

RESUMO

RESUMO- A micropropagação vegetal representa uma técnica alternativa para a conservação de espécies de plantas, como método bioinovador proporciona a produção de mudas com segurança fitossanitária. Este trabalho tem como objetivo mapear o estado biotecnológico relacionado a micropropagação no panorama brasileiro e demonstrar com o experimento desenvolvido em casa de vegetação a fase mais apropriada para a inoculação de rizobactérias em microplantas de sempre-viva de Mucugê. Nos estudos conduzidos em casa de vegetação, a fase de enraizamento demonstrou ser o melhor momento para aplicação de *Bacillus* sp., na espécie, com destaque para os isolados IB4 e IB6. A inoculação de rizobactérias benéficas representa uma importante etapa bioinovadora a ser incorporada ao processo produtivo destas mudas no sentido de direcionar novos rumos para a geração de patentes em conjunto com cooperativas de preservação estabelecidas nas comunidades.

Palavras-chave: *Bacillus* sp.; Bioinovação; Bioprospecção; Micropropagação; Sempre-viva.

1 INTRODUÇÃO

Comanthera mucugensis Giul. subsp. *mucugensis*, é uma planta ornamental da família Ericaulaceae, popularmente conhecida como sempre-viva de Mucugê por ser endêmica do município de Mucugê na Chapada Diamantina na Bahia, destacando-se como a sempre viva que apresenta maior valor comercial (GIULIETTI *et al.*, 1996; CERQUEIRA *et al.*, 2008). Pesquisas relacionadas a propagação e conservação desta espécie estão relacionadas a sua ameaça de extinção, condição que esteve atrelada à excessiva exploração das comunidades locais por sua importância para o comércio de flores secas ornamentais. A micropropagação representa uma técnica alternativa ao sistema convencional de propagação de espécies nativas e para a conservação de espécies de plantas em perigo de extinção, como as sempre-viva de Mucugê (DONINI *et al.*, 2008; BHATIA *et al.*, 2015; LIMA-BRITO *et al.*, 2016).

A divulgação sobre a bioinovação neste campo de atuação favorece o avanço para que a pesquisa básica possa alcançar status de desenvolvimento tecnológico para aplicações de produtos ou processos bioinovadores. Estudos de prospecção tecnológica atuam de forma sistemática no mapeamento do desenvolvimento tecnológico e buscam agregar valor ao conhecimento na identificação de rumos e oportunidades futuras.

O procedimento da micropropagação realizado em condições assépticas, produz mudas com qualidade genética e fitossanitário, em grande quantidade e em tempo reduzido (Read e Preece, 2014; Carvalho *et al.*, 2016). Contudo, o processo de micropropagação, priva o explante de sua microflora natural e benéfica ao crescimento vegetal (HAZARIKA, 2006), o que torna a muda mais vulnerável ao ataque de patógenos e a condições de estresse ambiental quando estabelecidas no campo.

A aclimatização, fase em que as microplantas de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* são introduzidas no ambiente, pode representar para esta, assim como para algumas espécies condição de estresse favorecendo baixas taxas de crescimento e mortalidade das mudas micropropagadas quando transferidas para condição *ex vitro* (BHATIA *et al.*, 2015). De modo geral, são escassos os trabalhos realizados com cultivo *in vitro* que relatam sobre as dificuldades e possíveis soluções para o processo de aclimatação em mudas de plantas ornamentais.

O tratamento de mudas com estes microrganismos pode resultar em efeito estimulador no crescimento, especialmente na fase de germinação das sementes, e produtividade das plantas (CARDOSO E ANDREOTE, 2016; SILVA *et al.*, 2016). Desta forma, aplicação de Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (RPCPs) produtoras de ácido indol-ácetico (AIA) em mudas micropropagadas pode favorecer modificações no sistema radicular das plantas, como alongamento e aumento de raízes laterais que melhoram a eficiência do processo de absorção de água e nutrientes pela planta hospedeira (BORACIN *et al.*, 2016; LARRABURU *et al.*, 2010).

Neste sentido a biotecnologia vegetal tem contribuído para o desenvolvimento de tecnologias voltados para a produção sustentável, como a introdução de inoculantes biológicos a base de rizobactérias multifuncionais também conhecidas como rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs), um grupo de microrganismos bioestimulantes capazes de colonizar a rizosfera, pode

melhorar a saúde do vegetal sem causar contaminação ambiental (CALVO *et al.*, 2014, KUMAR *et al.*, 2019, BASU *et al.*, 2021).

Pesquisas envolvendo a inoculação de microrganismos em plantas ornamentais cultivadas *in vitro* têm recebido atenção como uma forma de proporcionar melhorias no processo de produção destas mudas na fase de multiplicação e aclimatização (MATOSO *et al.*, 2017; BORACIN *et al.*, 2016; CARDOSO, 2010; JUNIOR, 2009). O mecanismo de ação referente a estes isolados reside na capacidade de sintetizar o AIA durante a colonização radicular e consequente aumentar a absorção de nutrientes que influenciam a fisiologia da planta, além de proporcionar maior proteção contra estresse bióticos e abióticos quando no campo (CALVO *et al.*, 2014).

Considerando o exposto, este trabalho teve o objetivo realizar o levantamento sobre patentes bioinovadoras no campo da micropropagação de plantas e verificar o desempenho da inoculação de RPCPs (IB4, IB5, IB6) em mudas micropropagadas de sempre-viva de Mucugê não enraizadas e enraizadas e o potencial da microbiolização para promoção do crescimento destas mudas.

