

Capítulo 03

POTENCIAL AGRÍCOLA DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS OBTIDAS DE BAMBU *GUADUA SPP.*

Sônia Maria Lima Santos do Vale, Paulo Arthur Almeida do Vale,
Clarice Maia Carvalho e Amauri Siviero

1. INTRODUÇÃO

Os bambus pertencem à família Poaceae, subfamília Bambusoideae. Constituindo um grupo de gramíneas, angiospermas, que dominam amplamente grandes áreas, são a quarta família com maior número de espécies no mundo. As plantas de bambu são encontradas em florestas nativas, nas regiões de climas temperado e tropical, com alta precipitação, o que contribui para seu ótimo desenvolvimento (BAMBOO PHYLOGENY GROUP, 2012).

O Brasil é o país com a maior diversidade de bambus do mundo, porém sua exploração ainda é pequena, diante de seu potencial para o uso em diversas áreas como construção civil, produção de papel e recuperação ambiental. O uso dos bambus vem aumentando após a Lei 12.484, de 08 de setembro de 2011, que incentiva seu manejo sustentável e cultivo. Todavia, sua cultura requer aplicação de tecnologias e processos, que viabilizem a utilização dos colmos para comercialização.

Os bambus possuem um valor econômico importante, especialmente, em países da Ásia e Colômbia, onde há fomen-

to para o cultivo dessa espécie vegetal, com ênfase no seu potencial de uso na alimentação, como medicinal, produção de cosméticos, fabricação de instrumentos musicais, construção civil, fabricação de papel, proteção de margens de rios, recuperação ambiental (SILVA, 2010).

O bambu gigante é muito difundido no Brasil e apresenta boas qualidades físico-mecânicas. Esse bambu é utilizado como material para construção civil e seu broto também é usado na alimentação. As regiões com grande produção de brotos comestíveis situam-se em Jacareí e Mogi das Cruzes, no estado de São Paulo, e as espécies mais utilizadas são: *Phyllostachys pubescens*, *Endrocalamus latiflorus*, *Dendrocalamus asper* e *Dendrocalamus giganteus*.

Os bambus são plantas de crescimento rápido e grandes competidoras dentro de florestas desmatadas. No Acre, as plantas de bambus ocupam áreas de florestas e clareiras e seu potencial econômico está voltado para exploração como matéria prima na construção civil, fabricação de móveis, instrumentos musicais, tacos, laminados e outros objetos.

A demanda crescente de mudas de bambu tem levado à necessidade de expansão do cultivo para atender o mercado, que enfrenta problemas para produção em larga escala através da propagação convencional das mudas. Um método interessante para incrementar a produção das plantas é o emprego de técnicas de cultivo utilizando as bactérias promotoras de crescimento vegetal.

As plantas abrigam uma ampla variedade de microrganismos conhecidos como microrganismos endofíticos, que

contribuem para aumentar seu crescimento, pois são fungos e bactérias, responsáveis pela da síntese de várias substâncias e processos que fornecem moléculas químicas para o seu desenvolvimento. Os microrganismos endofíticos vivem no interior de plantas e habitam de modo geral suas partes aéreas, como folhas e caules, não promovendo aparentemente nenhum dano a seus hospedeiros.

O uso de fertilizantes químicos no solo torna o processo muito caro, além de trazer prejuízos ambientais, contaminando água e solo. Os sistemas agrícolas estão se modificando em direção à melhoria da qualidade ambiental, sem comprometer a produção agrícola. A utilização de fertilizantes biológicos é uma alternativa para o manejo sustentável, com tecnologias que utilizam bactérias promotoras do crescimento vegetal.

A micropropagação é um método importante que pode suprir a demanda do bambu, porém tem limitações relacionadas à contaminação por fungos e bactérias que podem comprometer a produção das mudas no laboratório. A maior parte dos contaminantes são microrganismos associados à própria planta (endofíticos), o que torna mais difícil o seu controle (ESPOSITO-POLESI, 2011).

O cultivo de plantas *in vitro* com o objetivo de obter plantas saudáveis e em larga escala, conhecido como micropropagação, é muito eficiente, porém não acontece em um ambiente completamente livre de microrganismos. Ao contrário, estudos demonstraram a presença de bactérias benéficas no meio de cultura, que podem contribuir com a produção de fitormônios, controle de microrganismos causadores de doenças, além de promover resistência ao estresse (TARAZI, 2010).

