

## **Isolamento e identificação de microorganismos promotores de crescimento e inoculação em mudas de bananeira *in vitro***

Isolation and identification of microorganisms that promote growth and inoculation with banana seedlings *in vitro*

Aislamiento e identificación de microorganismos que promueven el crecimiento e inoculación con plántulas de banano *in vitro*

Recebido: 18/01/2021 | Revisado: 20/01/2021 | Aceito: 23/01/2021 | Publicado: 30/01/2021

### **Maysa Mathias Alves Pereira**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8343-0038>  
Universidade Federal de Lavras, Brasil  
E-mail: [agro.maysa@gmail.com](mailto:agro.maysa@gmail.com)

### **Ronilson Carlos Araújo**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0663-6184>  
Universidade Federal de Lavras, Brasil  
E-mail: [ronilson.araujo@estudante.ufla.br](mailto:ronilson.araujo@estudante.ufla.br)

### **Adalvan Daniel Martins**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1821-8185>  
Cornell University, United States  
E-mail: [adm285@cornell.edu](mailto:adm285@cornell.edu)

### **Filipe Almendagna Rodrigues**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2433-4374>  
Universidade Federal de Lavras, Brasil  
E-mail: [filipealmendagna@yahoo.com.br](mailto:filipealmendagna@yahoo.com.br)

### **Moacir Pasqual**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5612-9186>  
Universidade Federal de Lavras, Brasil  
E-mail: [mpasqual@ufla.br](mailto:mpasqual@ufla.br)

### **Joyce Dória**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7727-5016>  
Universidade Federal de Lavras, Brasil  
E-mail: [joyce.doria@ufla.br](mailto:joyce.doria@ufla.br)

### **Resumo**

A inoculação de bactérias promotoras de crescimento, já mostrou benefícios em diferentes culturas como o aumento da produção de biomassa para o crescimento das raízes e caules, maior resistência às condições de estresse hídrico e mudanças em suas propriedades fisiológicas. Bactérias promotoras de crescimento vegetal têm se destacado por seu potencial de aplicação na produção vegetal, permitindo a redução do uso de fertilizantes e pesticidas, o que se deve à capacidade de estimular o crescimento das plantas por via biológica por fixação de nitrogênio e produção de fitohormônios, como ácido indol-3-acético (IAA). O objetivo deste trabalho foi verificar o potencial de promoção do crescimento vegetal de 25 bactérias silvestres da Coleção de Culturas de Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Lavras (CCMA-UFLA) por meio da avaliação da capacidade de fixação biológica de nitrogênio e produção de IAA; selecionar bactérias promotoras de crescimento, além de avaliar o efeito de 3 isolados em mudas de *Musa sp.* cultivadas *in vitro*. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (CRD), contendo 3 tratamentos, mais o controle, com 30 explantes por tratamento. A bactéria CCMA0056 ocasionou a morte de todas as mudas *in vitro*. O crescimento das bananeiras é reduzido quando inoculado com as bactérias *Azospirillum brasilense* e *Enterobacter cloacae*.

**Palavras chave:** Bananeira; Microorganismos; Cultivo *in vitro*.

### **Abstract**

The inoculation of growth-promoting bacteria has already shown benefits in different cultures such as increased biomass production for the growth of roots and stems, greater resistance to water stress conditions and changes in their physiological properties. Plant growth promoting bacteria have stood out for their potential application in plant production, allowing the reduction of the use of fertilizers and pesticides, which is due to the ability to stimulate the growth of plants by biological means by nitrogen fixation and production of phytohormones, such as indole-3-acetic acid (IAA). The aim of this study was to verify the potential for promoting plant growth of 25 wild bacteria from the

Agricultural Microbiology Culture Collection at the Federal University of Lavras (CCMA-UFLA) by assessing the capacity for biological nitrogen fixation and IAA production; select growth-promoting bacteria, in addition to evaluating the effect of 3 isolates on seedlings of *Musa* sp. grown *in vitro*. The experiment was conducted in a completely randomized design (CRD), containing 3 treatments, plus the control, with 30 explants per treatment. The bacterium CCMA0056 caused the death of all seedlings *in vitro*. Banana growth is reduced when inoculated with the bacteria *Azospirillum brasilense* and *Enterobacter cloacae*.

