

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CAMPUS DE CURITIBANOS  
DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA, BIODIVERSIDADE E FLORESTAS  
CURSO DE ENGENHARIA FLORESTAL

Talita Gatner de Souza Schwinden

**Bactérias endofíticas associadas à micropropagação de *Dendrocalamus*  
*Asper*(Schult F.) Backer Ex Heyne**

Curitibanos, SC

2021

Talita Gatner de Souza Schwinden

**Bactérias endofíticas associadas à micropropagação de *Dendrocalamus*  
*asper*(Schult F.) Backer ex Heyne**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Engenharia Florestal do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Florestal.  
Orientador: Prof<sup>ª</sup>.Dr<sup>ª</sup>. Glória Regina Botelho  
Coorientador: Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra

Curitiba, SC

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Schwinden, Talita Gatener de Souza  
BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS À MICROPROPAGAÇÃO DE  
Dendrocalamus asper (Schult F.) Backer ex Heyne / Talita  
Gatener de Souza Schwinden ; orientador, Glória Regina  
Botelho, coorientador, Miguel Pedro Guerra, 2021.  
32 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus  
Curitibanos, Graduação em Engenharia Florestal,  
Curitibanos, 2021.

Inclui referências.

1. Engenharia Florestal. 2. Bactérias endofíticas . 3.  
Micropropagação de Bambu. I. Botelho, Glória Regina. II.  
Guerra, Miguel Pedro. III. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Graduação em Engenharia Florestal. IV. Título.

Talita Gatener de Sou Schwinden

Bactérias endofíticas associadas à micropropagação de *Dendrocalamus asper* (Schult F.) Backer ex Heyne

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Engenharia Florestal” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Engenharia Florestal

Local, 04 de março de 2022.



Documento assinado digitalmente  
MARCELO BONAZZA  
Data: 18/03/2022 14:07:28-0300  
CPF: 047.641.899-25  
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

---

Prof. Marcelo Bonazza, Dr.  
Coordenador (a) do Curso

Banca Examinadora:



Documento assinado digitalmente  
Gloria Regina Botelho  
Data: 21/03/2022 20:44:56-0300  
CPF: 802.241.057-87  
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

---

Prof.<sup>a</sup> Gloria Regina Botelho, Dr.<sup>a</sup>.  
Orientador (a)  
Universidade Federal de Santa Catarina



Documento assinado digitalmente  
MARIVAINÉ DA SILVA BRASIL  
Data: 22/03/2022 11:09:03-0300  
CPF: 497.019.591-91  
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

---

Prof.<sup>a</sup> Marivaine da Silva Brasil, Dr.<sup>a</sup>.  
Avaliadora  
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul



Documento assinado digitalmente  
Thiago Sanchez Ornellas  
Data: 22/03/2022 13:21:26-0300  
CPF: 363.232.828-52  
Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

---

Thiago Sanchez Ornellas, Dr.  
Avaliador  
Universidade Federal de Santa Catarina

## **AGRADECIMENTOS**

Eu agradeço por todos os obstáculos que Deus coloca em meu caminho. Nos momentos de dificuldades posso não compreender, mas quando chego ao topo da montanha, reconheço na paisagem a lição que Ele me deu. Agradeço a meus pais, Roseli e José Carlos que em conjunto foram por muitas vezes a força que me levantou e me fez seguir em frente. Porque em todos os momentos da vida, compartilhar é o mais importante. De que adianta uma viagem incrível se não há ninguém para trocar? A nossa família são as pessoas que nos acompanham na jornada e faz cada suspiro ser mais valioso que qualquer bem material. Essa vitória não seria possível se minha família não estivesse ao meu lado, confiando no meu potencial.

Quando você percebe que a sua mãe estava certa em quase tudo que dizia, é porque você amadureceu e chegou a hora de lhe agradecer.

Agradecer ao meu namorado Sergio Paulo que apareceu em meio a turbulência da execução do TCC, além de me apoiar, ajudou e me deu força para terminar esta etapa da minha vida.

Agradeço aos meus Professores e Mestres, em especial a Gloria Regina Botelho, Miguel Pedro Guerra, Paulo Poeta, Alexandre Siminski, Karine Louise Santos que com toda sua paciência, amor e dedicação moldaram em mim a Engenheira Florestal que aqui habitava. Um professor é a personificada consciência do aluno; confirma-o nas suas dúvidas; explica-lhe o motivo de sua insatisfação e lhe estimula a vontade de melhorar. Ao deixar esta fase da vida, eu não os deixo aqui, os levo comigo, em forma de aprendizado, de lembranças e de gratidão, pois sim, eu serei eternamente grata as pessoas que me ensinam.

Agradeço a toda equipe UFSC Curitibanos, pois daqui não levo colegas de universidade, levo amigos para uma vida toda, não saio aluna formada, saio como um patrimônio. Não poderia esquecer dos meus amigos, que por muitas vezes me aconselharam e enxugaram minhas lágrimas. Em especial a Vanessa Santana e Caroline Vaz, sempre que caio vocês me ajudam a levantar e em todos os meus sucessos vocês aplaudem de pé. Agradeço por tudo, amigas. Aos amigos de Florianópolis, pela ajuda e dedicação, obrigada. Agradeço a Deus e aos Orixás pelo que conquistei até agora, mas peço a Eles para me dar sabedoria para conquistar muito mais. O trajeto foi longo e cansativo, mas chegou ao fim graças ao apoio que recebi.

Gostaria que você soubesse que existe dentro de si uma força capaz de mudar sua vida.  
Basta que lute e aguarde um novo amanhecer.

