



# IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS INFESTANTES NO PROCESSO DE MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE CAMU- CAMUZEIRO

## IDENTIFICATION OF INFESTING MICROORGANISMS IN THE *IN VITRO* MULTIPLICATION PROCESS OF CAMU-CAMU PLANTS

Caroline Marques Silva<sup>1</sup>; Pollyana Cardoso Chagas<sup>2</sup>; Hosana Carolina dos Santos Barreto<sup>3</sup>; Victor Braz Cabral<sup>4</sup>; Beatriz Emanuela Pereira da Cruz<sup>5</sup>; Deila Cristina Viera da Silva<sup>6</sup>; Maria da Conceição da Rocha Araújo<sup>7</sup>; Fabiana Barbosa do Nascimento<sup>8</sup>.

<sup>1</sup>Universidade Federal de Roraima (UFRR), Campus do Cauamé, BR-174, Km 12, Monte Cristo, Boa Vista – Roraima. CEP: 69.301-970, Brasil. [carolinemarques169@gmail.com](mailto:carolinemarques169@gmail.com). Apresentador do trabalho.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Roraima (UFRR), Campus do Cauamé, BR-174, Km 12, Monte Cristo, Boa Vista – Roraima. CEP: 69.301-970, Brasil. [pollyana.chagas@ufr.br](mailto:pollyana.chagas@ufr.br).

<sup>3</sup>Universidade Federal de Roraima (UFRR), Campus do Cauamé, BR-174, Km 12, Monte Cristo, Boa Vista – Roraima. CEP: 69.301-970, Brasil. [hosana.barreto@ufr.br](mailto:hosana.barreto@ufr.br)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Roraima (UFRR), Campus do Cauamé, BR-174, Km 12, Monte Cristo, Boa Vista – Roraima. CEP: 69.301-970, Brasil. [vtorbraz@gmail.com](mailto:vtorbraz@gmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Roraima (UFRR), Campus do Cauamé, BR-174, Km 12, Monte Cristo, Boa Vista – Roraima. CEP: 69.301-970, Brasil. [beatriz.e.p.c@gmail.com](mailto:beatriz.e.p.c@gmail.com).

<sup>6</sup>Universidade Federal de Roraima (UFRR), Campus do Cauamé, BR-174, Km 12, Monte Cristo, Boa Vista – Roraima. CEP: 69.301-970, Brasil. [deilacris.16@gmail.com](mailto:deilacris.16@gmail.com)

<sup>7</sup>Biotech Mudras. Avenida Brasil, 3911 - Distrito Industrial Gov. Aquilino Mota Duarte, Boa Vista - Roraima. CEP: 69.315-292, Brasil. [nilmacoly@hotmail.com](mailto:nilmacoly@hotmail.com)

<sup>8</sup>Universidade Federal de Roraima (UFRR), Campus do Cauamé, BR-174, Km 12, Monte Cristo, Boa Vista – Roraima. CEP: 69.301-970, Brasil. [fabiananascimento96@gmail.com](mailto:fabiananascimento96@gmail.com)

## INTRODUÇÃO

O camu-camu (*Myrciaria dubia*) (Kunth.) McVaugh é uma fruta silvestre que cresce nas margens inundáveis dos rios e lagos de toda a bacia Amazônica. Apresenta grande interesse comercial por seu potencial nutricional e elevadas concentrações de ácido ascórbico, sendo conhecida atualmente como a maior fonte natural conhecida de vitamina C (CHAGAS et al., 2015).

Atualmente a propagação por estaquia tem sido o método mais utilizado por permitir a manutenção das características genéticas das plantas matrizes e uniformidade (CHAGAS et al., 2012). Porém, essa técnica não tem sido eficiente na multiplicação em larga escala. Assim, a micropropagação torna-se a técnica mais viável para o processo de formação de mudas da espécie (ARAÚJO et al., 2021). Entretanto, segundo Araújo (2012), a micropropagação apresenta dificuldades no estabelecimento da cultura *in vitro* devido à alta taxa de contaminação por fungos e bactérias.