2 METODOLOGIA

2.1 Bioprospecção

Para a pesquisa prospectiva foi realizado o recorte temporal 1996 a 2021, na base de dados nacional do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI). Para a coleta foi utilizada como descritor a palavra-chave “micropropagação”, “micropropagada”, para a base de dados do INPI. Os dados obtidos foram analisados priorizando a identificação da quantidade de documentos de patentes depositadas, status legal, código de classificação IPC. Os resultados foram analisados de forma descritiva simples e tabulados para discussão das possibilidades tecnológicas apresentadas pela pesquisa.

2.2 Isolados de rizobactérias

Três isolados de rizobactérias do gênero *Bacillus* (IB4, IB5 e IB6) que fazem parte da coleção de microrganismos da Embrapa Mandioca e Fruticultura- Cruz das Almas/ BA, selecionados de amostras coletadas da rizosfera de plantas saudáveis de bananeira (*Musa sp.*) cultivar Prata Comum foram utilizados nos experimentos (tabela 1). Estes isolados do gênero *Bacillus* selecionados como produtores de ácido indolacético (AIA) apresentam por meio da técnica de RAPD padrão divergências genéticas entre si (CARDOSO *et al.*, 2010).

Além disso, não apresentam capacidade de inibir o crescimento recíproco, possibilitando a formação de combinados sem qualquer restrição (CARDOSO, 2010). Os isolados foram reativados em meio TS (15 g de Triptona, 5g de Peptona, 5g de NaCl em 1L de água destilada), e incubados por 24 h a 28 °C. Posteriormente, uma alíquota de 1,0 mL foi retirada, para cada rizobactéria e semeada em placas de Petri contendo meio TSA e com auxílio da alça de Drigalsky procedeu-se o espalhamento. As culturas foram incubadas em BOD por 24 h a 28 °C.

2.3 Preparo da suspensão de rizobactérias

Para a obtenção da suspensão, os isolados foram multiplicados em meio líquido TS (15 g de Triptona, 5g de Peptona, 5g de NaCl em 1L de água destilada), e incubados por 24 h a 28 °C. Posteriormente, uma alíquota de 1,0 mL foi retirada, para cada rizobactéria e semeada em placas de Petri contendo meio TSA e com auxílio da alça de Drigalsky procedeu-se ao espalhamento. As culturas foram incubadas em BOD por 24 h a 28 °C, e decorrido este intervalo as colônias foram ressuspensas em água destilada e esterilizada. A concentração de cada suspensão foi ajustada em espectrofotômetro para OD540 = 0,5, o que correspondia a 10⁹ UFC. mL⁻¹ (CARDOSO, 2010).

Tabela 1- Isolados bacterianos utilizados nos experimentos. Origem, tipo de bactéria e valores médios de AIA produzidos por cada isolado

Isolado	Origem	Tipo de Bactéria	AIA (µg mL ⁻¹)
IB4	Solo Rizosférico	Rizobactéria	9,76
IB5	Solo Rizosférico	Rizobactéria	8,65
IB6	Solo Rizosférico	Rizobactéria	7,21

Fonte: Pedido Patente BR 10 2013 0281565

Microplantas de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* não enraizadas inoculadas com *Bacillus* sp. (IB4, IB5, IB6)

As microplantas de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* utilizadas neste trabalho foram disponibilizadas pelo laboratório de cultura de tecidos vegetais (LCTV/UEFS). A inoculação das rizobactérias foi realizada em microplantas não enraizadas, por imersão em 60 mL de suspensão aquosa de células a 10⁹ UFC. mL⁻¹ por 5 minutos. Três isolados de rizobactérias compunham o experimento com quatro tratamentos: T1 (IB4), T2 (IB5) T3 (IB6), TC (controle) com dez repetições por tratamento.

Após este período, os explantes foram plantados em vasos plásticos contendo 250g de substrato composto de solo+areia esterilizado (1:1) e cobertos com garrafas “PET” de 2L, as quais foram destampadas aos 15 dias (Lima-Brito et al., 2016). A irrigação foi feita diariamente e a porcentagem de sobrevivência das plantas foi determinada aos 15 e 30 dias após a transferência para a condição *ex vitro*. Ao final de cada período, estabeleceu-se a contagem de microplantas sobreviventes. Após a aquisição dos dados os mesmos foram tabulados, analisados e gerada uma tabela.

Microplantas de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* enraizadas inoculadas com *Bacillus* sp. (IB4, IB5, IB6)

A inoculação das rizobactérias foi realizada na fase de aclimatização, por imersão das raízes em suspensão aquosa (60 mL) 10⁹ UFC. mL⁻¹ durante 5 minutos. Três isolados de rizobactérias compunham o experimento com cinco tratamentos: T1 (IB4), T2 (IB5), T3 (IB6), T4 (IB4, IB5, IB6) e TC (controle). As microplantas já enraizadas foram a seguir transferidos para vasos plásticos contendo

250g de substrato composto de solo+areia esterilizado na proporção 1:1, com dez repetições por tratamento e cobertos com garrafas “PET” de 2L, as quais foram destampadas aos 15 dias e retiradas aos 30 dias após a transferência segundo metodologia de Lima-Brito et al., (2016), sendo a irrigação realizada diariamente.

Decorridos 30 dias as mudas foram pesadas em balança analítica para avaliar a massa fresca da planta e o número de folhas verdes. Em seguida, colocadas em sacos de papel e encaminhadas para a estufa a 72 °C até a obtenção de massa constante da parte aérea e do sistema radicular, sendo realizada a pesagem do material em balança analítica. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SASM-Agri (Sistema para Análise e Separação de Médias em experimentos Agrícolas), seguido da comparação entre tratamentos pelo Teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade (CANTERI et al., 2001).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados apresentados pelo INPI demonstram a existência de 29 depósitos de patentes referentes ao método de micropropagação (tabela 2). A primeira patente foi depositada no ano de 1996 e reconhecido aumento gradativo até o ano de 2021. Esses dados demonstram que os depositantes apresentaram interesse em ter o produto ou processo protegido no território brasileiro. Estes depositantes variam entre indivíduos, empresas, Instituições de ensino superior nacional e estrangeira.