Esses microrganismos exercerem diversas funções importantes para o hospedeiro e são potencialmente úteis na agricultura, na indústria farmacêutica e de defensivos agrícolas, visto que muitas espécies de microrganismos endofíticos são conhecidas por promoverem o crescimento vegetal e a proteção biológica em plantas.

Esta pesquisa teve por objetivo caracterizar as bactérias endofíticas de *Guadua* spp. e estimar o seu potencial de uso agrícola como solubilizados de fosfato e fixação de nitrogênio. Esta pesquisa foi cadastrada junto a plataforma Sisgen sob o registro: A36505E.

2. CARACTERÍSTICAS GERAIS DO BAMBU *GUADUA*

A planta de bambu é um representante da família Poaceae, que pertence à subfamília Bambusoideae, apresentando 1.439 espécies descritas. As espécies são divididas em dois grupos: os bambus lenhosos e os bambus herbáceos e estão relacionadas diretamente aos estudos das relações filogenéticas entre as plantas desse grupo (BAMBOO PHYLOGENY GROUP, 2012).

Os dados moleculares mais recentes mostraram que a subfamília *Bambusoideae* pode ser dividida em três tribos, Bambusae, Arundinarieae e Olyreae (WYSOCKI et al., 2015). A tribo Arundinarieae, que compreende os bambus lenhosos de clima temperado, possui 533 espécies; Bambuseae tem como representantes os bambus lenhosos tropicais que possuem 784 espécies, e a tribo Olyreae é composta pelos bambus herbáceos que possuem 122 espécies (SUNGKAEW et al., 2009).

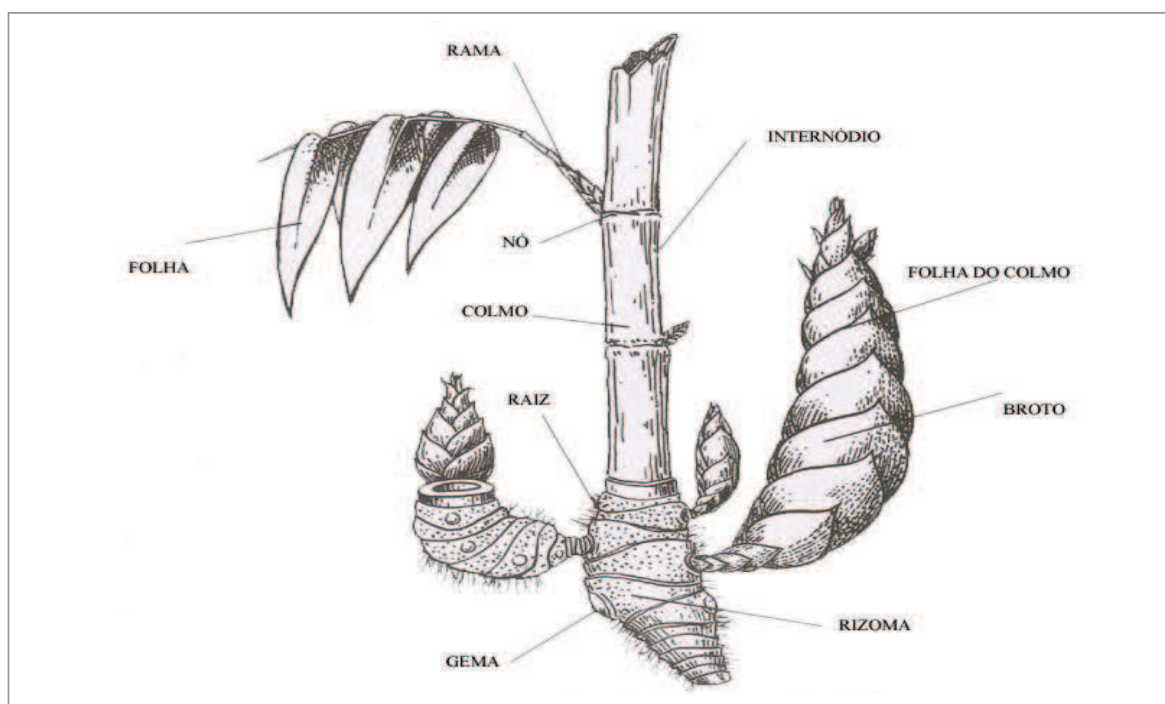
As tribos Bambuseae e Olyreae ocorrem no Brasil e já foram descritas 258 espécies de bambus nativos, distribuídas em 35 gêneros, sendo 165 endêmicas. As espécies do gênero *Guadua* são arbóreas, possuem espinhos nos colmos e nos ramos, além disso, são plantas semelparas; ocorre apenas um evento de reprodução sexuada e monocárpicas e elas morrem logo após este evento (FILGUEIRAS; VIANA, 2017).