Margaret Thatcher

## RESUMO

Os bambus são pertencentes à família Poacea, sendo distribuídos em cerca de 90 gêneros e 1400 espécies. Fazem parte de um grande grupo de monocotiledôneas perenes e apresentam grande potencial florestal e agrícola. Entretanto existem algumas dificuldades na suacadeia produtiva, tais como, deficiência no processo de multiplicação, raro florescimento esementes com baixa viabilidade. Isso dificulta sua propagação sexuada e assim utiliza-se a propagação vegetativa, com técnicas como transplante direto ou enraizamento de estacas e pedaços de colmos. Biotecnologias associadas à micropropagação se configuram como ferramentas úteis para sua propagação em larga escala. Estudos apontam que microrganismos endofíticos possuem diversas funções para as plantas, tendo como benefícios a fixação de nitrogênio, solubilização de fosforo, biorremediação, entre outros. Estes endofíticos foram se encontram presentes no Bambu, como demonstra o trabalho de Belincanta. O presente trabalho buscou testar o efeito promotor de crescimento de isolados bacterianos na aclimatização de plantas micropropagadas do bambu *Dendrocalamus asper*, avaliando-se o potencial de Fixação Biológica de Nitrogênio, utilizando-se de teste de FBN com meio específico e a possibilidade de Promoção de crescimento dos isolados selecionados por meio de testes *in vitro* com explantes de bambus. Ao trigésimo de subcultivo de *D. asper* *in vitro* foi inoculado 1 mL de cada suspensão dos isolados bacterianos na região basal das touceiras. Após quarenta e cinco dias da inoculação, foram avaliados os seguintes parâmetros: comprimento de raízes, altura dos explantes, quantidade de folhas e comprimento dos colmos. Dos isolados da coleção de bactérias endofíticas de *Dendrocalamus asper*, oito apresentaram resultados positivos para análises de FBN em meio específico, dois para a realização do teste de inoculação *in vitro*; destes nenhum apresentou resultado positivo para o teste de FBN. A escolha se deu em função da produção de AIA (média para Ba04 e alta para Ba24). Em relação a testemunha todos os tratamentos foram superiores, dando-se destaque ao Meio LB, que apresentou os melhores resultados, principalmente para o parâmetro de altura dos colmos.

**Palavras-chave:** Bambu. Isolados. FBN. Promotores de crescimento. *In vitro*. Não contaminantes.

## ABSTRACT

Bamboos belong to the Poacea family, being distributed in about 90 genera and 1400 species. They are part of a large group of perennial monocots and have great forestry and agricultural potential. However, there are some difficulties in its production chain, such as deficiency in the multiplication process, rare flowering and seeds with low viability. This makes its sexual propagation difficult and thus vegetative propagation is used, with techniques such as direct transplanted or rooting of cuttings and pieces of stems. Biotechnologies associated with micropropagation are useful tools for its propagation on a large scale. Studies indicate that endophytic microorganisms have several functions for plants, with benefits such as nitrogen fixation, phosphorus solubilization, bioremediation, among others. These endophytes were found in Bamboo, as demonstrated by the work of Belincanta. The present work sought to test the growth promoting effect of bacterial isolates on the acclimatization of micropropagated plants of the bamboo *Dendrocalamus asper*, evaluating the potential for Biological Nitrogen Fixation, using the FBN test with a specific medium and the possibility of promoting the growth of selected isolates through in vitro tests with bamboo explants. At the thirtieth of subculture of *D. asper* in vitro, 1 mL of each suspension of bacterial isolates was inoculated in the basal region of the clumps. Forty-five days after inoculation, the following parameters were evaluated: root length, explant height, number of leaves and stem length. Of the isolates from the collection of endophytic bacteria of *Dendrocalamus asper*, eight showed positive results for analysis of FBN in specific medium, and two for the in vitro inoculation test; of these none showed a positive result for the FBN test. The choice was based on the production of AIA (average for Ba04 and high for Ba24). In relation to the control, all treatments were superior, with emphasis on Medium LB, which presented the best results, mainly for the parameter of stem height.

**Keywords:**Bamboo. Isolates. FBN. Growth promoters.*In vitro*.Non-contaminating.

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

$\mu\text{M}$  – micromolar

AIA Ácido indol acético

BAP Benzilaminopurina/Benzylaminopurine

cm – centímetro

DIC Delineamento Inteiramente Casualizado

FNB

H Horas

LB Luria Bertani

mg - miligrama

mL Mililitro

mm – milímetros

UFC Unidade formadora de colônia

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
1.1	OBJETIVOS .....	12
1.1.1	Objetivo Geral.....	12
1.1.2	Objetivos Específicos .....	12
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>13</b>
2.1	BAMBU: IMPORTANTE CONTRIBUINTE ECONÔMICO E AMBIENTAL.....	13
2.2	BACTÉRIAS: CONTAMINANTES OU ENDOFÍTICAS na MICROPROPAGAÇÃO DO BAMBU?.....	14
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>17</b>
3.1	CAPACIDADE DE FIXAÇÃO BIOLógica DE NITROGÊNIO (FBN) <i>in vitro</i> . 17	17
3.2	DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO DOS ISOLADOS .....	18
3.3	OBTENÇÃO DOS EXPLANTES.....	19
3.4	INOCULAÇÃO DE EXPLANTES DE <i>Dendrocalamus asper</i> COM ISOLADOS BACTERIANOS .....	20
3.5	AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS ISOLADOS EM EXPLANTES DE <i>Dendrocalamus asper</i> .....	21
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>22</b>
4.1	POTENCIAL DE Fixação biológica de nitrogênio DOS ISOLADOS <i>in vitro</i> .....	22
4.2	AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS ISOLADOS nas culturas DE <i>Dendrocalamus asper</i> .....	24
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>27</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>28</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os bambus pertencem à família Poacea e estão distribuídos em cerca de 90 gêneros e 1400 espécies, distribuídos por regiões tropicais e subtropicais do planeta (DRUMOND, 2017). Possuem ciclo perene, são renováveis, com rápido crescimento, produzindo alta quantidade de biomassa(WIEDMAN, 2017).Seu caráter perene prescinde de replantio, e assim apresentam expressivo potencial agrícola e florestal comparativamente a outros tipos de matérias-primas, com aproveitamento por área e alta velocidade de crescimento (FIALHO *et al.*, 2005).

Mesmo sendo um mercado em expansão, ocorre a falta de tradição da cadeia produtiva e há lacunas de conhecimento e tecnologias que permitiriam usar diferentes espécies de bambu, o que o limitam a pequenos negócios, como o artesanato e ornamentação(DRUMOND; WIEDMAN 2017). Entretanto, Fialho *et al.* (2005) acreditam que a produção de bambu pode representar uma alternativa inovadora e interessante para o agronegócio e setor florestal brasileiro, tornando fundamental o avanço nas pesquisas e desenvolvimento de tecnologias para maximizar os benefícios socioeconômicos e ambientais.