Com relação ao status legal do documento de patente depositada, tem-se 9 patentes concedidas, 7 patentes publicadas, 8 patentes indeferidas, 5 patentes arquivadas. As patentes publicadas estão na fase de aguardar resultado da análise, as patentes indeferidas enquadram-se por fatores já relatados por Santos (2021) como reivindicações não fundamentadas e pedidos de patentes que não obedecem ao conceito inventivo de patente. Enquanto que as patentes arquivadas por definitivo, seu objeto passa a ser de domínio público de acordo com o parágrafo único do artigo 78 da Lei 9.279 de 14 de maio de 1996 (BRASIL, 1996).

Estes dados demonstram a relevância do acesso ao conhecimento por parte de pesquisadores sobre as temáticas relativas à Inovação e Propriedade Industrial para o avanço das pesquisas em tecnologia. A classificação Internacional de Patentes (CIP) varia entre as seções A e C, com destaque para A01H que trata de processos para obtenção de novas plantas ou reprodução das plantas por tecido e técnicas de cultura e C12N que se refere aos meios de cultura para plantas.

Faz-se necessário relatar, que entre as patentes em micropropagação concedidas no Brasil apenas uma patente concedida trata de obtenção de produto inoculante (bactérias endofíticas e rizobactérias) e processo de microbiolização (inoculação) em mudas micropropagadas de bananeira (Silva *et al.*, 2023).

Tabela 2: Documento de patentes depositadas com a palavra-chave micropropagação/ micropropagadas no INPI

Patente	Ano de depósito	Status	CIP
PI 9612217-0	1996	Indeferida	C12N 5/02
PP 1101128-9	1997	Concedida	C12N 1/21
PI 9804069-3	1998	Arquivada	A01H/4/00
PI 0005185-3 A2	2000	Ativa	C12N 3/02
PI 0009112-0	2000	Indeferida	A01H 5/00
PI 0104400-1	2001	Arquivada	A01H 4/00
PI 0403642-5	2004	Concedida	A01H 4/00
MU 8500951-2	2005	Ativa	A01G 31/02
MU 8501923-2	2005	Arquivada	A01G 9/029
MU 8602201-6	2006	Concedida	A01G 9/29
PI 0721649-1	2007	Concedida	A01H 4/00
PI 0703625-6	2007	Arquivada	A01H 5/04
PI 0801454-0	2008	Indeferida	C12M 3/02
PI 1002900-1	2010	Indeferida	A01H 4/00
BR 11 2012 017385 5	2011	Indeferida	A01H 4/00
BR 11 2012 020450 5	2011	Arquivada	C12N 5/00
PI 1101326-5	2011	Indeferida	A01H 4/00
BR 20 2012 009158 0	2012	Ativa	A01G 7/04
BR 20 2012 026715 8	2012	Concedida	A01C 7/00
BR 10 2013 007727 5	2013	Concedida	A01H 4/00
BR 10 2013 028156 5	2012	Concedida	A01H 3/00
BR 11 2016 009894 3	2014	Concedida	A01H 4/00
BR 11 2016 024449 4	2015	Indeferida	A01H 4/00
BR 20 2017 008054 0	2017	Arquivada	A01G 31/00
BR 10 2019 010581 0	2019	Ativa	A61K 36/48
BR 10 2020 001563 0	2020	Concedida	A01G 24/22
BR 20 2020 005513 0	2020	Ativa	A01G 9/02
BR 10 2021 007975 4	2021	Ativa	A01C 1/06
BR 11 2023 006959 9	2021	Ativa	A01H 4/00

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

3.1 Experimento: Sobrevivência das microplantas de sempre-viva de Mucugê não enraizadas inoculadas com *Bacillus* sp.

Ao inocular as microplantas de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* não enraizadas com as rizobactérias *Bacillus* sp. produtoras de ácido indolacético, observou-se um grande número de mudas mortas (tabela 2). As microplantas de sempre-viva de Mucugê não enraizadas foram inoculadas

com os isolados (IB4, IB5, IB6) individualizados, não sendo possível, contudo verificar a promoção do crescimento das plântulas devido à baixa taxa de sobrevivência tanto em microplantas tratadas com as rizobactérias como no tratamento controle (30%) e para as microplantas inoculadas com os isolados IB5 e IB6 (30%). A aplicação do isolado IB4 apresentou a maior porcentagem de sobrevivência entre os isolados testados neste experimento (40%).

Neste contexto, a inoculação em microplantas de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*, com espécies de *Bacillus* sp. sintetizadores de AIA, em diferentes fases do enraizamento, representa uma tentativa de restabelecer a relação benéfica que ocorre entre plantas e micro-organismos, auxiliando o estabelecimento e sobrevivência da microplanta durante a etapa de aclimatização e posterior desenvolvimento das plantas.