O bambu em geral possui folhas acuminadas que se afinam nas pontas e flores inicialmente verdes, que se tornam amareladas e pardo-claras com o tempo e apresenta espiguetas paniculadas em forma de pirâmide, florescendo entre 30 e 60 anos (GUILHERME et al., 2017).

As espiguetas dos bambus podem ser bissexuais, espiguetas peculiares das pseudoespiguetas (*Arundinariea* e *Bambuseae*) e unissexual na subfamília Olyreae. As espiguetas consistem de 0, 1, 2 ou vários glumes, uma ou mais flores diminutas até um completo desenvolvimento de todas as espiguetas durante o período de crescimento. As espiguetas são formadas por dois pares de brácteas ou glumas que envolvem a flor e após a formação da semente irão constituir a casca das sementes. As glumas do par superior são denominadas de lema e pálea (LONDOÑO, 2010).

O crescimento do bambu acontece por meio de rizomas subterrâneos que são caules modificados de onde são geradas as raízes e os colmos. Embora seja uma gramínea, os bambus possuem hábito arborescente, apresentando parte aérea constituída pelo colmo, folhas e ramificações e outra subterrânea composta pelo rizoma e raiz (Figura 1).

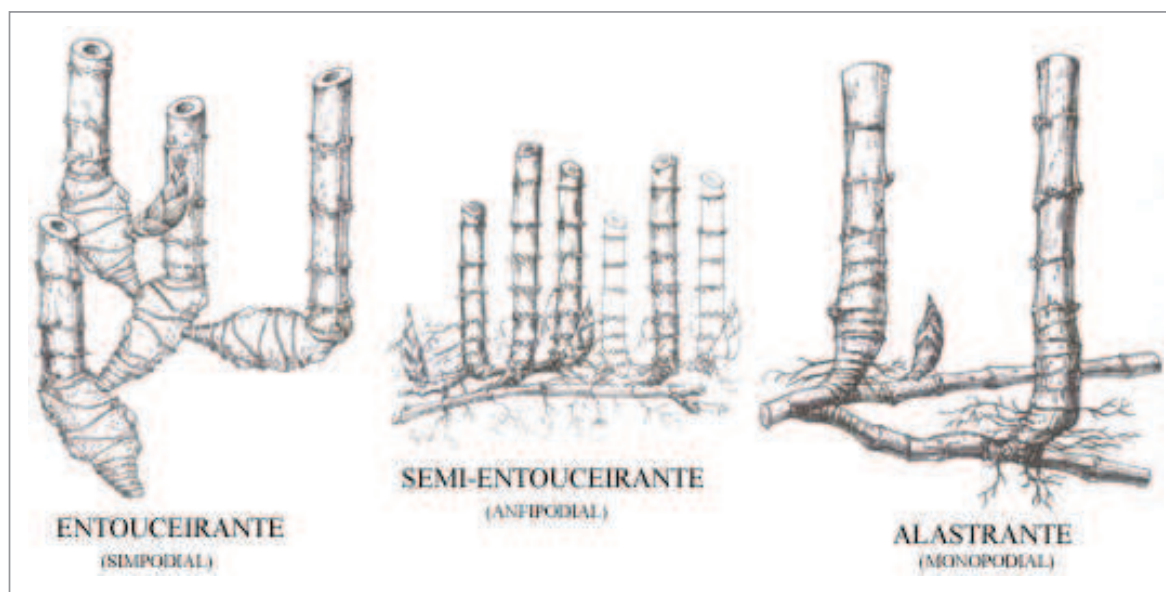
Figura 1. Partes constituintes do bambu.