**Keywords:** Banana; Microorganisms; *In vitro* cultivation.

### Resumen

La inoculación de bacterias promotoras del crecimiento ya ha mostrado beneficios en diferentes cultivos como una mayor producción de biomasa para el crecimiento de raíces y tallos, mayor resistencia a las condiciones de estrés hídrico y cambios en sus propiedades fisiológicas. Las bacterias que promueven el crecimiento de las plantas se han destacado por su potencial aplicación en la producción vegetal, permitiendo la reducción del uso de fertilizantes y pesticidas, lo que se debe a la capacidad de estimular el crecimiento de las plantas por medios biológicos mediante la fijación de nitrógeno y producción de fitohormonas, como el ácido indol-3-acético (IAA). El objetivo de este estudio fue verificar el potencial para promover el crecimiento vegetal de 25 bacterias silvestres de la Colección de Cultivos de Microbiología Agrícola de la Universidad Federal de Lavras (CCMA-UFLA) mediante la evaluación de la capacidad de fijación biológica de nitrógeno y producción de IAA; seleccionar bacterias promotoras del crecimiento, además de evaluar el efecto de 3 aislados sobre plántulas de *Musa* ssp. cultivado *in vitro*. El experimento se realizó en un diseño completamente aleatorizado (CRD), conteniendo 3 tratamientos, más el control, con 30 explantes por tratamiento. La bacteria CCMA0056 provocó la muerte de todas las plántulas *in vitro*. El crecimiento del banano se reduce cuando se inocula con las bacterias *Azospirillum brasilense* y *Enterobacter cloacae*.

**Palabras clave:** Plátano; Microorganismos; Cultivo *in vitro*.

## 1. Introdução

A produção de banana (*Musa* spp.) é um dos principais produtos ligados ao agronegócio mundial, sendo a fruta *in natura* mais consumida. Tem grande valor econômico para o Brasil, destacando como a segunda fruta mais importante em área colhida, quantidade produzida, valor da produção e consumo (Oliveira, 2010).

Em alternativa aos métodos de propagação vegetativa tradicionais, para bananeiras, utiliza-se a técnica de cultivo *in vitro*, a partir de explantes contendo tecidos meristemáticos de matrizes selecionadas, de forma asséptica e sob condições controladas. A técnica possibilita a obtenção de material propagativo com alto padrão genético e fitossanitário, em grande quantidade e em tempo reduzido (Silva Neto, 2001).

Porém, a ausência de uma microbiota diversificada associada à rizosfera das plantas formadas *in vitro* pode reduzir o crescimento, o vigor e aumentar a mortalidade das mudas no campo. Essas plantas crescem em ambiente asséptico com baixa intensidade luminosa, alta umidade relativa e elevados níveis de nutrientes em comparação com as condições *ex vitro*. Essas condições podem produzir alterações como a redução da cera epicuticular foliar, estômatos não funcionais e causar hiperhidricidade que pode ser detectada por estudos anatômicos. A detecção precoce dessas alterações, permite a modificação nas estratégias de cultivo *in vitro* para reverter essas alterações (Jausoro et al., 2010). Tais modificações envolvem mudanças na formulação de meio de cultivo e condições ambientais, bem como o uso de tecnologias alternativas, como a inoculação com bactérias benéficas (Vettori et al., 2010).

Os microrganismos são capazes de conferir certas características às plantas, como maior resistência às condições de estresse hídrico; alterar suas propriedades fisiológicas; produz hormônios vegetais e outros compostos de metabolismo secundário (Pereira et al., 2019; Souza et al., 2015). Por outro lado, os organismos endofíticos encontram na planta um habitat com nutrientes e menos concorrência com outros microrganismos (Peixoto Neto et al., 2004).

Numerosas espécies de bactérias, principalmente associadas à rizosfera, demonstraram capacidade para aumentar o crescimento das plantas; Estes são denominados rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPR) (Loepper et al., 1978). Em várias culturas, a aplicação de PGPR em estágios precoces do desenvolvimento tem aumentado a produção de biomassa para o crescimento das raízes e caules (Kloepper et al., 2004). Maior resistência às condições de estresse hídrico; alterar

suas propriedades fisiológicas; produz hormônios vegetais e outros compostos de metabolismo secundário (Souza et al., 2015). Em viveiros de espécies florestais, o PGPR permitiu aumentar a sobrevivência das plantas após o transplante, o que tem sido associado a um melhor desenvolvimento radicular e, conseqüentemente, ao aumento da captação de nutrientes (Pueente et al., 2009).

O objetivo deste trabalho foi selecionar bactérias promotoras de crescimento, além de avaliar o efeito destas em mudas de *Musa sp.* cultivadas *in vitro* com inoculação de diferentes gêneros de bactérias.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Estirpes utilizadas

As estirpes bacterianas utilizadas foram cedidas pela Coleção de Cultura da Microbiologia Agrícola (CCMA/UFLA) do Laboratório de Microbiologia das Fermentações, do Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, Minas Gerais. Para os primeiros testes, foram escolhidas bactérias conforme gêneros e espécies descritas na literatura como bactérias promotoras de crescimento vegetal. Foram selecionadas 25 bactérias, para padronização (Tabela 1).

As estirpes mantidas a - 80 °C foram reativadas em meio líquido caldo nutriente (3 g L<sup>-1</sup> de extrato de carne; 5 g L<sup>-1</sup> de peptona) e incubadas em BOD a 30 C, por 48 horas e em meio líquido 79 ou YMA sem adição de azul de bromotimol para o cultivo da bactéria *Azospirillum brasilense* (10 g L<sup>-1</sup> de manitol ou sacarose; 1 mL de solução K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (10%); 4 mL de solução KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (10%); 2 mL de solução MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O (10%); 1 mL de solução NaCl (10%); 0,4 g L<sup>-1</sup> de extrato de Levedura; pH 6; 8 7; 0) e incubadas em BOD a 30 C, por 48 horas.