Segundo Gilis *et al.* (2005) há algumas dificuldades no desenvolvimento da cadeia produtiva, e entre elas mencionam-se as dificultadas no processo de obtenção de mudas e a rara obtenção de sementes devido ao longo espaço entre florações sucessivas, sendo utilizada a propagação vegetativa, com técnicas como transplante direto ou enraizamento de estacas e pedaços de colmos (PEIXOTO, 2017).

Diante dessas dificuldades, uma alternativa que facilita a multiplicação dessas espécies, é a micropropagação (MUDOI *et al.*, 2013), que possibilita a produção em larga escala, mantendo a identidade genética do material, podendo ser direcionada para plantas matrizes.Mesmo uma alternativa tão eficiente pode apresentar problemas. Um dos gargalos é a taxa elevada de microrganismos associados àplanta matriz, o que causa a contaminação das culturas *in vitro*(RAMANAYAKE,2006). Alguns desses microrganismos são endofíticos, ou seja, com capacidade de colonizar vegetais internamente (TEIXERA *et al.*, 2007).Estudos apontam que microrganismos endofíticos possuem diversas funções para as plantas, tendo como benefícios a fixação

de nitrogênio, solubilização de fósforo, estímulo ou produção de fitormônios, destacando-se as auxinas, como a ácido indol acético (AIA)(TEIXERA *et al.*, 2007).

Diante dos fatos e das necessidades apresentadas de produção de mudas de alta qualidade de bambu busca-se utilizar bactérias endofíticas para estimular o crescimento da planta.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial de uso de isolados bacterianos como na micropropagação de *Dendrocalamus asper*.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial de FBN dos isolados *in vitro*.
- Avaliar o efeito do tamanho pré determinado da população bacteriana sobre as culturas *in vitro* de *Dendrocalamus asper*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

O avanço do uso do bambu em diversos setores socioeconômicos, além da sua importância ambiental, vem estimulado a necessidade de serem desenvolvidos e disponibilizados métodos rápidos e eficazes para sua propagação. Dentre esses métodos, inclui-se o desenvolvimento de protocolos de micropropagação, a fim de suprir a demanda crescente por mudas de boa qualidade.

### 2.1 BAMBU: IMPORTANTE CONTRIBUINTE ECONÔMICO E AMBIENTAL

Os bambus pertencem à família Poacea e se agrupam em 650 gêneros e 1200 espécies, que fazem parte da subfamília Bambusoideae, sendo consideradas gramíneas lenhosas não arbóreas (SORENG *et al.*, 2015). Apresentam distribuição natural nas zonas tropicais e subtropicais, entre aproximadamente, 46° N e 47° S de latitude, exceto na Antártica (KELCHNER *et al.*, 2013). Encontram-se naturalmente distribuídos pela Ásia, América e África, com fortes indícios de ser na Ásia, o seu centro de diversidade (GRECO, 2016)

Os bambussão gramíneas constituída da parte superior até o solo por colmos, segmentados por nós, entrenós que possuem folhas, bainhas e brotos na parte superior e na parte inferior do solo se encontram os rizomas, os brotos do rizoma e as raízes (KIGOMO, 2007). Os colmos têm morfologia variada, podem ser sólidos, fistulosos ou medulosos, eretos, arqueados, apoiantes ou escandentes. O diâmetro pode variar desde milímetros até dezenas de centímetros (DRUMOND; WIEDMAN, 2017).

O Brasil apresenta a maior diversidade de bambus do Novo Mundo, sendo listadas 232 espécies nativas distribuídas em 34 gêneros, com maiores ocorrências na Mata Atlântica e Amazônia (JUDZIEWICZ *et al.*, 1999; FILGUEIRAS; GONÇALVES, 2004). Os primeiros estudos de descrição da estrutura das florestas com bambu no Brasil foram realizados na Amazônia sul-ocidental nos anos 70 (CARMO *et al.*, 2017).

Apesar de o Brasil apresentar alta diversidade de espécies, a cadeia produtiva do bambu ainda é recente e se baseia em espécies exóticas e em tecnologias advindas dos países de origem, ignorando as espécies nativas com alto potencial (ORNELLAS,

2017). Umadas principais dificuldadespara a consolidação da cadeia produtiva do bambu no Brasil é o fornecimento em larga escala de mudas de boa qualidade genética e fitossanitária. Assim, torna-se necessário desenvolver novas metodologias de propagação que possam suprir as demandas do momento e do futuro (SÁNCHEZ, 2011).

Diante do baixo rendimento e alta heterogeneidade dos métodos convencionais de propagação da maioria dos bambus lignificados, a micropropagação é importante alternativa para produção de mudas (MUDOI *et al.*, 2013). A introdução *in vitro* de determinado genótipo possibilita a sua conservação a médio e longo prazo, isolando o germoplasma de fatores bióticos e abióticos do meio ambiente (ENGELMANN, 2011).Segundo Guerra *et al.* (1999), técnicas de cultura de tecidos vegetais apresentam grande potencial para o desenvolvimento e a propagação massal de germoplasma elite, com garantia de qualidade genética e fitossanitária (GUERRA *et al.*, 1999).

Há dificuldades micropropagação de bambus (BELINCANTA, 2019). Um dos principais gargalosé a elevada taxa de desenvolvimento de microrganismos associados à planta-matriz, especialmente, quando essa se encontra em condições de campo (CHOUDHURI, 2005; RAMANAYAKE *et al.*, 2006). Muitos desses microrganismos, especialmente as bactérias, são considerados endofíticos, ou seja, com capacidade de colonizar os tecidos vegetais internamente (KUSS *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2007).

## 2.2 BACTÉRIAS: CONTAMINANTES OU ENDOFÍTICAS NA MICROPROPAGAÇÃO DO BAMBU?

A ocorrência de bactérias em culturas de tecido de bambu já foi relatada na literatura para diversas espécies, como *Guadua angustifolia* (NADHA *et al.*, 2012). Santos *et al* (2014) obtiveram 32 isolados bacterianos a partir do cultivo *in vitro* de *Dendrocalamus asper* e *Bambusa oldhamii*. De acordo com NADHA *et al.* (2012), essa tem sido a causa da queda no desempenho de culturas, da degeneração de longo prazo dos estoques mantidos, e da dificuldade de reprodutibilidade de protocolos de cultura de tecidos.