Esposito-Polesi (2011), enfatiza a importância de estudar Bactérias endofíticas na micropropagação, pois elas podem influenciar todas as etapas do cultivo, desde o estabelecimento até a aclimatização. Neste contexto, o objetivo do trabalho é identificar e controlar microrganismos contaminantes em explantes de camu-camuzeiro *in vitro* para melhorar a produção de mudas de alta qualidade, contribuindo para a fruticultura em Roraima.

## METODOLOGIA

O projeto foi realizado na Universidade Federal de Roraima - UFRR em parceria com a Embrapa Roraima. O material vegetal de camu-camuzeiro foi coletado no Campo Experimental do Serra da Prata da Embrapa RR - CESP, no município de Mucajaí - RR (2° 23'49" N e 60° 58'40" W).

Segmentos caulinares de cinco genótipos superiores de camu-camuzeiro foram coletados e levados ao laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Roraima. Após a desinfestação em câmara de fluxo laminar, conforme Araújo (2012), os explantes foram inoculados em meio de cultura WPM. Após 14 dias, os explantes com manifestação bacteriana foram selecionados para isolamento e identificação.

- **Isolamento dos microrganismos**

Foi realizada uma seleção visual dos tipos de microrganismos contaminantes mais frequentes nos explantes (Figura 1).

**Figura 1.** Microrganismos manifestantes em explantes de camu-camuzeiro



Para o isolamento de bactérias, as amostras foram coletadas com uma alça de repicagem e transferidas para placas de Petri contendo o meio de cultura DYGS (Dextrose Yeast Glutamano) e incubadas em BOD a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  com fotoperíodo de 12 horas. A purificação das colônias foi feita pela técnica de estrias no meio de cultura LB com alça de platina (Figura 2).

**Figura 2.** Microrganismos isolados em meio de cultura (DYGS, BDA).



- **Identificação dos microrganismos**

Isolados bacterianos obtidos foram caracterizados morfológicamente através de exames microscópicos e fotografias comparativas com referências da literatura. Os isolados foram agrupados com base em características como crescimento das colônias, coloração, forma e borda. Para preservação, foram armazenados em microtubos com glicerol a 30% a  $-20^\circ\text{C}$  na Coleção de Cultura de Bactérias do Laboratório de Microbiologia da Embrapa Roraima.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram selecionadas as 14 bactérias mais frequentes, das quais 4 foram caracterizadas morfolologicamente e identificadas devido à sua alta frequência *in vitro*. Observou-se o crescimento das colônias em placas de Petri, incluindo coloração, forma e borda (Tabela 1)

Tabela 1. Microrganismos mais frequentes de Bactérias onde foi observado a coloração da colônia, forma, bordadura e identificação.

Morfotipo	Identificação	Tempo de Crescimento	Forma	Elevação	Bordas	Cor
07B	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	Muito rápido	Puntiforme	Lenticular	Lisa	Amarela
07C	<i>Enterobacter bacterium</i>	Muito Rápido	Circular	Lenticular	Lisa	Creme
10A	<i>Bacillus Safensis</i>	Muito Rápido	Circular	Plana	Lisa	Branco leitoso
18C	<i>Keblsiella pnrumaniae</i>	Muito Rápido	Circular	Lenticular	Lisa	Branca

Todas as bactérias apresentaram crescimento muito rápido colonizando a placa de Petri em meio DYGS. Quanto a forma, o isolado 07B demonstrou forma puntiforme e apresentou coloração amarela. Já o 10A teve forma circular com elevação plana, e apresentou bordadura lisa, com coloração Branco leitoso (Figura 3).

**Figura 3.** Características de bactérias isoladas *in vitro* de camu-camuzeiro (*Myrciaria dubia*) Isolados 07B (1), 07C (2), 10A (3), 18C (4) cultivados em meio DYGS na placa de Petri respectivamente.