### 2.2 Fixação biológica de nitrogênio

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições. As estirpes listadas na Tabela 1 foram testadas quando a capacidade de fixar nitrogênio N<sup>2</sup> atmosférico. Foram utilizados dois meios de cultura NFb semissólido, cuja formulação apresenta 5 g L<sup>-1</sup> de ácido málico; 0,5 g L<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2 g L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,1 g L<sup>-1</sup> de NaCl; 0,02 g L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 1 mL de solução de vitaminas (10 mg de biotina; 20 mg de piridoxol HCl em 100 mL de solução); 2 ml de solução de micronutrientes (0,2 g de Ca<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,235 g de MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O; 0,28 g de H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0,008 g de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O; 0,024 g ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O em 200 mL de solução); 4 mL de solução de FeEDTA (solução 1,64%), 2 mL de azul de bromotimol (solução a 0,5% em 0,2 N de KOH); 4,5 g L<sup>-1</sup> de KOH; o pH foi ajustado para 6,8 (Doberreiner; Baldani; Baldani, 1995) e adicionado 1,75 a 1,8 g L<sup>-1</sup> de agar (variável, de acordo com a marca do agar). A estirpe AbV5 *Azospirillum brasilense*, cedida pela Embrapa Londrina, foi inserida nos testes como estirpe controle, devido à comprovada capacidade em produzir AIA (Pedrinho et al., 2010; Szilagyizecchin et al., 2015).

**Tabela 1** – Estirpes pertencentes à CCMA utilizadas no experimento.

| <b>Código</b>   | <b>Espécies</b>                          | <b>Origem geográfica</b>    | <b>Substrato</b>                                    |
|-----------------|--|-----------------------------|---|
| CCMA 0010       | <i>Bacillus subtilis subsp. Subtilis</i> | Parque Xingú -MT            | Bebida indígena (Caxiri)                            |
| CCMA 0054       | <i>Bacillus subtilis</i>                 | Passos-MG                   | Fruto (Cerrado) (Pimenta-do-Mato)                   |
| CCMA 0085       | <i>Bacillus subtilis</i>                 | Arcos-MG                    | Fruto (Cerrado) (Marolo)                            |
| CCMA 0088       | <i>Bradyrhizobium japonicum</i>          | Arcos-MG                    | Fruto (Cerrado) (Marolo)                            |
| CCMA 0101       | <i>Burkholderia cenocepacia</i>          | Arcos-MG                    | Fruto (Cerrado) (Marolino)                          |
| CCMA 0401       | <i>Bacillus subtilis</i>                 | Tribo indígena-MT           | Bebida indígena (Chicha)                            |
| CCMA 0549       | <i>Bacillus subtilis</i>                 | Parque Xingú -MT            | Bebida indígena (Caxiri)                            |
| CCMA 0087       | <i>Bacillus subtilis</i>                 | Arcos-MG                    | Fruto (Cerrado) (Marolo)                            |
| CCMA 0082       | <i>Burkholderia phenazinium</i>          | Arcos-MG                    | Fruto (Cerrado) (Ananás)                            |
| CCMA 0113       | <i>Burkholderia multivorans</i>          | Luminárias-MG               | Fruto (Cerrado) (Murici-do-Cerrado)                 |
| CCMA 0448       | <i>Paenibacillus amylolyticus</i>        | Lavras-MG                   | Café (grão)   |
| CCMA 0056       | <i>Burkholderia cepacia</i>              | Passos, MG                  | Fruto (Cerrado) (Pimenta-do-Mato)                   |
| CCMA 0551       | <i>Bacillus subtilis</i>                 | Arcos-MG, Brasil            | Solo do Cerrado (estação seca)                      |
| CCMA 0550       | <i>Bacillus subtilis</i>                 | Passos-MG, Brasil           | Solo do Cerrado (estação chuvosa)                   |
| CCMA 0083       | <i>Burkholderia sordicola</i>            | Arcos-MG, Brasil            | Fruto (Cerrado) (Ananás)                            |
| CCMA 0457       | <i>Bacillus amyloliquefacien</i>         | Lavras-MG, Brasil           | Coffee bean (wet)                                   |
| CCMA 1269       | <i>Paenibacillus illinoisensis</i>       | Patrocínio-MG, Brasil       | Bebida fermentada de café                           |
| CCMA 1254       | <i>Lysinibacillus fusiformis</i>         | Patrocínio-MG, Brasil       | Bebida fermentada de café                           |
| CCMA 1285       | <i>Enterobacter cloacae</i>              | Patrocínio-MG, Brasil       | Bebida fermentada de café                           |
| CCMA 1286       | <i>Bacillus pumilus</i>                  | Patrocínio-MG, Brasil       | Bebida fermentada de café                           |
| CCMA 1287       | <i>Bacillus subtilis</i>                 | Patrocínio-MG, Brasil       | Bebida fermentada de café                           |
| CCMA 1288       | <i>Lysinibacillus amylolyticus</i>       | Patrocínio-MG, Brasil       | Bebida fermentada de café                           |
| Ab-V5           | <i>Azospirillum brasilense</i>           | EMBRAPA Londrina-PR, Brasil | -   |
| UNIFENAS 100-13 | <i>Burkholderia cenocepacia</i>          | Alfenas-MG, Brasil          | <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu Rhizosphere |
| UNIFENAS 100-39 | <i>Burkholderia cenocepacia</i>          | Alfenas-MG, Brasil          | <i>Brachiaria brizantha</i> cv. Marandu Rhizosphere |