Fonte: Silva (2010).

A subfamília Bambusoideae apresenta espécimes perenes que ocorrem em florestas tropicais ou temperadas, savanas ou pastos, beira de rios, pântanos. O rizoma é do tipo leptomórfico presente ou ausente, herbáceo ou lenhoso. As folhas da subfamília são dísticas, com lígula externo ausente (*Olyreae*) ou presente e possuem lígula adaxial membranoso ou como papel com ou sem franjas presentes em *Arundinarieae* e *Bambuseae*. Basicamente, existem dois grupos distintos de bambus quanto ao tipo de rizoma: a) formam touceiras (simpodiais); e b) os alastrantes (monopodiais). Muitos autores consideram ainda a existência de um terceiro tipo intermediário o semi-entouceirante ou anfipodial que apresenta características dos dois tipos anteriores (LONDOÑO, 2010) (Figura 2).

Figura 2. Diferentes tipos de rizomas de bambu.



Fonte: Silva (2010).

As bainhas dos bambus são frequentemente auriculadas ou com franjas, as lâminas relativamente extensas, pseudopeciouladas, nervura paralela, mesófilo não radiado, camada paliçada ausente, grandes células fusionadas e bem desenvolvidas nas folhas de sombra. As células de braços geralmente são bem desenvolvidas e invaginadas assimetricamente; anatomia Kranz ausente, padrão fotossintético C3, nervura mediana complexa ou simples (LONDOÑO, 2010).

2.1 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO BAMBU *GUADUA*

As espécies da subfamília Bambusoideae encontra-se amplamente distribuída e ocorrem entre 46° N e 47° S de latitude, com altitude desde o nível do mar até 4.300 metros. A estimativa de diversidade varia dentro da literatura, mas uma compilação mostra 1.439 espécies descritas dentro de 116 gêneros (BAMBOO PHYLOGENY GROUP, 2012).

Os bambus lenhosos são distribuídos naturalmente pelas áreas tropicais e temperadas da Ásia, Austrália, África

ca e da América (GUERREIRO; LIZARAZU, 2010). Há evidências de que os ancestrais dos bambus lenhosos evoluíram na era Pós-Cretácea no hemisfério sul (BYSTRIAKOVA et al., 2003).

O Brasil é o país que concentra a maior diversidade de bambu do continente Americano. Ao todo, são 34 gêneros de bambu, abrigando 232 espécies das quais 174 são consideradas endêmicas. Muitas espécies de bambu, no Brasil, ainda não foram formalmente descritas (FILGUEIRAS; GONÇALVES, 2004). Outros países da América Latina apresentam grande diversidade de espécies de bambus como: Colômbia (70), Venezuela (60), Equador (42), Costa Rica (39), México (37) e Peru (37) (LONDOÑO, 2010).

Um gênero importante da subfamília Bambuseae é o *Guadua*. O gênero é composto por bambus lenhosos de médio e grande porte, que podem atingir mais de 30 metros de altura e 15 centímetros de diâmetro, distinguindo-se dos demais da tribo, pela presença de espinhos nos nós, os quais podem variar em número e forma, dependendo da espécie. O gênero *Guadua* apresenta ampla distribuição no novo mundo, e possui 25 espécies, a maioria distribuídas no México, América Central, América do Sul, exceto no Chile, em habitats de savanas, cerrados, florestas tropicais de terras baixas (LONDOÑO, 2010).

No Brasil, são reconhecidas 19 espécies nativas de *Guadua*, sendo cinco endêmicas. As espécies de *Guadua* estão distribuídas em todo o país, porém os especialistas relatam a existência de espécies ainda não identificadas (FILGUEIRAS; VIANA et al., 2017).

As espécies de bambu pertencentes ao gênero *Guadua* ocorrem na Amazônia especialmente no Acre e Pará sendo denominadas localmente de taboca ou taquarucú. Estudos realizados no Projeto Radam, por meio de imagens de satélites, determinaram a existência de aproximadamente 7 milhões de hectares de bambus nativos no estado do Acre, com destaque para a espécie *Guadua weberbaueri* (PEREIRA; BERALDO, 2007).

