Avelino, P., Andrade, M., Vieira De Almeida, C., Vieira De Almeida, C., Dini Andreote, F., & Marcílio De Almeida, &. (n.d.). *Use of antibiotics to control endophytic bacterial growth migration onto culture medium in Eucalyptus cloeziana F.Muell.: a micropropagation approach*. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-09986-2>
- LOYOLA-VARGAS, V. M.; OCHOA-ALEJO, N. **Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology**, vol. 1815, © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature, 2018. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4>.
- MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; LEE, H. S.; HARI, K.; SUNDARAM, S. P.; SA, T. M. Pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria accelerate germination, growth and yield of sugarcane clone Co86032 (*Saccharum officinarum* L.). **Biology and Fertility of Soils** (2005) 41: 350–358. DOI: 10.1007/s00374-005-0838-7.
- MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. IMPORTÂNCIA DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO E DE BIOCONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS PARA UMA AGRICULTURA SUSTENTÁVEL. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica*, Recife, vol. 1, p.89-111, 2004.
- MARRA, L. M. SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS POR BACTÉRIAS E SUA CONTRIBUIÇÃO NO CRESCIMENTO DE LEGUMINOSAS E GRAMÍNEAS. (Tese de Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras (UFLA). Lavras/MG. 2012. 142p.
- MELO, V. F.; SILVA, D. T.; EVALD, A.; ROCHA, P. R. R. Qualidade química e biológica do solo em diferentes sistemas de uso em ambiente de savana. **Revista Agro@mbiente Online**, v. 11, n. 2, p. 101-110, abril-junho, 2017
- MIRANDA, I. S.; ABSY, M. L. FISIONOMIA DAS SAVANAS DE RORAIMA, BRASIL. **Acta Amazônica**, 30 (3): 423-440. 2000.
- NASCIMENTO, O. V.; SILVA, E. L. CAMU-CAMU (*Myrciaria dubia* (HBK) McVaugh), a small Amazonian fruit rich in vitamin C and a supplement for immunity. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. e27810615877, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i6.15877.
- OLIVEIRA, H. S.; LEMOS, O. F.; MIRANDA, V.S.; MOURA, H.C.P.; CAMPELO, M.F.; SANTOS, L.R.R. Estabelecimento e multiplicação *in vitro* de brotos no processo de micropropagação de cultivares de bananeira (*Musa* spp.). **Acta Amazônica**. vol. 41(3) 2011: 369 – 376
- QUAMBUSCHET, M.; PIRTTILÄ, 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**, Volume 34, 524–533, 2014. DOI:10.1093/treephys/tpu027.
- QUAMBUSCHET, M.; WINKELMANN, T. Bacterial Endophytes in Plant Tissue Culture: Mode of Action, Detection, and Control. In LOYOLA-VARGAS, V.M.; OCHOA-ALEJO, N. **Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology**, vol. 1815. ©Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature, 2018. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4>.
- QIN, S.; ZHANG, Y.; YUAN, B.; XU, P.; XING, K.; WANG, J.; JIANG, J. Isolation of ACC deaminase-producing habitat-adapted symbiotic bacteria associated with halophyte *Limonium sinense* (Girard) Kuntze and evaluating their plant growth-promoting activity under salt stress. **Plant Soil** (2014) 374:753–766. DOI 10.1007/s11104-013-1918-3.
- RYAN, R. P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D. J.; DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Letters**, 278 (2008) 1–9.
- RODRIGUES, E. P.; OLIVEIRA, A. L. M.; VIDAL, M. S.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; BALDANI, J.I. Obtenção e Seleção de Mutantes Tn5 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Pal 5) com Alterações na Produção de Auxinas. **Seropédia: Embrapa Agrobiologia**, 2007. 20p.
- SARWAR, M.; KREMER, R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, 1995, 20, 282-285.
- SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; COSTA, F. H. S. Estratégias de seleção e uso de substâncias químicas microbianas para o controle de contaminantes da cultura de tecidos de plantas. In SCHERWINSKI-PEREIRA, J.E. Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. 446p.
- SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Contaminações microbianas na cultura de células, tecidos e órgãos de plantas. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010. 446p.
- MOREIRA, A. L. L.; ARAÚJO, F. F. BIOPROSPECÇÃO DE ISOLADOS DE *Bacillus* spp. COMO POTENCIAIS PROMOTORES DE CRESCIMENTO DE *Eucalyptus urograndis*. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.37, n.5, p.933-943, 2013.
- RANG, H.P., DALE, M.N. *Farmacologia*. 6th ed., Rio de Janeiro, Elsevier; 2008.5.
- SILVA, A. V. S.; VILENA, J. O.; CHAGAS, E. A.; ARAÚJO, M. C. R.; GRIGIO, M. L.; GARCIA, M. I. R. Desempenho adaptativo de clones de caçari (*Myrciaria dubia*) em condições de terra firme no Estado de Roraima. Anais do XXX CBA Congresso Brasileiro de Agronomia. 12 a 15/Setembro/2017, Fortaleza-CE.
- SILVA, F. C. Manual de Análises Químicas de Solos, Plantas e Fertilizantes. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999. 370p.
- SILVA, P. *Farmacologia*. 7th ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.
- SILVA, M. L. da. Desinfestação e estabelecimento de sementes de *Myrciaria dubia* (H. B. K.) McVaugh germinadas *in vitro*. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Roraima. Boa Vista, 2012. 55 p.
- SILVA, M. L.; YUYAMA, K. Propagação vegetativa de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) McVaugh) utilizando estacas de diâmetro diferentes submetidas a diferentes concentrações de ácido naftaleno acético – ANA. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 51, 2000, Brasília, DF. Resumos. Manaus: SBB, 2000. p. 88.
- SUGUINO, E.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; ARAÚJO, P. S. R.; SIMÃO, S. Propagação vegetativa de camu-camu por meio de enxertia intergenérica na família Myrtaceae. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 12, p. 1477-1482, dez. 2003.
- VAZQUEZ, P.; HOLGUIN, G.; PUENTE, M. E.; LOPEZ-CORTES, A.; BASHAN, Y. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in