A fase de cultivo em que as microplantas de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*, estão ainda desenvolvendo seu sistema radicular (não enraizadas), apresentam-se como extremamente sensíveis a quaisquer variações do ambiente, desta forma a transferência do meio de cultivo *in vitro* para vaso com substrato, ou seja a transferência para a aclimatização, possivelmente provocou estresse ao vegetal, devido ao déficit hídrico por transferência para condição *ex vitro*, já que as estas microplantas possuem estômatos poucos funcionais (HAZARIKA, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Estes elementos presentes nesta fase de desenvolvimento podem ter conduzido a não sobrevivência da maioria das mudas de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*. Entre as etapas de produção de mudas micropropagadas, a aclimatização apresenta-se para algumas espécies como uma fase muito delicada, pois, nesta as microplantas são retiradas dos frascos com meio nutritivo *in vitro* e são transferidas para recipientes (vasos ou tubetes) com substrato ou solo (HAZARIKA, 2006), essa mudança de ambiente em muitos casos altera todo processo metabólico do vegetal conduzindo a baixas taxas de sobrevivência a depender da espécie.

Durante a aclimatização as plantas devem controlar a transpiração e aumentar a taxa fotossintética, fatores que auxiliam a suportar o estresse de transferência para o solo (JUNGHANS; SOUZA, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Além desses fatores, um sistema radicular desenvolvido é de grande importância para a sua sobrevivência e crescimento, tanto na etapa em que as plantas são aclimatizadas, como no transplante para o campo.

Tabela 2- Sobrevivência das microplantas não-enraizadas de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* inoculadas com isolados de *Bacillus* sp.

Tratamentos	Início	15 dias	30 dias
TC	100%	50%	30%
T1-IB4	100%	70%	40%
T2-IB5	100%	70%	30%
T3-IB6	100%	60%	30%

Fonte: Elaborado pela autora, 2023.

Analisando os resultados apresentados na tabela 2 para as microplantas de sempre-viva de Mucugê, pode-se inferir que possuir raízes pouco desenvolvidas em tamanho e número associadas às características fisiológicas já relatadas acima como, déficit hídrico, estômatos pouco funcionais e alteração metabólica possivelmente representaram as principais causas que resultaram altas taxas de mortalidade quando estas microplantas foram aclimatizadas. A transferência do ambiente *in vitro* para o ambiente *ex vitro* requer modificações nestas microplantas na tentativa de reduzir o estresse causado pelas diferenças entre as condições ambientais como relatado por Jagadeesh *et al.* (2006).

Além dos fatores fisiológicos, a aplicação de *Bacillus* sp. IB4, IB5, IB6 nas microplantas de sempre-viva de Mucugê deve ser considerada. Primeiro, havendo estabelecimento dos isolados a alta mortalidade pode ter sido influenciada pela quantidade de AIA produzido por cada isolado individual, que em quantidades elevadas, no caso das microplantas não enraizadas, pode ter provocado efeito deletério, inibindo o crescimento do sistema radicular, já que isolados individuais podem flutuar de promotores em baixas concentrações do AIA até inibidores de crescimento conforme as condições ambientais e genótipo do hospedeiro (Lambrecht *et al.*, 2000; Nehl *et al.*, 1996). Pode-se inferir, portanto, que a quantidade do AIA produzido pelos isolados selecionados, adicionado aos fatores fisiológicos característicos da fase, pode ter contribuído para a morte dos explantes tratados com essas rizobactérias. Os tecidos radiculares são sensíveis a flutuações da concentração de AIA e o alongamento do sistema radicular pode ser afetado pela quantidade deste regulador de crescimento (JAGADEESH *et al.*, 2006).

Na segunda questão, já que as microplantas de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis*, não enraizadas apresentam poucas, pequenas e sensíveis raízes, tais características podem ter também interferido no estabelecimento das rizobactérias, ou seja, a quantidade dos exsudatos radiculares disponibilizados nesta fase pelas microplantas não seriam suficientes para manter a colonização na rizosfera das microplantas. Os exsudatos disponibilizados em quantidade e qualidade variada podem selecionar grupos funcionais específicos de RPCPs (MOREIRA, 2006). Desta forma, as raízes não sendo colonizadas pelos isolados de *Bacillus* sp. produtores de AIA tornou inviável a eficiência do mecanismo de ação que poderia atuar na indução do enraizamento radicular conduzindo a alta mortalidade das microplantas que foi inevitável.

O ajuste da suspensão bacteriana em 10^9 ufc mL⁻¹, deve ser outra condição estabelecida no experimento a se considerar quando analisamos os resultados, já que não foram realizados estudos preliminares quanto à concentração ótima da suspensão para cada rizobactéria individualmente, antes de ser introduzida por inoculação nas microplantas não enraizadas, considerando que cada isolado apresenta valores médios diferentes para produção de AIA. Este estudo se faz necessário, pois a literatura apresenta resultados positivos para promoção de crescimento utilizando rizobactérias em mudas cultivadas *in vitro* na concentração de 10^6 e 10^8 UFC/mL-1 (BORACIN *et al.* 2016; LARRABURU *et al.*, 2010; MAFIA *et al.*, 2009).

Ainda neste mesmo contexto, as condições químicas e físicas do solo utilizados no experimento podem ter prejudicado o estabelecimento das rizobactérias, pois a ausência de nutrientes surge como fator negativo à multiplicação e atividade das rizobactérias. A transferência para um solo pobre nutricionalmente, pode também ter influenciado de forma negativa a atividade destes isolados.

Inconsistentes performances por micro-organismos têm sido atribuídas a fatores abióticos como composição física e química do solo (presença ou ausência de alguns nutrientes no solo) que como consequência podem afetar no estabelecimento e atividade da RPCPs na rizosfera (CARDOSO; ANDREOTE, 2016)

Desta forma, considerando a fase de produção das microplantas não enraizadas, os resultados verificam que a inoculação individual de *Bacillus* sp. produtores de AIA, não atribui este como o melhor momento para aplicação dos isolados, pois o desenvolvimento do sistema radicular apresentase como essencial para a posterior transferência para a fase de aclimatização das mudas. Assim sendo, os próximos experimentos serão conduzidos com microplantas já enraizadas.