Fonte: Autores.

O outro meio de cultura utilizado foi o JMV semissólido para crescimento de *Burkholderia* spp. a estirpe UNIFENAS 100-13 *Burkholderia cenocepacia* foi usada como controle positivo, apresenta 5 g L<sup>-1</sup> de manitol; 0,6 g L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,8 g L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,2 g L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,1 g L<sup>-1</sup> NaCl; , 0,02 g L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 2 mL de solução de micronutrientes; 2 mL de solução de azul de bromotimol (0,5% em 0,2 KOH); 4 mL de solução de FeEDTA (solução 1,64%); 1 mL de solução vitaminas; pH 4; 2 4; 5 (Baldani; Baldani e Dobereiner, 2000) e adicionar e adicionar 2,5 g L<sup>-1</sup> de agar (variável, de acordo com a marca do agar).

Os meios foram transferidos para tubos de ensaio com 6 mL de meio de cultura, sendo autoclavado a 121 C por 15 minutos, em triplicata. Após os meios solidificarem, a inoculação das bactérias foi realizada por meio da raspagem da colônia da placa de Petri com culturas de 48 h, usando alça de platina com a ponta fina, introduzindo as colônias até o final dos tubos. Os tubos foram incubados em BOD a 30 C, e avaliados diariamente por até 12 dias. A avaliação foi feita visualmente e, como resultado positivo, a formação de uma película aerotóxica típica próxima à superfície do meio, indicando que a fixação de nitrogênio ocorreu, uma vez que há redução do nitrogênio atmosférico em amônia, podendo ou não haver mudança de coloração de verde intenso para verde azulado ou azul no caso para o meio NFb semissólido (Dobereiner, Baldani e Baldani, 1995). Essa mudança de coloração indica alteração do pH do meio, sendo a coloração amarelada representando o meio ácido e a coloração azulada representando o meio básico. No meio JMV semissólido uma película também é formada na superfície do meio 4 a 5 dias após a incubação. A presença da película aerotóxica é constituída de células bacterianas conforme descrito por Kuss et al. (2007)

### 2.3 Produção do fitohormônio vegetal - auxina (ácido-3-indolacético)

O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com três repetições. As estirpes listadas na Tabela 1 foram testadas quando a capacidade de produzir ácido-3-indolacético (AIA). A produção de auxina foi determinada utilizando a metodologia adaptada de Gordon e Weber (1951) e Loaces, Ferrando e Scavino (2011). As estirpes congeladas em ultrafreezer foram cultivadas em tubos de ensaio com meio de cultura caldo nutriente, incubados a em BOD a 30 C, por 48 horas em quadruplicada. Posteriormente, foi ajustado à densidade óptica entre 0,5 (107 -108 CFU mL 1) a 600 nm no equipamento espectrofotômetro. Foram transferidos 5% (v/v) com auxílio de uma pipeta automática para os tubos de ensaio com meio de cultura caldo nutriente, suplementado com triptofano (100 mg/mL) e incubados novamente em BOD a 30 C, por 72 horas no escuro. Após esse tempo foi feita a centrifugação por 12.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante da cultura foi recuperado.

A produção de auxina foi determinada pela mistura de 1 mL do sobrenadante com 1 mL do Reagente de Salkowski (1,875 g de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, 100 mL de H<sub>2</sub>O e 150 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 35%) (Gordon; Weber, 1951; Loaces; Ferrando; Scavino, 2011). A mistura foi incubada em BOD a 30 C, por 15 minutos no escuro. Novamente foi feita uma leitura no equipamento espectrofotômetro, ajustada a densidade óptica a 530 nm e medido a OD de cada amostra. A quantificação foi feita por uma curva padrão a partir da solução de AIA contendo 1 mg/mL. A coloração rosa-avermelhada das amostras indica a produção de auxina. Como controle positivo para esse teste será utilizada a bactéria Ab-V5 *Azospirillum brasiliense*.