A contaminação microbiana que ocorre durante a propagação *in vitro* de plantas é um problema que impede o sucesso e o estabelecimento de processos de assepsia adequados para cada cultura (BELINCANTA, 2019). Procedimentos experimentais que incluem a desinfestação química e uso de antibióticos foram utilizados com vários níveis de sucesso para minimizar ou eliminar a contaminação (NADHA *et al.*, 2012). A contaminação por microrganismos na introdução de espécies de bambu *in vitro* é um dos principais gargalos para a micropropagação (RAMANAYAKE *et al.*, 2006).

Entretanto, vários estudos mostraram que parte dos microrganismos contaminantes ocorre de forma endofíticas, em cada planta (HALLMANN *et al.*, 1999). Uma definição recente sobre endofíticos é relatada como sendo microrganismos que podem ou não ser cultiváveis e habitam o interior dos tecidos vegetais, sem causar danos ao hospedeiro (ESPOSITO-POLESI, 2020). Microrganismos endofíticos têm um papel especial na planta em relação à adaptação ao estresse, devido à sua particular parceria estrutural e funcional com a planta (THOMAS *et al.*, 2007; COMPANT *et al.*, 2010). De acordo com Moshynets (2012), é importante o conhecimento da microbiota associada a espécies de bambu para que se possa ter conhecimento de seus efeitos sobre as plantas. Assim, muitos microrganismos considerados contaminantes são caracterizados como endofíticos, ou seja, têm a capacidade de colonizar tecidos vegetais e serem benéficos. Em sua maioria, esses microrganismos são bactérias, responsáveis pela síntese de várias substâncias e processos que fornecem moléculas químicas para o desenvolvimento do vegetal (DO VALLE, 2019).

As bactérias endofíticas estão presentes na maioria das plantas, de forma latente ou ativa nos tecidos vegetais e têm potencial no crescimento de plantas, pela capacidade de solubilização de fósforo, fixação biológica do nitrogênio, ou estimular a produção de fitormônios (CHEN *et al.*, 2006; SELVAKUMAR *et al.*, 2008). Como exemplo de produção de fitormônios, podemos citar o trabalho realizado por Belincanta (2019), em que os isolados bacterianos produziram, em média, 9,25 µg/mL de AIA. A autora selecionou três isolados que apresentaram efeitos diferenciados em explantes de bambu. O isolado Ba24 (*Brevibacillus parabrevis*) induziu maior número de raízes, o isolado Ba03 (*Serratia marcescens*) reduziu a altura e o comprimento de raízes e o isolado Ba16 (*Bacillus subtilis*) não alterou os parâmetros avaliados.

Uma técnica inovadora e que vem se mostrando promissora é a aplicação desses microrganismos na micropropagação, denominada *biopriming in vitro* (BERNAL *et al.*, 2008). Em estudos de inoculação de microrganismos endofíticos em cultivo *in vitro*, antes da aclimatização, mostraram evidências de maior taxa de sobrevivência das plantas *ex vitro*. Foi observada a contribuição no enraizamento, na brotação e no aumento da taxa fotossintética em cana-de-açúcar, aumentando o rendimento na propagação (NOWAK; PRUSKI, 2004).

Diversas bactérias endofíticas têm sido descritas como fixadoras de N (KUSSE *et al.*, 2007). Estudos sobre a interação planta-microrganismos demonstram o enorme potencial das BPCVs (Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal), que representam uma alternativa ao uso de insumos agrícolas (BALDOTTO *et al.*, 2010). Diversas pesquisas direcionadas a plantações e a produtividade têm revelado que bactérias promotoras de crescimento vegetal apresentam resultados positivos no crescimento de diferentes culturas, em que estirpes bacterianas foram capazes de fixar o nitrogênio (SOUSA *et al.*, 2019).

Avanços significativos ocorreram nas pesquisas sobre FBN em gramíneas, com a descoberta do meio semissólido NFb (Oliveira *et al.*, 2002). Elaborado sem fonte nitrogenada, a condição de semissólido cria um ambiente com baixo nível de oxigênio, semelhantemente ao que ocorre no solo ou na planta, onde estão localizadas bactérias diazotróficas microaerofílicas associadas a raízes de plantas. Estes organismos são denominados diazotróficos e o mecanismo responsável pela incorporação de N à biomassa são chamados de fixação biológica de nitrogênio (FBN). Dessa forma, a ação de microrganismos fixadores de nitrogênio e desnitrificadores garantem um reservatório inesgotável de nitrogênio na atmosfera. Além de garantir um ecossistema em equilíbrio, a redução na aplicação de doses excessivas de compostos nitrogenados, como por exemplo, o nitrato, que contamina as águas e os vegetais consumidos pelo homem, possibilita o desenvolvimento de uma agricultura menos agressiva ao ambiente (SOUSA *et al.*, 2019).

### 3 METODOLOGIA

Os isolados bacterianos foram obtidos do cultivo *in vitro* de explantes de *Bambusa oldhamii* e *Dendrocalamus asper*. O material biológico provindo da tese de doutorado de Daniela Weber Ribeiro dos Santos (2014), do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da UFSC, sendo obtidos inicialmente 32 isolados. O material obtido, inicialmente, era considerado contaminante e foram purificados e isolados no Laboratório de Microbiologia da UFSC em Curitiba, onde estão alocados na coleção do LMPCP a uma temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ao realizar nova purificação, foram encontrados mais dois isolados, totalizando 34.

#### 3.1 CAPACIDADE DE FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN) *in vitro*.

Para a verificação do potencial em fixar Nitrogênio, os isolados foram inoculados em meio semissólido NFBsem adição de N(DOBEREINER,1999). Foram colocados 5 mL de meio em frascos de penicilina e inoculados os 34 isolados. Cada isolado foi testado com três repetições. A incubação foi a  $28^{\circ}\text{C}$  com períodos de incubação de 24 h durante 10 dias. Foram analisados a formação de película no meio que indicava a capacidade de FBN dos isolados.