3.2 Promoção do crescimento da inoculação em microplantas de sempre-viva de Mucugê enraizadas inoculadas com *Bacillus* sp.

A análise da promoção de crescimento (massa fresca da planta, massa seca da parte aérea e do sistema radicular e número de folhas) para a fase de aclimatização para microplantas enraizadas indica que a aplicação individualizada de *Bacillus* sp. produtores de ácido indolacético nos tratamentos T1 (IB4) e T3 (IB6) apresentaram diferença significativa no crescimento das microplantas quando comparado ao tratamento controle.

O tratamento T1, inoculado com o isolado IB4 apresentou aumento de 72,2% para massa fresca da planta, 62,7% massa seca da parte aérea, 260% na massa seca do sistema radicular e 48,9% para o número de folhas verdes, enquanto que o tratamento T3, inoculado com o isolado IB6 observouse aumento de 75% na massa fresca da planta, 88,3% massa seca da parte aérea, 320% na massa seca do sistema radicular e 70,8% para o número de folhas verdes, quando comparados ao tratamento controle (tabela 3).

Enquanto que no tratamento T4 a combinação entre os isolados de *Bacillus* sp. (IB4, IB5, IB6) apresentou para variáveis analisadas médias abaixo do controle (tabela 3). Apresentando assim valores negativos, diminuindo as médias para massa fresca e massa seca da parte aérea, massa seca do sistema radicular e número de folhas verdes respectivamente em 19,4%, 13,9%, 20% e 6,77% quando confrontando o tratamento controle.

Tabela 3- Crescimento em microplantas de sempre-viva de Mucugê inoculadas com *Bacillus* sp. Valores médios para massa fresca (MF), massa seca do sistema radicular (MSSR), massa seca da parte aérea e número de folhas verdes (NFV)

Tratamentos	MF(g)	MSSR(g)	MSPA(g)	NFV
TC	0,36±0,11bc	0,005±0,002bc	0,043±0,009b	9,2±1,87cd
T1	0,62±0,09a	0,018±0,002a	0,070±0,004a	28,6±1,83b
T2	0,42±0,11b	0,008±0,002b	0,047±0,010b	21,3±1,94c
T3	21,3±1,94c	0,021±0,002a	0,081±0,006a	32,8±1,81a
T4	0,29±0,08c	0,004±0,002c	0,037±0,011b	17,9±2,07d
C.V.%	21,2	20,5	15,6	7,9

Valores médios estatisticamente significativos diferem nas letras, de acordo com o teste de Tukey a 5%. Plantas tratadas por imersão por 5 minutos com suspensão de 109 UFC/mL-1. Os dados foram analisados 30 dias após a inoculação.

Fonte: Elaborado pela autora, 2023

De forma geral, o tratamento de mudas micropropagadas com rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs) pode resultar em benefícios as culturas (Oliveira et al., 2014). Estudos introduzindo micro-organismos previamente selecionados, que possam ser incorporados ao processo de produção têm sido realizados para melhorar a eficiência em mudas de plantas ornamentais cultivadas *in vitro* como Rosaceae (LARRABURU et al., 2010), *Handroanthus ochraceus* (Llorente et al., 2016) e *H. impetiginosus* (LARRABURU E LLORENTE, 2015).

As espécies de RPCPs mais utilizadas como inoculantes biológicos pertencem principalmente aos gêneros *Pseudomonas* e *Azospirillum* e, na maioria dos casos, um relevante efeito da inoculação com PGPR é um aumento no número de flores por planta (Ruzzi e Aroca, 2015). No entanto, espécies do gênero *Bacillus* têm demonstrado eficiência significativa quando inoculadas em mudas micropropagadas de Orquidaceae (JUNIOR, 2009) e *Zingiber spectabile* (OLIVEIRA et al., 2010).

Desta forma, desenvolver tecnologias adicionais para a produção de mudas cultivadas *in vitro* em escala comercial que assegurem benefícios para as plantas especialmente na fase de aclimatização, representa mais uma estratégia economicamente viável para a biotecnologia vegetal. A inoculação de mudas cultivadas *in vitro* com micro-organismos benéficos ao crescimento de plantas, durante o processo de cultivo representa a introdução de mais uma etapa que pode contribuir de forma significativa para o processo de produção de mudas mais vigorosas e saudáveis.

Além do método de inoculação dos isolados por aplicações no substrato e por imersão em sementes em espécies vegetais, a imersão das raízes da planta em suspensão possivelmente favorece a colonização radicular observados pelos resultados apresentados. Utilizando o método de imersão em que as raízes entram em contato com a suspensão de rizobactéria 37, inoculou-se *Bacillus cereus*, em raízes de mudas de *Brassica oleracea* L., var. *italica* em suspensão ajustada na concentração de 10⁸ CFU/mL em água estéril por 60 min antes do transplante resultando no incremento do crescimento.

Do mesmo modo, a aplicação de RPCPs em plantas ornamentais produzidas *in vitro* a exemplo, *Zingiber spectabile* conhecida como gengibre ornamental inoculadas com *Bacillus pumilus*, sendo o sistema radicular imerso em 10 mL da suspensão bacteriana correspondente a 10⁸ UFC mL⁻¹, por aproximadamente 10 minutos, sendo a suspensão restante vertida no colo das plântulas de acordo com o tratamento, a análise dos resultados verificou aumento significativo na produção de massa fresca e seca destas mudas (Oliveira et al., 2010). Mudas micropropagadas ornamentais de *Handroanthus ochraceus* (ipê amarelo) produzidas em meio de cultivo ½WPM isento de auxina quando inoculados com *Azospirillum brasilense* RPCPs já descrita por produzir AIA, resultou no incremento de 55% do enraizamento, aumentando também a massa fresca e seca da raiz em 45% e 77%, respectivamente Llorente et al., (2016). Espécies de *Bacillus* sp. EndW48 e *Enterobacter* sp. EndW37 favoreceram maior porcentagem para promoção do crescimento e sobrevivência *ex vitro*, após aclimatização em casa de vegetação por 90 dias quando plântulas de *Cattleya walkeriana* (orquídea) foram inoculadas por meio da imersão do sistema radicular durante 30 minutos e infestação do substrato com 10 mL do inóculo (JUNIOR, 2009).