### 2.4 Inoculação das bactérias na bananeira *in vitro*

O experimento foi conduzido no Laboratório de Cultura de Tecidos da Universidade Federal de Lavras. Explantes de bananeira da cultivar Grand Nine foram extraídos de plantas cultivadas previamente em meio MS para essa finalidade. O tamanho dos explantes foi padronizado em 3 centímetros de comprimento e o corte foi feito em câmara de fluxo contínuo, tendo todo o material utilizado, pinças, bisturi, tubos, placas de petri, sido autoclavado previamente e o local desinfetado com álcool 70%. Foram extraídos no total 120 explantes, sendo 30 explantes para cada tratamento, os quais consistem em 3 diferentes bactérias promotoras de crescimento vegetal e um tratamento testemunha sem inoculação.

Imediatamente após a extração, foi feita a inoculação dos explantes com três bactérias diferentes, as quais foram cultivadas em solução nutritiva, a 30°C no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Lavras, pelo tempo necessário para que atingissem a concentração padrão de  $1 \times 10^8$  células por  $\text{cm}^3$  de solução. Foram preparadas soluções distintas para cada bactéria, sendo elas Ab-V5 *Azospirillum brasilense*, CCMA 0056 *Burkholderia cepacia* e CCMA 1285 *Enterobacter cloacae*, sendo cada solução vertida em um recipiente de vidro com volume de 300 mL. Foram colocados 30 explantes em cada frasco, os quais foram submetido à agitação mecânica por uma hora.

Posteriormente os explantes foram retirados ao mesmo tempo da solução, colocados em uma placa de petri para que nenhum explante ficasse mais tempo que o outro em contato com a solução e então colocados um a um em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MS.

Os tubos foram lacrados com plástico filme e acondicionados em câmara de crescimento à temperatura de 27°C, com iluminação constante por lâmpadas do tipo LED, por um período de 30 dias. Ao final desse período, as plantas foram retiradas dos tubos, o sistema radicular foi lavado cuidadosamente para remover os resíduos do meio e seco delicadamente com auxílio de papel toalha. Foram então aferidos os seguintes caracteres agrônômicos: Massa fresca de folhas, massa fresca de raiz, massa seca de folhas, massa seca de raiz, número de folhas por plântula, número de raízes por plântula, altura de plântula, comprimento de raiz e área foliar.

### 3. Resultados e discussão

#### 3.1 Seleção das bactérias

Na Tabela 2 encontram-se os resultados dos primeiros testes (produção de auxina e fixação de  $\text{N}_2$ ) das 25 estirpes pertencentes à CCMA/UFLA-MG.

**Tabela 2** – Testes de Produção de Auxina e Fixação de nitrogênio das estirpes (CCMA UFLA).

| CODE            | IAA ( $\mu\text{g/ml}$ ) | Nitrogen-fixation |     |
|-----------------|--------------------------|-------------------|-----|
|                 |                          | NFb               | JMV |
| CCMA 0088       | 3.698 a                  | +                 | -   |
| CCMA 0101       | 3.312 a                  | +                 | -   |
| CCMA 0056       | 3.105 a                  | +                 | -   |
| CCMA 1285       | 2.869 a                  | +                 | -   |
| Ab-V5           | 2.488 a                  | +                 | -   |
| CCMA 1269       | 2.463 a                  | -                 | +   |
| UNIFENAS 100-13 | 2.363 a                  | +                 | +   |
| CCMA 0401       | 2.210 a                  | +                 | -   |
| CCMA 1288       | 2.065 a                  | +                 | -   |
| CCMA 0551       | 2.017 a                  | +                 | -   |
| CCMA 0549       | 1.824 a                  | +                 | -   |
| CCMA 0113       | 1.268 b                  | +                 | -   |
| CCMA 0082       | 1.188 b                  | +                 | -   |

|                 |         |   |   |
|-----------------|---------|---|---|
| CCMA 0085       | 1.114 b | + | - |
| CCMA 1287       | 1.074 b | + | - |
| CCMA 0448       | 1.074 b | - | - |
| CCMA 0083       | 1.006 b | + | - |
| CCMA 0054       | 0.947 b | + | - |
| CCMA 0010       | 0.796 b | + | - |
| CCMA 0457       | 0.779 b | + | - |
| UNIFENAS 100-39 | 0.714 b | + | + |
| CCMA 0550       | 0.626 b | + | - |
| CCMA 1286       | 0.597 b | + | - |
| CCMA 1254       | 0.561 b | + | - |
| CCMA 0087       | 0.387 b | + | - |

Legenda: AIA: Ácido Indol Acético. Fixação de N: medida pela presença da película de crescimento em meio semissólido sem nitrogênio NFb e JMV como (+) positivo e (-) negativo. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Skott-Knot, a 5% de probabilidade.

Fonte: Autores.