Quanto aos isolados identificados, as características morfológicas apresentadas pelos isolado 07B (Figura 3-1), que pertence ao gênero *Micrococcus yunnanensis*, é uma bactéria promotora de crescimento vegetal (PGPB), tem sido considerada uma estratégia eficaz e sustentável para melhorar o rendimento e a qualidade das culturas em diversas condições ambientais (GHANBARZADEH et al., 2019). Trabalhos realizados por Prudêncio et al., (2020), relatam que a cepa *Micrococcus yunnanensis* junto com outras seis cepas bacterianas (*Staphylococcus edaphicus*, *Bacillus wiedmannii*, *Streptomyces alboflavus*, *Bacillus cereus*) que foram identificadas como as mais promissoras para promoção de crescimento vegetal, com base em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

O isolado 07C (Figura3-2), pertence ao gênero *Enterobacter* sp. e a identificação do em nível



de espécie ainda é muito complexo por se tratar de uma complexa bactéria. Bactérias *Enterobacter* são bacilos gram-negativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, amplamente distribuídos na natureza (SILVA et al., 2018). *Enterobacter* sp. exsuda ácidos e prótons, desenvolvendo mecanismos para neutralizar estresses abióticos, o que permite seu crescimento em condições adversas (WANI et al., 2016). Ele foi encontrado em plantas e solos com *Caesalpinia brasiliense* (SOUZA et al., 2019).

A bactéria 10A, (Figura 3-3) pertence ao gênero *Bacillus* sp., conforme as análises filogenéticas que foram realizadas na Embrapa Ocidental. Lopes et al., (2021), demonstraram que bactérias endofíticas dos gêneros *Bacillus* sp. podem atuar como bactericidas, fungicidas, inseticidas, herbicidas e nematocidas, devido à produção de enzimas hidrolíticas que degradam componentes da parede celular de outros microrganismos. As rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (PGPR) do gênero *B. Fafensis* podem aumentar significativamente o crescimento das plantas, estabelecendo uma relação simbiótica benéfica com elas, além de serem atualmente reconhecidas como agente de controle biológico significativas contra fitopatógenos devido seus biopotencias e atividade antifúngica. (HASHIM et al., 2019; MUKHTAR et al., 2023).

O isolado 18C (Figura 3-4) de acordo com as características morfológicas observadas, pertence ao gênero *Kebsiella* sp. identificados em análise filogenético. É uma das principais bactérias de vida livre capazes de fixar nitrogênio atmosférico que colonizam gramíneas (KAKRALIYA; SINGH, 2018). Esse gênero também apresenta características de promoção do crescimento vegetal, associadas a cana-de-açúcar (RODRIGUES et al., 2016).

## CONCLUSÃO

De acordo com o resultado das avaliações realizadas nos isolados bacterianos provenientes da contaminação *in vitro* de camu-camuzeiro, foi possível identificar os gêneros *Micrococcus yunnanensis*, *Enterobacter bacterium*, *Bacillus Safensis* e *Kebsiella pnrumaniae*.

Com base nos resultados das avaliações dos isolados bacterianos do camu-camuzeiro contaminado *in vitro*, os gêneros identificados - *Bacillus Safensis*, *Micrococcus yunnanensis*, *Enterobacter bacterium* e *Klebsiella pneumoniae* - oferecem promissoras perspectivas para futuros trabalhos na produção de bioinsumos para micropropagação de mudas.

Essas bactérias endofíticas demonstram potencial para auxiliar no controle biológico e no desenvolvimento sustentável da agricultura.

## REFERÊNCIAS

ARAÚJO, M. C. R.; CASTRO, A. M.; CHAGAS, E. A.; SILVA, M. L.; COUCEIRO, M. A.; FLORES, P. S. Uso de antibióticos no controle da contaminação *in vitro* de segmentos caulinares de camu-camuzeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA. **Anais...** Bento Gonçalves:



SBF, 2012.

ARAÚJO, M. C. R.; CHAGAS, E. A.; VENDRAME, W.; RIBEIRO, M. I. G.; MOURA, E. A.; TAVEIRA, D. L. L.; CHAGAS, P. C.; GRIGIO, M. L. Callus induction and pro-embryogenic mass formation in *Myrciaria dubia*, an important medicinal and nutritional plant. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. e25442131, 2021.