Linhagens de *Azospirillum brasilense* Cd e Sp7, sintetizadores de AIA foram utilizadas, em combinação verificando a indução do enraizamento no início do brotamento de (*Photinia X fraseri* Dress) *Photinia* planta com alto valor ornamental, além de aumentar a massa fresca da parte aérea e massa fresca da raiz das plantas (Larraburu *et al.*, 2007). Resultados semelhantes com as mesmas estirpes de *A. brasilense* foram observados na propagação de *Handroanthus impetiginosus* (Larraburu e Llorente, 2015). Estes autores apresentam evidências de que a inoculação com rizobactérias produtoras de AIA em plantas cultivadas *in vitro* podem auxiliá-las durante o crescimento na transferência para a condição *ex vitro*.

Os resultados obtidos neste experimento com a inoculação dos três isolados de *Bacillus* sp. (IB4, IB5, IB6) em microplantas de sempre-viva de Mucugê pode ser devido à interação bem sucedida das rizobactérias no estágio de desenvolvimento da microplanta utilizada para a aplicação. O efeito do AIA não depende apenas da quantidade produzida pela bactéria variando de acordo com o genótipo e a idade da planta, que influencia no nível endógeno da substância na planta (Teixeira *et al.*, 2007). Assim como, outros mecanismos mesmo não sendo testados nestes isolados de *Bacillus* sp. podem estar relacionados como a produção de EPS (Almeida, 2015) e a capacidade de captar nutrientes do solo (TURAN *et al.*, 2014).

Estes dados confirmam a não especificidade entre espécie vegetal e espécie de RPCPs, pois os isolados de *Bacillus* sp. utilizados na condução deste ensaio foram selecionados de plantas sadias de *Musa* sp. como descrito na metodologia. A inoculação com o isolado IB5 no tratamento T2 apesar de apresentar médias acima do tratamento controle não diferiu significativamente de TC quando analisadas as variáveis propostas, além de apresentar médias abaixo dos tratamentos com os isolados IB4 e IB6 (tabela 3). Pode-se inferir, portanto, que na colonização do sistema radicular a quantidade e composição dos exsudatos liberados pela microplanta, interferiu na competência rizosférica deste isolado. Segundo Moreira e Siqueira (2006), compostos disponibilizados pela planta em quantidade variada podem selecionar espécies de rizobactérias específicas.

A elevada quantidade do AIA disponibilizada pelo consórcio (IB4, IB5, IB6) em T4, pode ter prejudicado o crescimento da microplanta cultivadas *in vitro*, portanto, com sistema radicular sensível, o que pode ter inibido o crescimento das raízes e levado a morte de alguns destes indivíduos, como explica Nehl *et al.* (1996). Na fase de aclimatização, as microplantas com sistema radicular mais desenvolvido conseguem estabelecer-se no substrato com mais eficiência, proporcionando melhores resultados frente a inoculação com as rizobactérias produtoras de ácido indolacético (AIA) de *Bacillus* sp.

Os resultados deste experimento demonstram que para microplantas enraizadas tratadas com *Bacillus* sp. a promoção do crescimento possivelmente não dependeu apenas da quantidade de AIA produzido pela rizobactéria inoculada, mas também da fase de desenvolvimento da muda já que a liberação de exsudatos pela planta varia de acordo com o crescimento do vegetal. A comunidade microbiana na rizosfera de plantas pode ser afetada pela composição dos exsudatos liberados de acordo inclusive com o estágio de desenvolvimento da planta (AUNTOUN E PRÉVOST, 2005).

Neste ensaio com mudas de sempre-viva de Mucugê enraizadas os resultados validam que os

isolados de *Bacillus* sp. IB4, IB5, IB6 apresentaram rizocompetência para estabelecer-se na rizosfera após a inoculação por imersão das raízes das microplantas em suspensão tanto com isolados individuais e em combinação.

4 CONCLUSÃO

O cenário nacional fundamenta a elaboração de novas diretrizes relativas à Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (PDI) no Brasil sobre a temática da micropropagação de plantas e portanto, revela que faz-se primordial direcionamentos para a geração de pesquisas com foco na bioinovação para geração de patentes que possam ser desenvolvidas com o envolvimento de cooperativas e associações de agricultores familiares por incentivo de políticas públicas.

A inoculação com *Bacillus* sp. (IB4, IB5, IB6) em microplantas de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* não enraizadas não mostrou-se eficiente, devido a reduzida sobrevivência das mudas nesta fase, sendo a inoculação em microplantas enraizadas, a fase mais indicada para a introdução de isolados de *Bacillus* sp. Em microplantas enraizadas, as rizobactérias inoculadas individualmente são eficientes para melhorar a massa fresca da microplanta, massa seca do sistema radicular, massa seca da parte aérea e número de folhas, com destaque para IB6.

Estes estudos podem contribuir para o conhecimento das interações que existem entre plantas e rizobactérias e produzir avanços biotecnológicos para otimizar a produção de plantas micropropagadas em risco de extinção e economicamente importantes.