As estirpes apresentaram produção de AIA variando entre 0,39 e 3,70  $\mu\text{g/mL}$ . Os valores de AIA obtidos estão de acordo com os encontrados em outros estudos, nos quais, observaram-se também variabilidade na capacidade de produzir este fitohormônio pelas estirpes bacterianas (Pedrinho et al. 2010; Chaves et al., 2015). Os melhores resultados foram as estirpes, CCMA 0088 *Bradyrhizobium japonicum*, CCMA 0101 *Burkholderia cenocepacia*, CCMA 0056 *Burkholderia cepacia*, CCMA 1285 *Enterobacter cloacae* e AbV5 *Azospirillum brasilense* que produziram 3,70; 3,31; 3,10; 2,86 e 2,48  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

De modo geral a produção de AIA observada para as bactérias testadas está dentro do esperado, pois cada isolado vai apresentar diferentes produções, dependendo do modo de cultivo e da estirpe utilizada (Cassán et al, 2014). Dados apresentados por Dias et al., (2009), relataram menor produção de AIA por *Bacillus megaterium* e *Bacillus subtilis*, endofíticos em morangos, encontrando produções menores de 5  $\mu\text{g/mL}$ , e promoveram crescimento quando inoculados em mudas de morangos, semelhantes a encontradas também nesse trabalho.

A detecção da produção de AIA pela estirpe CCMA 1285 *Enterobacter cloacae*, nesse trabalho foram 2,86  $\mu\text{g/mL}$ , sendo valor maior comparados nos estudos de George et al., (2013) com produção de 2,40  $\mu\text{g/mL}$  com o mesmo gênero. Verificou-se que as estirpes CCMA 0101 *Bradyrhizobium* e CCMA 0101 *Burkholderia cenocepacia* a dosagem de produção de AIA superior em relação ao controle utilizado (Ab-V5 *Azospirillum brasilense*) indicando possíveis estirpes a serem utilizadas como inoculantes em outros trabalhos.

Os resultados de produção de AIA encontrados por Pereira et al., (2012) em relação ao gênero *Bacillus* que variou de 1,36 a 19,42  $\mu\text{g/mL}$ , sendo que os valores encontrados nesse trabalho foram relativamente nesse intervalo de produção também para esse gênero (0,38 a 2,21  $\mu\text{g/mL}$ ), e inferiores ao controle utilizado (2,48  $\mu\text{g/mL}$ ). Apesar dos resultados apresentarem concentrações menores de AIA que em outros trabalhos, podem contribuir para o desenvolvimento do morango. A produção desse hormônio pode ainda ser influenciada por outros fatores como condições médias de pH, disponibilidade de substratos, presença de ácidos orgânicos, metais e fase de crescimento do microrganismo (Frankberger, Arshad 1995; Martinez-Viveros et al. 2010; Jha, 2012).

Todas as estirpes (exceto as CCMA 0448 *Paenibacillus amylolyticus*, e 413 *Paenibacillus illinoisensis*) foram capazes de fixar nitrogênio em vida livre para o meio NFb. Já para o meio JMV, apenas as estirpes UNIFENAS 100-13 *Burkholderia cenocepacia*, UNIFENAS 100-39 *Burkholderia cenocepacia* e CCMA 1269 *Paenibacillus illinoisensis* tiveram resultados positivos. A Figura 1 mostra a representação do halo de crescimento (película) que indica estirpes positivas.

**Figura 1** – Teste de fixação de nitrogênio em meio NFb (A) e JMV (B).



Fonte: Autores.

A partir dos resultados desses testes (produção de AIA e fixação de nitrogênio) e pela análise de médias (Tabela 1), as três bactérias que apresentaram melhores resultados para segunda parte do experimento foram a Ab-V5 *Azospirillum brasilense*, CCMA 0056 *Burkholderia cepacia* e CCMA 1285 *Enterobacter cloacae*.