Figura 1 – Realização do teste de FBN em meio semissólido

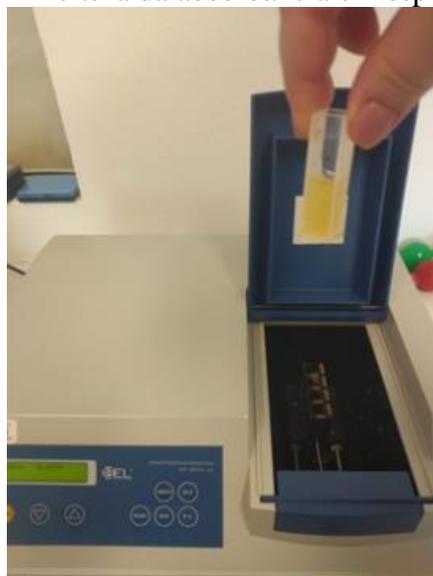


A esquerda o frasco utilizado durante os testes, já inoculado com a bactérias. A direita procedimento de Inoculação.

### 3.2 DETERMINAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO DOS ISOLADOS

Os isolados selecionados para o experimento foram colocados em tubos contendo 20 mL de meio LB líquido por 24 horas. Logo após o crescimento, foram pipetados um mL de cada suspensão colocado em novos frascos com 20 mL de meio LB líquido. Esse foi considerado o tempo zero ou início da curva. De cada frasco foram pipetados um mL e colocados em 9 mL de solução salina 0,9%, para proceder à diluição seriada, até  $1/10^{-7}$ . Das diluições (de  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) foram retirados 0,1 mL para plaqueamento em meio LB sólido. As placas foram mantidas por 48h a 28 °C e, posteriormente, quantificadas UFC (Unidades Formadoras de Colônias). Este Procedimento foi repetido a cada período da análise (curva), sendo esses: 0h, 1h, 6h, 24h e 48h. A cada período, além da diluição seriada, alíquota do meio de cultivo foi retirada para leitura da absorbância em espectrofotômetro modelo 2000-UV da fabricante Bel Equipamentos sob comprimento de onda de 546 nm.

Figura 2 – Leitura da absorbância em espectrofotômetro.



Fonte: A Autora

Realizou-se o procedimento de curva de crescimento para padronizar o número de UFC (Unidade Formadoras de Colônia) a ser inoculado nos explantes de bambu, de cada um dos isolados testados. Após a quantificação do crescimento dos isolados Ba04 e Ba24, por 48 h, observou-se que em 24h, ambas apresentavam crescimento na magnitude de  $10^7$  UFC/mL.

Tabela 2. Resultado da curva de crescimento e quantidade de UFC a serem utilizadas nos testes com *Dendrocalamus asper*.

ISOLADOS	$10^5$	$10^6$	$10^7$	$10^8$
Ba04	398	345	337	298
Ba24	418	394	345	342

Resultados obtidos para os isolados em 24h e em vermelho destaca-se o resultado da diluição escolhida.

Tal procedimento é realizado afim de padronizar quantidades semelhantes de UFC no teste de inoculação, afim de manter acurácia e precisão nos resultados obtidos no presente estudo.

### 3.3 OBTENÇÃO DOS EXPLANTES

A partir de matrizes de *Dendrocalamus asper*, cedidas pelo Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal do CCA/UFSC, foram feitas multiplicações para obter o número 50 de explantes para instalação do experimento.

Assim que recebidos, as culturas foram retiradas de seu recipiente de transporte, tendo a raiz podada, reduzindo-se as mini-touceiras em colmos individualizados, os quais, em seguida, sofreram cortes no segundo entre nó. Esses segmentos nodais foram então inoculados em tubos de ensaio contendo 15 mL de meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) com 15  $\mu$ M de BAP (Benzilaminopurina). As culturas foram mantidas durante 30 dias em sala de cultura com temperatura de 25  $\pm$  2  $^{\circ}$ C, com fotoperíodo de 16h de luz, com lâmpadas fluorescentes brancas na intensidade de 40 micromol/m<sup>2</sup>/s de fótons.

Após o crescimento das touceiras, os colmos obtidos foram submetidos a uma nova multiplicação. De cada minitouceira foram retirados os primeiros entrenós de cada ramo. Logo em seguida foram retiradas as bainhas que envolviam os entrenós, colocando em imersão em álcool 70 $^{\circ}$  por 2 min, imersas em fungicida Kasumin<sup>®</sup> por um min, uma nova imersão em álcool 70 $^{\circ}$  por mais um min, seguida de uma imersão em NaOCl 2% e tewn 20% sendo agitadas por cerca de 2 min, levadas ao fluxo sendo enxaguadas com água deionizada, as gemas deverão ser cortadas, deixando apenas uma

pequena parte para reserva nutricional e colocadas para crescer em tubos de ensaio com meio 15 mL de meio MS com 15  $\mu$ M de BAP

Figura 3 – Culturas de *Dendrocalamus asper* enviadas pelo laboratório LFDGV-UFSC Florianópolis.



Fonte: A Autora

#### 3.4 INOCULAÇÃO DE EXPLANTES DE *Dendrocalamus asper* COM ISOLADOS BACTERIANOS

Os isolados utilizados no teste de inoculação nos explantes foram escolhidos inicialmente pela quantidade de produção de AIA, teste este que foi realizado anteriormente no estudo de Belincanta (2019). Para o preparo do inóculo, os isolados serão cultivados em dois tubos de ensaio com 20 mL de meio LB líquido cada, colocados para crescer por 24 horas.

Após 30 dias de cultivo as culturas foram inoculadas com 100  $\mu$ L da diluição  $10^{-7}$  das suspensões de cada isolado bacteriano. A inoculação foi feita na região basal das touceiras *in vitro*.

Cada unidade experimental consistiu em tubos contendo 20 mL do meio de cultura básico MS gelificado, com uma touceira do explante. Ao meio de cultura básico MS foi adicionado de dois mL/L de vitaminas de Morel (MOREL; WETMORE, 1951), 30 g/L de sacarose, dois g/L de Phytigel®, como agente geleificante. O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8, antes da autoclavagem (121 °C e 1,3 atm) por 15 minutos. A incubação das culturas foi em sala de crescimento em condições controladas de temperatura (24 °C  $\pm$  2 °C) e fotoperíodo (16h de luz).