- a semiárid coastal lagoon. **Biology and Fertility of Soils** (2000) 30:460–468
<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s003740050024.pdf>
- TEIXEIRA, M. A.; MELO, I. S.; VIEIRA, R. F.; COSTA, F. E. C.; HARAKAVA, R. MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS DE MANDIOCA DE ÁREAS COMERCIAIS E ETNOVARIEDADES EM TRÊS ESTADOS BRASILEIROS. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.1, p.43-49, jan. 2007.
- THOMAS, P.; KUMARI, S.; SWARNA, G.K.; GOWDA, T.K.S. Papaya shoot tip associated endophytic bacteria isolated from *in vitro* cultures and host-endophyte interaction *in vitro* and *in vivo*. **Canadian Journal of Microbiology**. Vol. 53, 2007.
- VILENA, J. O.; TAVEIRA, D.L.L.; CHAGAS, P.C.; CHAGAS, E.A.; ARAÚJO, M.C.R.; GARCIA, M.I.R. ADAPTAÇÃO DE CLONES DE CAÇARI NAS CONDIÇÕES DE FLORESTA DE TRANSIÇÃO DO ESTADO DE RORAIMA. Anais do II Simpósio de Propagação de Plantas e Produção de Mudas. 29 a 31/outubro/2018. Águas de Lindóia, SP.
- YAN, X.; WANG, Z.; MEI, Y.; WANG, L.; WANG, X.; XU, Q.; PENG, S.; ZHOU, Y.; WEI, C. Isolation, Diversity, and Growth-Promoting Activities of Endophytic Bacteria From Tea Cultivars of Zijuan and Yunkang-10. **Frontiers in Microbiology**, 21 August 2018. DOI: 10.3389/fmicd.2018.01848.
- YABLONSKAYA, M. I.; GINS, M. S.; MOLCHANOVA, M. A. *In vitro* Plants biotization. **RUDN Bulletin, Agronomy and Livestock series**, n 1 (2016), p.15-20. DOI: 10.22363/2312-797X-2016-1-15-20.
- YUTAMA, K.; AGUIAR, J. P. L.; YUYAMA, L. K. O. Camu-camu: um fruto fantástico como fonte de vitamina C. **Acta Amazônica**, 32 (1) Mar 2002. DOI: 10.1590/1809-43922002321174.
- YUYAMA, K.; MENDES, N. B.; VALENTE, J. P. Longevidade de sementes de camu-camu submetidas a diferentes ambientes e formas de conservação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 2, p. 601-607, 2011.
- CASSELS, ALAN C. Detection and Elimination of Microbial Endophytes and Prevention of Contamination in Plant Tissue Culture. In Trigiano, R. N., & Gray, D. J. (2016). *Plant tissue culture, development and biotechnology* (1st ed., Vol. 1). CRC Press, 608p.
- TOLEDO, C.P. Identificação e controle de microrganismos contaminantes no processo de micropropagação de cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, 2011. 71 p. : il.
- RODOLPHI, M.S. Efeitos da nandrolona e da ceftriaxona na homeostasia glutamatérgica: uma busca por mecanismos interativos entre neurônios e astrócitos envolvidos no comportamento agressivo. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Porto Alegre, 2017. 65 p. : il.
- TRIGIANO, R. N., & GRAY, D. J. (2016). *Plant tissue culture, development and biotechnology* (1st ed., Vol. 1). CRC Press, 608p.

CONCLUSÃO

Considerando os resultados encontrados neste estudo, este trabalho identificou bactérias promotoras do crescimento de plantas isoladas da cultura de tecidos de camu-camu, o que poderá favorecer, no futuro, o desenvolvimento de biofertilizantes visando a redução dos fertilizantes químicos utilizados na agricultura moderna.

A pesquisa também analisou a concentração mínima inibitória de óleos essenciais e de antibióticos, no controle de contaminantes da cultura de tecidos de camu-camu. Os óleos essenciais de orégano e melaleuca apresentaram os melhores resultados nas concentrações analisadas. No estudo com antibióticos, a ceftriaxona apresentou melhor controle bacteriano *in vitro* e o tratamento com diferentes antibióticos combinados permitiu ampliar a inibição dos diferentes microrganismos.

ANEXO



RBF - Revista Brasileira de Fruticultura
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n
CEP 14884-900 – Jaboticabal/SP
Tel: (16) 3209-7609/7188
rbfruti@gmail.com e <https://fruticultura.org>

Jaboticabal, 31 de março de 2023.

DECLARAÇÃO ARTIGO APROVADO

Declaramos para os devidos fins que o trabalho
**“ESSENTIAL OILS FROM CONDIMENT AND
MEDICINAL PLANTS IN THE CONTROL OF
CONTAMINANTS FROM THE MICROPROPAGATION
OF *Myrciaria dubia*”**, protocolo nº **099/22** dos autores: Hosana
Carolina dos Santos Barreto, Edvan Alves Chagas, Antônio Alves
de Melo Filho, Bilovenie Etienne, Deila Cristina Vieira da Silva,
Maria da Conceição da Rocha Araújo, será publicado como
ARTIGO na REVISTA BRASILEIRA DE FRUTICULTURA.

Atenciosamente,

PROF.DR.ALEXANDRE PIO VIANA
Editor Chefe