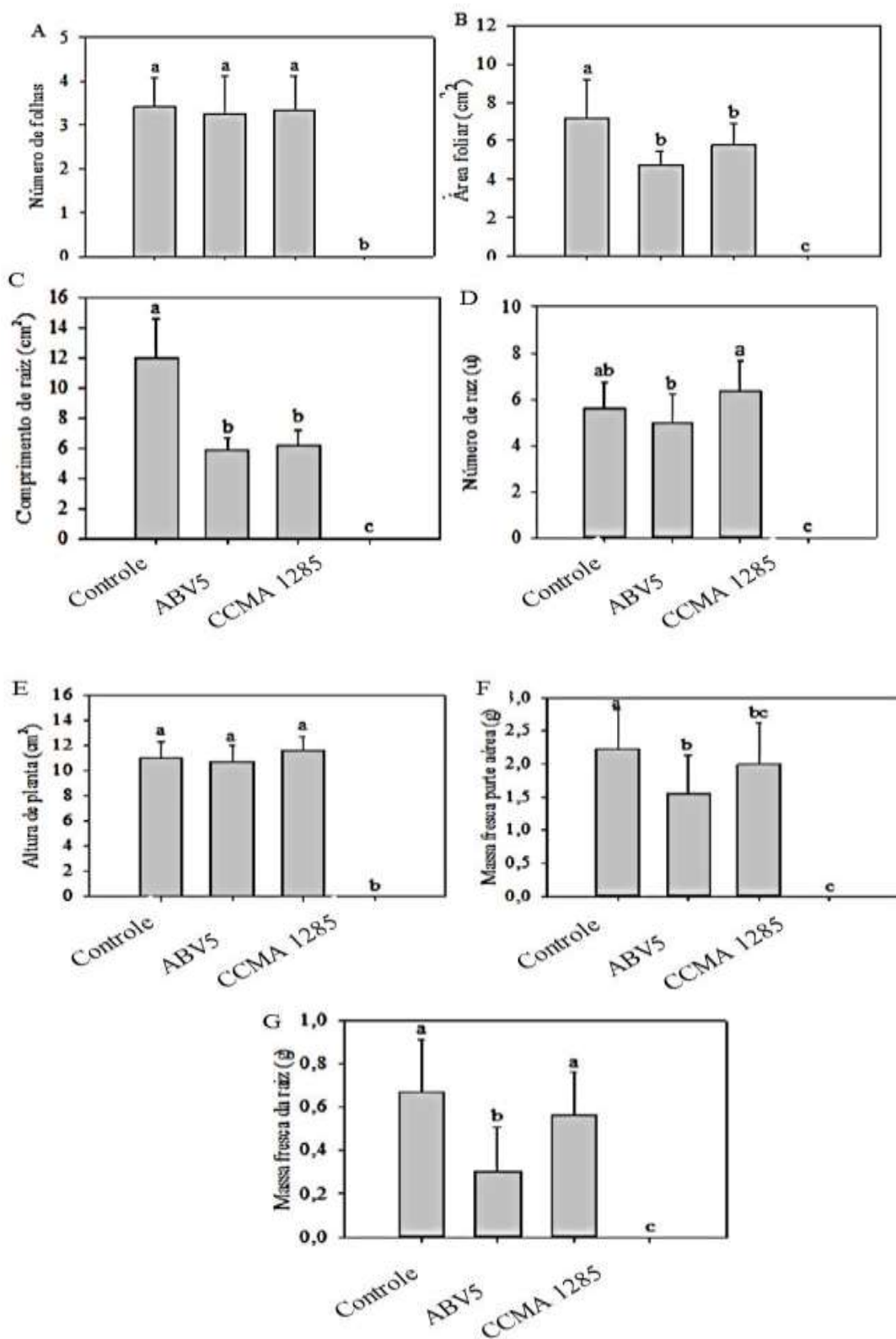
### 3.2 Inoculação em mudas de bananeira

Com base nos valores obtidos no teste *in vitro*, foram selecionados três microorganismos para testes de promoção do crescimento e inoculados em mudas de bananeira, sendo elas Ab-V5 *Azospirillum brasilense*, CCMA 0056 *Burkholderia cepacia* e CCMA 1285 *Enterobacter cloacae*, pois além de estarem entre as bactérias com os maiores valores para os parâmetros analisados, são as mais descritas na literatura como promotoras de crescimento de plantas. Aos 30 dias após a primeira inoculação, avaliou-se número de folhas, área foliar, comprimento e número de raiz; altura da parte aérea, massa fresca de parte aérea e de raiz.

De forma geral, a estirpe CCMA 0056 *Burkholderia cepacia* ocasionou a morte de todos os explantes. A proliferação dessa bactéria foi tão intensa no meio de cultura que competiu com a muda *in vitro* pela absorção de nutrientes. Para as variáveis número de folhas e altura da parte aérea (Figura 2) não houve diferença significativa do controle em relação às plantas inoculadas com Ab-V5 *Azospirillum brasilense* e CCMA 1285 *Enterobacter cloacae*. Para as demais variáveis a presença das bactérias *in vitro* ocasionaram redução nos valores das variáveis fitotécnicas.



**Figura 2** - Número de folhas por planta (A), área foliar média (B), Comprimento de raiz (B), número de raízes (C), altura de planta (E), massa fresca da parte aérea (F) e massa fresca da raiz (G) de explantes de bananeira inoculados com diferentes bactérias.



\* Significativo pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Barra associada a cada média corresponde ao erro padrão.  
Fonte: Autores.

Em um estudo investigando o crescimento vegetativo de morangos (Rosaceae), Andrade et al. (2019) também observaram que o uso de bactérias promotoras de crescimento, como *Azospirillum brasilense*, *Burkholderia cepacia* e *Enterobacter cloacae*, promoveu crescimento de brotos semelhante ao encontrado em plantas cultivadas com fertilizante sintético, possibilitando o uso de microrganismos para reduzir os custos de produção. Porém, apesar da utilização de estirpes semelhantes, a inoculação nesse trabalho foi *in vitro* e uma das hipóteses de ausência de resultados positivos foi o tempo de exposição das bactérias ao explantes que foi de uma hora. Além disso, o tamanho reduzido dos explantes, aliado ao tempo de exposição, pode ter provocado uma supercolonização das bactérias competindo com o explante pelos nutrientes contidos no meio.