A comprovada melhoria no crescimento das microplantas demonstra o potencial de *Bacillus* sp. como inoculante biológico na produção das microplantas de sempre-viva de Mucugê e o potencial bioinovador de ser incluído no processo de produção em escala comercial desta espécie ornamental de grande importância econômica, ambiental e social.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J.P. **Triagem de isolados bacterianos de origem marinha visando a produção de exopolissacarídeos.** (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. 2015.

AMPARO, K.K.dos S.; RIBEIRO, M. do C.O.; GUARIEIRO, L.L.N. Estudo de caso utilizando mapeamento de prospecção tecnológica como principal ferramenta de busca científica. **Perspectivas em Ciência da Informação**, v.17, n.4, p.195-209. 2012.

AUNTOUN H.; PRÉVOST D. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. Z. A. Siddiqui (ed.). In: PGPR: **Biocontrol and Biofertilization**. 2005. Springer, Dordrecht.p 1-38.

BHATIA S.; Dahiya, R.; Sharma, K.; Bera T. Modern Applications of Plant Biotechnology in **Pharmaceutical Sciences**. Academic Press, 2015. doi:10.1016/C2014-0-02123-5.

BASU, A.; PRASAD, P.; DAS, S. N.; KALAM, S.; SAYYED, R. Z.; REDDY, M. S.; EL ENSHASY, H. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: recent developments, constraints, and prospects. **Sustainability**, v. 13, n. 3, p.1140, 2021.

BORACIN MA., KOZUSNY-ANDREANI DI., JUNIOR RA. Efeito de bactérias rizosféricas e fertilizantes no enraizamento de violeta africana. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v.14, n.1, p. 366- 375, 2016.

BRASIL, LEI Nº 9 279, de 14 de maio de 1996. Regula direitos e obrigações relativos à propriedade industrial. Brasília, DF; Diário Oficial da União, 1996.

CALVO, P.; NELSON, L.M.; KLOEPPER, J.W. Agricultural uses of plant biostimulants. **Plant Soil**.v. 38, p. 3-14, 2014.

CANTERI, M.G.; ALTHAUS, R.A.; VIRGENS FILHO, J.S. das; GIGLIOTI, E.A.; GODOY, C.V. SASM - Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott - Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**. v.1,2, p. 18-25, 2001.

CARDOSO, E. J.B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. 2ª edição, 225p. ESALQ, 2016. Disponível em: DOI: 10.11606/9788586481567.

CARDOSO, K.G.V.; SILVA, H.S.A.; SILVA, A.C.M.; ARAÚJO, K.S.; PEIXOTO, C.C.; RAMOS, E. M. **Rizobactérias produtoras de ácido indol-acético e com potencial para controle biológico do mal-do-Panamá**. Reunião regional do Recôncavo da Bahia. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia Cruz das Almas-Ba, 2010.

CARDOSO, K.G.V. **Rizobactérias promotoras do crescimento de mudas micropropagadas de bananeira e agentes de biocontrole do mal-do-panamá** (*Fusarium oxysporum* f. sp. cubense). (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2010.

CARVALHO, A.C.P.P.; RODRIGUES, A.A.J.; SANTOS, E.O. **Panorama da produção de mudas micropropagadas no Brasil (2008-2015)**. Documentos, Embrapa Agroindústria Tropical, 2016.

CERQUEIRA, C.O.; FUNCH, L.S.; BORBA, E.L. Fenologia de *Syngonanthus mucugensis* Giul. subsp. *mucugensis* e *S. curralensis* Moldenke (Eriocaulaceae), nos municípios de Mucugê e Morro do Chapéu, Chapada Diamantina, BA, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v. 22, n.4, p.962-969, 2008.

DONINI, L.P.; SCHUCH, M.W.; RIBEIRO, M.F. de; SOUZA, J.A. de; SOARES, G.C. Estabelecimento *in vitro* de oliveira cv. “Arbequina” para início da micropropagação. **Ciência Rural**, v. 38, n.6, p.1769-1772, 2008.

GIULIETTI, A.M.; WANDERLEY, M.G.L.; LONGHI-WAGNER, H.M.; PIRAN, J.R.; PARRA, L.R. Estudos em sempre-vivas: taxonomia com ênfase nas espécies de Minas Gerais, Brasil. **Acta Botânica Brasil**. Porto Alegre, v.10, n.2, p. 329-377, 1996.

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

JAGADEESH, K.S.; KRISHNARAJ, P.U.; KULKARNI, J.H. Suppression of deleterious bacteria by rhizobacteria and subsequent improvement of germination and growth of tomato seedlings. **Current Science**, v. 91, n.11, p.1458-1459, 2006.

JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. da S. (Ed.). Aspectos práticos da micropropagação de plantas. Cruz das Almas: **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**, 2009. p. 121-152.

JUNIOR, R.F.G. **Isolamento, identificação e inoculação de bactérias produtoras de auxinas associadas às raízes de orquídeas.** (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP, Campus de Jaboticabal, 2009.

KUMAR, A.; PATEL, J. S.; MEENA, V. S.; SRIVASTAVA, R. Recent advances of PGPR based approaches for stress tolerance in plants for sustainable agriculture. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 20, p.101271, 2019.

LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; VANDE BROEK, A.; VANDERLEYDEN, J. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signaling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, v. 6, n.7, p. 298-300, 2000.

LARRABURU, E.E.; CARLETTI, S.M.; RODRÍGUEZ-CÁCERES, E.A.; LLORENTE, B.E. Micropropagation of photinia employing rhizobacteria to promote root development. **Plant Cell Reports**, v. 26, n.7, p. 711-717, 2007.