A espécie *Guadua peniculata* está amplamente distribuída, ocorrendo desde o México até o Brasil, onde pode ser encontrada desde o Pará até o Rio Grande do Sul. A espécie *Guadua superba* ocorre nos estados do Acre, Amazonas e Pará, e pode atingir até 30 metros de altura e 15 centímetros de diâmetro do colmo, sendo considerado o bambu nativo mais alto no Brasil. No estado do Acre, ocorre uma faixa de bambu, cuja espécie ainda não foi identificada, que possui muita semelhança com *Guadua angustifolia* (FILGUEIRAS; VIANA, 2017), o qual é reconhecido por Londoño e Zurita (2008), como *Guadua chaparensis*.

No Acre, existe uma extensa área de ocorrência natural de bambus nativos e espécies exóticas de interesse econômico, que corresponde à maior floresta de bambus do mundo, com aproximadamente 600 mil hectares da planta. Segundo Silveira (2005), o gênero *Guadua* de ocorrência no Acre, possui as mesmas características morfológicas dos bambus que são comercializados nas regiões Sul e Sudeste, onde se verifica sua utilização para fabricação de artesanato e móveis, além de apresentar um grande potencial para a produção de carvão vegetal.

2.2 PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DAS ESPÉCIES *GUADUA WEBERBAUERI* PILGER E *GUADUA CHAPARENSIS* LONDOÑO & ZURITA QUE OCORREM NO ACRE.

Guadua weberbaueri Pilger: A espécie *G. weberbaueri* é nativa no Acre e ocorre desde 1.500 m de altitude na Cordilheira dos Andes, passando pela região de Pucallpa até Puerto Maldonado no Peru, e atinge o Brasil através dos interflúvios das terras baixas no Acre, onde ocupa clareiras e grandes extensões das florestas (SILVEIRA, 2005).

Guadua weberbaueri pertence à tribo Bambuseae e subtribo Guaduinae, e consiste de um bambu lenhoso, arborescente e espinhoso, cuja estrutura vegetativa é composta de rizomas, brotos aéreos sem ramos e sem folhas e colmos com ramos e folhas (SILVEIRA 2005).

Esse bambu possui um sistema de rizoma subterrâneo ramificado e muito extenso, que cresce próximo ao solo. Seu rizoma é curto, grosso, curvado e achatado, sendo classificado como paquimorfo. Cada rizoma está conectado ao pescoço de outro rizoma. Esse pescoço do rizoma é produzido pelas gemas meristemáticas presentes nos internós do corpo do rizoma. (LONDOÑO, 2010).

Os colmos são eretos na base e arqueados apicalmente, com 3-6 m de altura, diâmetro de 3-4 cm, espessura de parede de 0,8 a 1 cm. Os brotos são verdes com pilosidade esbranquiçada. A folha é caulinar maculada, e quando jovem com pubescência dorsal e basal, glabrescentes; bainha com aurículas fimbriadas de cor café em forma de língua, fímbrias cor de marfim maior que as aurículas. A planta apresenta espinhos nos ramos de folhagem em número de um ou dois espinhos

por nó e dimorfismo foliar evidente. A lâmina da folha atinge até 12 cm de largura, com nervuras, verde escura, glabra pelo feixe e tomentosa no dorso; lígula exterior verde-amarela ou roxa (LONDOÑO, 2010).

OLIVIER et al. (2009) estudaram flores e frutos de *G. weberbaueri* no período de 2002 a 2005. Selecionando diferentes estágios de maturação e estudando o interior das touceiras, encontraram colmos folhosos, colmos desfolhados e ramos florescendo. As inflorescências de *G. weberbaueri* são complexas interactantes, brácteas com sinflorescências, com pseudo-espigas. Os autores reportaram, em estudos de crescimento, que os juvenis desenvolvidos a partir dos frutos carnosos coletados nos colmos de *G. weberbaueri* também exibiram todas as características de *G. weberbaueri*, especificamente as aurículas e fimbrias bem desenvolvidas nas margens da lígula das folhas dos colmos, apresentando fimbrias medindo 16-20 mm de comprimento.

G. weberbaueri apresenta potencial econômico para utilização como matéria prima na construção civil, fabricação de móveis, instrumentos musicais, tacos, laminados e outros objetos.