#### 4. Conclusão

A inoculação com a bactéria *Burkholderia* causou a morte de explantes de bananeira, bem como o crescimento de explantes de bananeira é reduzido quando inoculados com as bactérias *Azospirillum brasiliense* (Ab V5) e *Azospirillum* (CCMA 1291), neste sentido, o trabalho traz grandes contribuições para novos estudos quanto a aplicação de bactérias promotoras de crescimento em mudas de *Musa sp.* cultivadas *in vitro*.

#### Agradecimento

Os autores agradecem a FAPEMIG pelo apoio financeiro ao projeto.

#### Referências

- Andrade, F. M., de Assis Pereira, T., Souza, T. P., Guimarães, P. H. S., Martins, A. D., Schwan, R. F., Pasqual, M., & Dóri, J. (2019). Beneficial effects of inoculation of growth-promoting bacteria in strawberry. *Microbiol. Res.*, 223, 120–128.
- Baldani, V. D., Baldani, J. I., & Döbereiner, J. (2000). Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. *Biol. Fert. Soils*, 30, 485–491.
- Cassán, F., Vanderleyden, J. & Spaepen, S. (2013). Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. *J. Plant Growth Regul.*, 33, 440–459.
- 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. 2009. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. *World J. Microb. Biot.* 25, 189–195.
- Döbereiner, J., Baldani, V. L. D., & Baldani, J. I. (1995). *Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas*. Brasília: Embrapa-SPI.
- Jausoro, V., Llorente, B. E., & Apo'stolo, N. M. (2010) Structural differences between hyperhydric and normal *in vitro* shoots of *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC) Mattos (Bignoniaceae). *Plant Cell Tissue Organ*, 101, 183–191.
- Jha, C. K., Patel, B., & Saraf, M. (2012). Stimulation of the growth of *Jatropha curcas* by the plant growth promoting bacterium *Enterobacter cancerogenus* msa2. *World J. Microb. Biot.* 28: 891–899.
- Klopper, J. W., Reddy, M. S., Rodríguez-Kabana, R., Kenney, D. S., Kokalis Burrelle, N., & Martinez-Ochoa. (2004). Application for rhizobacteria in transplant production and yield enhancement. *Acta Hort (ISHS)*, 631: 219-229.
- Kuss, A. V., Kuss, V. V., Lovato, T., & Flôres, M. L. (2007). Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético *in vitro* por bactérias diazotróficas endofíticas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42, 1459-1465.
- Loaces, I., Ferrando, L., & Scavino, A. F. 2011. Dynamics, diversity and function of endophytic siderophore producing bacteria in rice. *Microb Ecol.* 61, 606–618.
- Loeper, J., Loeper, J., & Fragny, M. (1978). The physiological role of the silicone and its antiatheromatous action, in: *Biochemistry of silicone and related problems*. AVI Press, 2810306.
- Oliveira, H. *Comportamento de cultivares de bananeira (Musa spp.) resistentes a doença no processo de micropropagação*. 2010. 79 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia. Belém.
- Pedrinho, E. A. N., Júnior, R. F. G., Campanharo, J. C., Alves, L. M. C. & Lemos, E. G. M. (2010). Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. *Bragantia*, 69: 905-911.

- Peixoto Neto, P. A. S., Azevedo, J. L., & Caetano, L. C. (2004). Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. *Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 3(4), 69-72.
- Pereira, G. V. M. De., Magalhães, K. T., Lorenzetti, E. R., Souza, T. P., & Scwan, R. F. A (2012). Multiphasic Approach for the Identification of Endophytic Bacterial in Strawberry Fruit and their Potential for Plant Growth Promotion. *Microbial Ecology*, 63:(2), 405–417.
- Pereira, M. M. A., Morais, L. C., Marques, E. A., Martins, A. D., Cavalcanti, V. P., Rodrigues, F. A., Gonçalves, W. M., Blank, A. F., Pasqual & M., Dória, J. (2019). Humic Substances and Efficient Microorganisms: Elicitation of Medicinal Plants – A review. *Journal of Agricultural Science*; 11(7), 1-13.
- Puente, M. E., Li, C. Y., & Bashan, Y. (2009) Endophytic bacteria in cacti seeds can improve the development of cactus seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, 66:402–408.
- Silva Neto, S. P. da. (2001). *Propagação por biotecnologia*. In: Ruggieiro, C. (Coord.). Bananicultura: FUNEP, 128-149.
- Souza, R., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. P. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, 38 (4), 401-19.
- Szilagyi-Zecchin, V. J., Mógor, A. F., Ruaro, L., & Röder, C. (2015). Crescimento de mudas de tomateiro (*Solanum lycopersicum*) estimulado pela bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* fzb42 em cultura orgânica. *Rev. Ciênc. Agr*, 38, 26-33.
- Vettori, L., Russo, A., Felici, C., Fiaschi, G., Morini, S., & Toffanin, A. (2010). Improving micropropagation: effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 on acclimatization of rootstocks of fruit tree. *Journal of Plant Interactions*, 5, 4.