LARRABURU, E.E.; APÓSTOLO, M.N.; LLORENTE, B.E. Anatomy and morphology of photinia (*Photinia x fraseri* Dress) *in vitro* plants inoculated with rhizobacteria. **Trees**, v.24, n.4, p.635-642, 2010.

LARRABURU, E.E.; LLORENTE, B.E. *Azospirillum brasilense* enhances *in vitro* rhizogenesis of *Handroanthus impetiginosus* (pink lapacho) in different culture media. **Annals of Fort Science**, v.72, n.2, p. 219-220, 2015.

LIMA-BRITO, A.; ALBUQUERQUE, M.M.S.; RESENDE, S.V.; CARNEIRO, C.E.; SANTANA, J.R.F. Rustificação *in vitro* em diferentes ambientes e aclimatização de microplantas de *Comanthera mucugensis* Giul. subsp. mucugensis. **Revista Ciência Agronômica**, v.47, n. 1, p. 152-161, 2016.

LLORENTE, B.E.; ALASIA, M.A.; LARRABURU, E.E. Biofertilization with *Azospirillum brasilense* improves *in vitro* culture of *Handroanthus ochraceus*, a forestry, ornamental and medicinal plant. **New Biotechnology**, v. 33, n.1, p. 32-40, 2016.

MAFIA, R.G.; ALFENAS, A.C.; MAFFIA, L.A.; FERREIRA, E.M.; BINOTI, D. H. B.; SIQUEIRA, L. Microbiolização e interação entre rizobactérias promotoras do crescimento e clones de eucalipto. **Revista Árvore**, v. 33, n.5, p. 789-797, 2009.

MATOSO, E.S.; DONINI, L.; MASCARENHAS, L.S.; FEHRENBACH, G.W.; VARNES, L.S.; ANJOS e SILVA, S.D dos. Multiplicação de plântulas de cana-de-açúcar e efeito da inoculação de bactérias diazotróficas durante a fase de enraizamento *in vitro*. **Revista da jornada de pós-graduação e pesquisa- Congrega**, 2017.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e Bioquímica do Solo. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729 p.

NEHL, D.B.; ALLEN, S.J.; BROWN, J.F. Deleterious rhizosphere bacteria: na integrating perspective. **Applied Soil Ecology**, v.5; n.1, p. 1-20, 1996.

OLIVEIRA, J.R.G.; MORAES, T.A.L.; MELO, N.F. de; YANO-MELO, A.M. Fungos micorrízicos arbusculares e rizobactérias promotoras de crescimento na aclimação de *Zingiber spectabile*. **Bragantia**, v.69, n. 3, p.687-694, 2010.

READ, P.E.; PREECE, J.E. Cloning: Plants – Micropropagation/Tissue Culture. **Encycl of Agricul and Food Systems**, 2014.

SILVA, H.S.A.; VEIRA, R.S.; CARDOSO, K.G.V.; ARAÚJO, K.S. Processo de produção de mudas micropropagadas de bananeira por microbiolização com rizobactérias produtoras de ácido indolacético. **Circular Técnica- Embrapa Mandioca e Fruticultura**. 2016.

SILVEIRA, D.G.; VIDAL, A.M.; LEDO, C.A.S.; JOSÉ SANTANA J.R.F.; SOUZA, F.V.D. Aspectos morfofisiológicos na pré-aclimatização *in vitro* e aclimatização de plantas de caroá. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n.3, p.533-544, 2013.

OLIVEIRA, A.L.M.; COSTA, K.R.; FERREIRA, D.C.; MILANI, K.M.L.; SANTOS, O.J.A.P.; SILVA, M.A.; ZULUAGA, M.Y.A. Biodiversity of soil bacteria and its applications for a sustainable agriculture. **Biochemistry and biotechnology reports**, v. 3, n.1, p. 56-77, 2014.

RUZZI, M.; AROCA, R. Plant growth-promoting rhizobacteria act as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 124-134, 2015.

SANTOS, C.A.dos; SANTOS, M dos P.C.; SANTOS D.B. dos; BORTOLI, R. de; JUNIOR, A.M. de O. **Estudo sobre indeferimento de patentes no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI)**. IN: Ciência, Tecnologia e Inovação: Fatores de Progresso e Desenvolvimento. Org. MARTINS, E.R. Editora Atena, p.185, 2021.

SILVA, M.V.da; Mapeamento Bibliométrico e Patentométrico de Áreas Relacionadas à Economia Verde: Mundo e Brasil. **Cadernos de Prospecção**, v. 15., n. 3, p.944-959, 2022.

SILVA, H.S.A.; ARAÚJO, K.S.; LUQUINE, L.S.; VIEIRA, R.S.; CARDOSO, K.G.V. **Produto e processo de produção de mudas micropropagadas e microbiolizadas de bananeira por indução de enraizamento**. Depositante: EMBRAPA - Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária (BR/DF) / Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (BR/BA). Procuradora: ISABEL CRISTINA VINHAL FREITAS. BR 10 2013 028156 5 B1. Depósito: 31/10/2013. Concessão: 24/05/2022.

TEIXEIRA, D.A.; ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G.; FERREIRA, E.M.; SIQUEIRA, L.; MAFFIA, L.A.; MOUNTEER, A.H. Rhizobacterial promotion of eucalypt rooting and growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 18-123, 2007.

TURAN, M.; EKİNCİ, M.; YILDIRIM, E.; GÜNEŞ, A.; KARAGÖZ, K.; KOTAN, R.; DURSUN, A. Plant growth-promoting rhizobacteria improved growth, nutrient, and hormone content of cabbage (*Brassica oleracea*) seedlings. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v.38, p. 327-333, 2014.