Figura 3. Aspectos gerais do bambu *Guadua weberbaueri* que ocorre no Acre.



Fotos: Marcos Silveira.

***Guadua chaparensis*:** A espécie *G. chaparensis* se caracteriza por apresentar rizomas paquimorfos, colmos com até 25 metros de altura, 7 a 12 centímetros de diâmetro, ereto na base com 18 a 25m de comprimento, encurvando-se do meio para o ápice, apresentando-se verde esbranquiçado quando jovem, adulto é verde escuro (Figura 4). *G. chaparensis* se diferencia das outras espécies por apresentar folhas com bainhas subglabras, fimbriadas ausentes no cume, lígulas interiores púberas, lâminas de folhas abaxialmente glabras e pseudopecíolos abaxialmente glabrescentes. Os internós do colmo oco medem 22–50 cm de comprimento, é verde escuro e distalmente glabro. Possui nós do colmo com crista supra-nodal distinta, os ramos dendróides laterais e extravaginiais. Dois,

três ou vários ramos complementares, um ramo dominante (LONDOÑO; ZURITA, 2008).

Figura 4. Aspectos gerais de uma touceira do bambu *Guadua chaparensis* que ocorre no Lago do silêncio.



Fotos: Amauri Siviero.

A espécie *G. chaparensis* apresenta de 5 a 8 folhas por ramo. As bainhas das folhas de *G. chaparensis* são glabras na superfície e a margem externa peluda. A lígula apresenta membrana ciliada, medindo de 0,3 a 0,5 mm de comprimento, aspecto pubescente na superfície abaxial e colar com ligação externa. A base da lâmina de folha de *G. chaparensis* apresen-

ta uma breve conexão semelhante a um pecíolo para a bainha, com 0,2 - 0,4 cm de comprimento. As lâminas de folha são lineares ou lanceoladas, variando de 15 a 23 cm de comprimento e 13 a 20 mm de largura e apresentando nervura de lâmina foliar conspícua. A forma da venação da lâmina da folha de *G. chaparensis* é proeminente, apresentando de 11 a 14 veias secundárias transversais distintas com margens escabrosas (LONDOÑO; ZURITA, 2008; LIZARAZU et al., 2013).

3 INTERAÇÕES ENTRE PLANTAS DE BAMBU E BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS.

As bactérias, actinomicetos e os fungos endofíticos são microrganismos encontrados frequentemente em muitas espécies vegetais ora disponibilizando nutrientes importantes como fosfato e nitrogênio ora contribuindo para o seu crescimento através da síntese de fitormônios. Muitos estudos têm demonstrado a utilidade dos endofíticos para a promoção de crescimento vegetal, que ocorre principalmente pela produção de fitormônios como auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno (TSAVKELOVA et al., 2006).

Os microrganismos endofíticos podem apresentar atividades biológicas antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, bem como produção de enzimas, entre outros produtos com aplicação biotecnológica (NAIR; PADMAVATHY, 2014).

A colonização mais intensa de microrganismos em porções basais em detrimento dos apicais de *Bambusa vulgaris* foi relatada por Torres et al. (2016). No caso específico de estudos com fungos filamentosos em associados endofiticamente a *Bam-*

busa vulgaris, os tecidos coletados em porções mais próximas ao colmo apresentam maior intensidade de colonização com microrganismos em relação aos mais distantes (DANTAS, 2017).

Vários estudos de diversidade de comunidades bacterianas foram feitos em espécies florestais como bambu, eucalipto e em espécies agrícolas como hortaliças, tomate, mamão, feijão, milho, abacaxi e ornamentais como orquídeas e heliconia. Esses estudos mostraram a importância dos organismos endofíticos na disponibilização de nutrientes para plantas, promoção de crescimento e proteção contra patógenos.

Estudos moleculares com o gene 16S RNA em explantes de bambus *in vitro* identificaram algumas espécies de bactérias endofíticas, além como *Sphingomonas* e *Methylobacterium* (COLETTA et al., 2010). Darma et al., (2016) testaram um metabólito secundário produzido por *Bacillus subtilis* isolados do bambu (*Bambusa edulis* Munro) e verificaram que este confere proteção contra alguns fungos patogênicos como *Sclerotium rolfsii* e *Ganoderma* sp.