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

CHAGAS, E. A.; BACELAR-LIMA, C. G.; CARVALHO, A. S.; RIBEIRO, M. I. G.; SAKAZAKI, R. T.; NEVES, L. C. Propagação do camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K.) Mcvaugh). **Revista Agro@ambiente On-line**, v. 6, n. 1, p. 67-73, 2012.

ESPOSITO-POLESI, N. P. Microrganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, v. 9, n. 4, p. 533-541, 2011.

GHANBARZADEH, Z., MOHSENZADEH, S., ROWSHAN, V., & MORADSHAHI, A. Evaluation of the growth, essential oil composition and antioxidant activity of *Dracocephalum moldavica* under water deficit stress and symbiosis with *Claroideoglossum etunicatum* and *Micrococcus yunnanensis*. **Scientia Horticulturae**, v. 256, n. unico, p. 108652-108660, 2019.

HASHEM, A.; TABASSUM, B.; ABD-ALLAH, E. F. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. **Saudi journal of biological sciences**, v. 26, n. 6, p. 1291-1297, 2019.

KAKRALIYA, M.; SINGH, R. Effect of soil test crop response basis integrated nitrogen management on yield, quality and profitability of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 4, p. 532-534, 2018.

LOPES, M. J. S.; SANTIAGO, B. S.; SILVA, I. N. B.; GURGEL, E. S. C. Biotecnologia microbiana: inoculação, mecanismos de ação e benefícios às plantas. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, e356101220585, 2021.



MUKHTAR, T.; ALI, F.; RAFIQUE, M.; ALI, J.; AFRIDI, M.S.; SMITH, D.; MEHMOOD, S.; AMNA; SOULEIMANOV, A.; JELLANI, G.; SULTAN, T.; MUNIS, F.H.; CHAUDHARY, H.J. Biochemical Characterization and Potential of *Bacillus safensis* Strain SCAL1 to Mitigate Heat Stress in *Solanum lycopersicum* L. **Journal of Plant Growth Regulation**, v.42, n.3, p.523-538, 2023.

PRUDÊNPIO DE ARAÚJO, V. L. V.; LIRA JUNIOR, M. A.; SOUZA JÚNIOR, V. S.; ARAÚJO FILHO, J. C.; CURY FRACETTO, F. J.; ANDREOTE, F. D.; ARAUJO PEREIRA, A. P.; MENDES JÚNIOR, J. P.; RÊGO BARROS, F. M.; MONTEIRO FRACETTO, G. G. Bacteria from tropical semiarid temporary ponds promote maize growth under hydric stress. **Microbiological Research**, v.240, n.3, p.126564, 2020.

RODRIGUES, A.A.; FORZANI, M.V.; SOARES, R.S.; SIBOV, S.T.; VIEIRA, J.D.G. Isolation and selection of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.46, n.2, p.149-158, Apr./Jun. 2016. .

SILVA, F.; MARTÍNEZ, O.; PABLA, T. M. Complexo *Enterobacter cloacae*. **Revista Chilena de Infectologia**, v.35, n.3, p.297-298, 2018.

SOUZA, B. R.; PEIXOTO, J. D. S. G.; MARINHO, S. D. A. S.; BRAGA, S. C.; ANTERO, R. V. P. Estímulo da atividade das H<sup>+</sup>-ATPases por *Enterobacter* sp. em mudas de *Calophyllum brasiliense* Cambess (guanandi). **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 7, n. 3, p. 347-355, 2019.

VILLARREAL-DELGADO, M. F.; VILLA-RODRÍGUEZ, E. D.; CIRA-CHÁVEZ, L. A.; ESTRADA-ALVARADO, M. I.; PARRA-COTA, F. I.; Santos-Villalobos, S. D. L. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. **Revista mexicana de fitopatología**, v. 36, n. 1, p. 95-130, 2018.

WANI, S.H.; KUMAR, V.; SHRIRAM, V.; SAH, S.K. Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. **The crop journal**, v. 4, n. 3, p. 162-176, 2016.