Após a inoculação, as culturas de *D. asper* foram observadas até completarem 45 dias da inoculação, totalizando um ciclo de 75 dias para as plantas. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, com dez repetições por tratamento.

### 3.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS ISOLADOS EM EXPLANTES DE *Dendrocalamus asper*

As análises a serem seguidas neste processo foram medidas manuais realizadas com folhas milimetradas e régua de comprimento de raiz, altura do explante, altura de Colmos e Quantidade de Folhas. Cada item deve ser medido com a régua sobre a folha milimetrada e fotografada para registrar.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 34 isolados, oito deles apresentaram resultados positivos quando submetidos ao teste de Fixação Biológica de Nitrogênio, sendo possíveis fixadores de nitrogênio. Do estudo inicial foram escolhidos dois isolados para a realização dos testes de inoculação. Essa escolha se deu em função da produção de AIAe tais isolados não apresentaram resultados positivos no teste de FBN. Quando submetidos ao teste de inoculação os isolados apresentaram diferenças estatísticas quando comparados com a testemunha (meio MS) nos parâmetros comprimento de raiz, altura de calmos e quantidade de folhas, já no parâmetro altura do explante, foram apresentadas diferenças entre os isolados (Ba04 e Ba24) e o Meio LB. Segundo Dobereiner *et al.*(1995), as bactérias possivelmente fixadoras de nitrogênio, quando submetidas ao meio pobre em N, são capazes de captar N da atmosfera. Assim, as bactérias diazotróficas são identificadas por formar um halo, quase imperceptível, no meio chamado de NFB. Essa foi observada quando alguns isolados foram inoculados nesse meio, como se pode observar na Figura 4.

Figura 4 - Teste de Fixação biológica de N em meio NFB



A seta vermelha indica halo na parte superior do meio. Isolados Bac02 e Bac30.

Fonte: A Autora

### 4.1 POTENCIAL DE FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO DOS ISOLADOS *in vitro*

Oito isolados dos 34 pertencentes à coleção foram capazes de formar halo, sendo esses possíveis fixadores nitrogênicos, totalizando 23,5% dos isolados(Tabela 1). Segundo Kuss *et al.* (2006)em trabalho feito com arroz, foram obtidos 58 isolados

edesses dez foram capazes de formar halo, ou seja, 17,5% dos isolados do teste de arroz são possíveis fixadores de nitrogênio.

Tabela 1. Presença de fixadores de Nitrogênio entre isolados bacterianos do bambu *Dendrocalamus asper*

<b>Isolado</b>	<b>Formação de halo</b>
Ba1	+
Ba2	-
Ba3	-
Ba4	-
Ba5	-
Ba6	-
Ba7	-
Ba8	-
Ba9	+
Ba10	+
Ba11	-
Ba12	-
Ba13	-
Ba14	+
Ba15	+
Ba16a	+
Ba16b	-
Ba17	-
Ba18	-
Ba19	-
Ba20	-
Ba21	-
Ba22	-
Ba23	-
Ba24	-
Ba25	+
Ba26	+
Ba27	-
Ba28	-
Ba29	-
Ba30	-
Ba31a	-

Ba31b	-
BAC32	-

+ Presença de halo, -Ausência de halo

Nos estudos de Prado Junior (2009) com cana de açúcar, foram testados 37 isolados e 21% deles formaram halo. Quando comparados com estes resultados, o atual estudo encontra-se na mesma magnitude de resultados, estando de acordo com os demais.

Dos isolados escolhidos por Belincanta (2019), apenas o isolado Ba24 foi mantido, por apresentar maiores quantidades de AIA, porém este não apresentou resultado positivo no presente trabalho para o teste de FBN, assim como o outro isolados escolhido para o teste de inoculação, o que pode ser um indicativo de que estes utilizem outros mecanismos de promoção de crescimento.

#### 4.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS ISOLADOS NAS CULTURAS DE *Dendrocalamus asper*

O início do crescimento bacteriano, na rizosfera dos bambus e superfície do meio de cultura, para os três tratamentos com inóculos bacterianos, foi observado após dez dias da inoculação. Após os dados serem submetidos à análise estatística, foi observado diferenças nos parâmetros analisados entre os tratamentos.

Tabela 3. Resultado das análises estatísticas do teste de inoculação dos isolados bacterianos em culturas *in vitro* de *Dendrocalamus asper*.

TRATAMENTO	Comprimento da raiz (cm)	Comprimento dos colmos (cm)	Quantidade de folhas	Altura dos colmos (cm)
Testemunha	0,464 b	1,046 b	1,127 b	0,812 b
Ba04	0,674 a	2,021 a	2,021 a	0,943 b a
Ba24	0,720 a	2,058 a	2,073 a	1,038 b a
Meio LB	0,726 a	2,415 a	2,335 a	1,089 a
CV (%)	14,05	28,04	25,08	19,30

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de Probabilidade.

Observou-se que diferença estatística para o comprimento das raízes em relação à testemunha e os valores médios foram de 0,464 cm (Tabela 3).

Nos estudos conduzidos por Belincanta (2019), os isolados não obtiveram diferenças estatísticas quando comparadas com a testemunha quanto ao mesmo parâmetro. Entretanto o isolado Ba24 induziu o crescimento de um número maior de raízes, quando em uma diluição menor.

No parâmetro comprimento de colmos também foram obtidas diferença em relação à testemunha e os demais tratamentos. Os isolados Ba04 e Ba24 obtiveram 2,058cm e 2,415cm, respectivamente.

Nos estudos realizados por Khalilet *al.* (2015), onde foram utilizados isolados de *D. eschsholtzii*, descrita como colonizadora de internódios de outra espécie de bambu, *Dendrocalamus hamiltonii* (Bengyella *et al.* 2015), obtiveram-se resultados semelhantes com uma média de 1,986 cm de colmos em explantes.

Já no parâmetro quantidade de folhas apresentou diferença estatística entre a testemunha e os demais tratamentos, onde os isolados apresentaram os valores de 2,074 para Ba04 e de 2,335 para Ba24. Nos parâmetros de folhas e colmos quando utilizando o uso de meio e as bactérias selecionadas pode-se notar também uma redução na oxidação de folhas e colmos, tornando as plantas mais verdes e viçosas por mais tempo.

Segundo Silveira (2018) as quantidades de folhas foram semelhantes nos trabalhos de *Bambusa oldhamii* Munro, apresentando uma média de 2,045 folhas, mas este apresentou oxidação nas folhas e colmos no processo.

No parâmetro altura do explante, os tratamentos em que as bactérias selecionadas (ba4 e ba24) foram inoculadas, não apresentaram diferenças entre si, nem quando comparadas com o meio LB ou a testemunha, a diferença foi apresentada entre o Meio LB e a testemunha, onde apresentaram valores de 0,812 cm e 1,089 cm respectivamente.

Em relação a testemunha todos os tratamentos mostraram-se superiores para os parâmetros avaliados, com destaque ao Meio LB, que apresentou os melhores resultados, principalmente quando falado em altura dos colmos. Tais resultados são extremamente benéficos quando comparados com situações práticas de crescimento como quantidades de folhas para a fotossíntese, tamanho de raiz para absorção de nutrientes, entre outros.

No estudo de Belincanta (2019), no qual o presente estudo se baseou, as bactérias utilizadas mostraram-se produtoras de AIA, a Bac04 apresentou 10,30 ug/MI e a Bac24 apresentou 15,73 ug/MI. AIA, sendo consideradas de média e alta produção respectivamente. As auxinas são substâncias com capacidade de atuar na expansão e no alongamento celular, ajudando também na divisão celular, principalmente no enraizamento (TAIZ; ZEIGER, 2008). O AIA pode acelerar a emissão de raízes e o número e qualidade de raízes formadas, proporcionando a uniformidade no enraizamento (Fachinello *et al.*,1994).A utilização de bactérias que apresentam esses mecanismos pode acelerar a produção de raízes maiores e mais profundas, podendo captar mais nutrientes e água, proporcionando um crescimento maior, mais rápido e mais vigoroso a planta

Bambus são usados como matéria prima para construções civis e na arquitetura, uma vez que seus colmos maduros apresentam alta resistência à compressão, têm bom rendimento e podem substituir outros tipos de madeira (AZZINI; BERALDO, 2001).

Assim como as folhas, os colmos também têm a capacidade de realizar a fotossíntese, pois apresentam clorofila. No entanto, são principalmente nas folhas que ocorre a absorção da energia solar, sendo nestas também localizados os estômatos, estruturas celulares responsáveis pela troca gasosa entre a planta e o meio. Assim, as folhas são as grandes responsáveis pela função de elaborar as substâncias necessárias ao rápido crescimento dessa planta por meio do processo da fotossíntese (TEIXEIRA, 2007).

No conceito de clássico de micropropagação, bactérias presentes nas culturas *in vitro* são consideradas contaminantes, ou seja, as plantas concorreriam com as bactérias, o que as tornariam prejudiciais ao crescimento da planta. Essa perspectiva tem mudado, por meio de diversas publicações que evidenciam a ocorrência desses microrganismos de forma natural, sob condições endolíticas em cultivos *in vitro* (ALMEIDA *et al.*, 2009; DO VALLE, 2019; MUDOI *et al.*, 2013).

## 5 CONCLUSÃO

Dos 34 isolados da coleção de bactérias endofíticas de *Dendrocalamus asper*, apenas oito apresentaram resultados positivos para análises de FBN em meio específico, sugerindo pouca relevância do mecanismo para o estímulo do crescimento dos explante.

Dos 34 isolados dois foram escolhidos para a dos ensaios e destes nenhum apresentou resultado positivo para o teste de FBN. Os mesmos foram escolhidos baseados nos resultados de Belincanta (2019), pela sua produção de AIA (média para Ba04 e alta para Ba24).

Em relação à testemunha todos os tratamentos foram superiores, dando-se destaque ao Meio LB, que apresentou os melhores resultados, principalmente quando falado em altura do explante.

Os isolados selecionados são possíveis promotores de crescimento, incluindo quando apenas inoculado o Meio LB, que promove o crescimento de bactérias e apresentou bons resultados, contribuindo para o desenvolvimento das culturas *in vitro*. Conclui-se também que os demais isolados possuem potencial FBN.

Sugerem-se estudos mais aplicados aos isolados, para comprovar efetivamente o potencial de promoção de crescimento em plantas, bem como o experimento a campo para tal.

## REFERÊNCIAS

- BALDOTTO, L. E. B. *et al.* Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. Viçosa V. 34, n. 2, p. 349-360, 2010.
- BELINCANTA, C. **Bactérias endofíticas associadas à micropropagação de bambu**. Curitiba, f. 86, Dissertação (mestrado em Programa de Pós-Graduação em Ecossistemas Agrícolas e Naturais) - Universidade Federal De Santa Catarina, 2019
- BERNAL, A. *et al.* Priming and biopriming integrated into the sugarcane micropropagation technology by Temporary Immersion Bioreactors (TIBS). **Sugar Tech** v. 10, n. 1, p. 42-47. 2008
- CARMO, L. F. Z. do; AMARAL, E. F. do; BARDALES, N. G. **Ocorrência, biomassa, perdas e exploração de bambu em florestas da Amazônia no Acre, Brasil**. In: DRUMOND, P. M.; WIEDMAN, G. (Org.). *Bambus no Brasil: da biologia à tecnologia*. Rio de Janeiro: Instituto Ciência Hoje, 2017. 655 p. p. 145-160.
- CHEN, Y. P. *et al.* Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Applied soil ecology**, v. 34, n. 1, p. 33-41. 2006
- CHOUDHURI, T. *et al.* Curcumin selectively induces apoptosis in deregulated cyclin D1-expressed cells at G2 phase of cell cycle in a p53-dependent manner. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 20, 2005
- COMPANT, S.; *et al* Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role in colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 669-678, 2010.
- DO VALE, S. M. L. S. *et al.* **Ocorrência, biomassa, perdas e exploração de bambu em florestas da Amazônia no Acre, Brasil**. In: DRUMOND, P. M.; WIEDMAN, G. (Org.). *Bambus no Brasil: da biologia à tecnologia*. Rio de Janeiro: Instituto Ciência Hoje, 2019. 655 p.
- DOS SANTOS, D. W. R. *et al.* Efeitos de um biocida comercial, casugamicina e consistência do meio de cultura no estabelecimento in vitro de bambu, **Pesquisa Agropecuária Tropical** v. 49, p. e55435-e55435, 2019.
- DRUMOND, P. M.; WIEDMAN, G. (Org.). **Bambus no Brasil: da biologia à tecnologia**. Rio de Janeiro: Instituto Ciência Hoje, 2017. 655 p.
- DOBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. 1995. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas nãoleguminosas**. – Brasília: EMBRAPA – SPI: Itaguaí, RJ: EMBRAPA-CNPAB, 60p
- ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 47, n. 1, p. 5-16, 2011

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

FIALHO, E. D. *et al.* **Desenvolvimento da cadeia produtiva do bambu: uma oportunidade para empreender**. In: XI Seminário Ibero-Latinoamericano de Gestão Tecnológica, Salvador, Bahia, p.1-10, 2005.

FILGUEIRAS, T. S., GONÇALVES, A. S. A checklist of the basal grasses and bamboos in Brazil (Poaceae). **The journal of the American Bamboo Society**, v.18, n. 1, p. 7-18, 2004.

GILLIS, K.; *et al.* Somatic embryogenesis from mature *Bambusa balcooa* Roxburgh as basis for mass production of elite forestry bamboos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.91, p.115-123, novembro, 2007.

GUERRA, *et al.* **Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas**. 1999. In: TORRES, A.C., CALDAS, L.S., BUSO, J.A. (eds.). *Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas*, v. 2, Embrapa, Brasília, p.533-568. 1999.

GRECO, T. M. *et al.* **Diversidade de bambus (Poaceae: Bambusoideae) na Ilha de Santa Catarina** In: **Simpósio Florestal Catarinense**, 12, 2016. Lages, SC. Anais. 601p. Brasil. 2016.

HALLMANN J., *et al.* Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43 p. 895-914. 1997.

JUDZIEWICZ, *et al.* **American bamboos**. Washington, D.C, 1999. 392p.

Khalil, A. M. A, H. M. *et al.* **Daldinia: The nature of its concentric zones**. **Mycoscience** v. 56 p. 542-548. 2015.

KELCHNER, S. A., *et al.* **Higher level phylogenetic relationships within the bamboos (Poaceae: Bambusoideae) based on five plastid markers**. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 67, n. 2, p. 404–413. 2013

KIGOMO, B. **Guidelines for growing bamboo**. Guideline, Series: n.4. Kenya Forestry Research Institute – Kefri; Nairobi, Kenya. 2007.

KUSS A.V., *et al.* Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42 p. 1459-1465. 2006

MOSHYNETS, O.V.; *et al.* Identification of endophytic bacteria in *Phyllostachys* sp. and *Fargesia* sp. **Bamboo Science and Culture: The Journal of the American Bamboo Society**, v. 25, n. 1, p. 19-26, 2012.

- MOREL, G.; WETMORE, R. H. Tissue culture of monocotyledons. **American Journal of Botany**, v. 38 p. 138-140. 1951
- MUDOI, K. D.; *et al* Micropropagation of important bamboos: a review. **African Journal of Biotechnology**, v.12, n.20, p. 2770-2785, 2013.
- NADHA, H.K.; *et al*. Identification and elimination of bacterial contamination during in vitro propagation of *Guadua angustifolia* Kunth. **Pharmacognosy Magazine**, v. 8, n. 30, p. 93-97, 2012.
- NOWAK, J.; PRUSKI, K. **Priming tissue cultured propagules***In*: Low cost options for tissue culture technology in developing countries, IAEA, Internacional Atomic Energy Agency, Austria, Vienna. p. 69. 2004
- OLIVEIRA, A. L. M. *et al*. Processos e mecanismos envolvidos na influência de Microrganismos sobre o crescimento vegetal. **Embrapa Agrobiologia-Documentos (INFOTECA-E)**, 2003.
- ORNELLAS, T. S.*et al*. Micropropagação de *Guadua chacoensis* (Rojas) Londoño & PM Peterson. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 49, 2019.
- PEIXOTO, Paulo Henrique Pereira. **Propagação das plantas: Princípios e práticas**. Juiz de Fora: Universidade Federal de Juiz de Fora, 2017.
- RAMANAYAKE, S. M. S. *et al* In vitro shoot proliferation and enhancement of rooting for the large-scale propagation of yellow bamboo (*Bambusa vulgaris* ‘Striata’). **Scientia Horticulturae**, v. 110, n. 1, p. 109-113. 2006
- SÁNCHEZ, N. L., *et al*. Propagación vegetativa de tres especies de Bambú. Ra Ximhai: **Revista científica de sociedad, cultura y desarrollo sostenible**, v.7, p. 205-218. 2011
- SANTOS, C. S. *et al*. Solubilização de fosfatos inorgânicos por bactérias endofíticas isoladas de maracujá amarelo *Passiflora edulis*. **Revista Craibeiras de Agroecologia**, v. 1, n. 1, p. 23 – 29. 2018.
- SILVA, M.B.; RONDON, J.N. Utilização De Fungo De Bambu Na Borremediação De Solo Contaminado. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 10, n. 10, p. 2175–2184. 2013
- SILVEIRA, A. A. C. **Micropropagação de *Bambusa oldhamii* Munro e biocaracterização de fungos endofíticos multifuncionais**. 74 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2018.
- SORENG, R. J., *et al*. A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae). **Journal of Systematics and Evolution**, v.53, p.117-137. 2015.
- SOUSA, I. M. *et al*. **Bactérias promotoras do crescimento radicular em plântulas de cultivares de arroz irrigado por inundação**. Congresso Brasileiro de arroz

**irrigado.** Balneário Camboriú, SC. Inovação e desenvolvimento na orizicultura: anais eletrônicos. Itajaí: Epagri: Sosbai, 2019.

TEIXEIRA M.A., *et al* Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etno variedades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42. P. 43-49. 2007