A grande diversidade de microrganismos endofíticos é um fato importante, que contribui para o seu uso na agricultura, especialmente sua aplicabilidade na promoção de crescimento de plantas de interesse econômico no Brasil, como o eucalipto (PAZ, 2009) e tomateiro (BARRETTI et al., 2008).

Os microrganismos endofíticos podem contribuir para a aclimatização das mudas de bambu, proporcionando boas características morfológicas aos bambus, uma vez que várias espécies de bactérias já foram encontradas em tecidos e órgãos de plantas, conferindo vários benefícios, como o melhor de-

sempenho no crescimento de espécies de interesse econômico. (TARAZI, 2010; DARMA et al., 2016).

A contaminação por microrganismos como fungos, bactérias e actinomicetose é um problema frequente em espécies de bambu. Estudos genéticos feitos utilizando duas espécies de bambu *Dendrocalamus giganteus* e *Bambusa vulgaris* mantidos *in vitro* e em biorreatores de imersão temporária mostraram quatro bactérias endofíticas com maior ocorrência: *Pseudomonas* sp., *Burkholderia* sp., *Stenotrophomonas* sp. e *Staphylococcus* sp. Esses gêneros são conhecidos por sua potencialidade de promoverem o desenvolvimento de outras espécies de plantas, seja como promotores de crescimento, na produção de fitormônios, na defesa contra patógenos e controle biológico de pragas (DARMA et al., 2016; MELATTI et al., 2008).

Diversos trabalhos têm focado a identificação de agentes bacterianos endofíticos contaminantes em cultura *in vitro* em *Guadua angustifolia* como *Bacillus* sp. que foi isolado e identificado por Cruz-Martín et al. (2007). Ramírez et al. (2009) isolaram as bactérias *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium* e *Erwinia*, também, relatadas na literatura como fitopatógenos, de tecidos de *Guadua angustifolia* Kunth cultivados *in vitro*.

As espécies *Pantoea agglomerans* e *P. ananatis* foram identificadas por Nadha et al. (2012) como os principais contaminantes bacterianos nos segmentos nodais do bambu *Guadua angustifolia* cultivados *in vitro*. Da mesma forma, através de técnicas moleculares usando a região 16S rDNA, foram identificadas as bactérias endofíticas *Janibacter* sp. e *Serratia marcescens* contaminantes de meio de cultura *in vitro* presentes e *Bambusa balcooa* (RAY et al., 2017).

4. CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ISOLADAS DE *GUADUA SPP.* NO ACRE.

As primeiras pesquisas envolvendo estudos com as bactérias endofíticas isoladas de bambu no Acre tiveram início em 2017 com o trabalho de coleta, isolamento, purificação e preservação de bactérias endofíticas obtidas das espécies de *G. chaparensis* e *G. weberbaueri*. As amostras de folhas de indivíduos das duas espécies de bambu foram obtidas nos municípios de Rio Branco e Sena Madureira. Os trabalhos de laboratório foram desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Acre.

Nas pesquisas *in vitro*, foram utilizadas as folhas e os caules obtidos do material coletado de bambus que estavam localizados em áreas de mata virgem (Lago do Silencio) e em capoeiras situadas em Rio Branco e Sena Madureira. O material vegetal sadio foi submetido a assepsia e posteriormente as partes vegetais foram plaqueadas em meios de cultura específicos para estabelecimento, isolamento e obtenção das bactérias que habitam o interior das plantas meios de cultura com adição de extrato vegetal obtido pela trituração de partes das folhas e pecíolo dos bambus coletados em campo. Parte das bactérias foram criopreservadas, visando à manutenção realizada a baixíssimas (-85°C) e à preservação das características genéticas e estudos futuros.

4.1 DIVERSIDADE E CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE BAMBU *GUADUA SPP.*

Ao todo nesta pesquisa foram isoladas 289 bactérias endofíticas distintas a partir das dos ramos e folhas coletadas de plantas de bambus *Guadua weberbaueri* e *Guadua chaparensis* oriundas dos três locais de coleta. A princípio foram avaliadas

as características de crescimento das colônias em relação aos tipos de meio de cultura utilizados. Assim, os isolados cresceram de forma diferenciada nos quatro tipos de meios utilizados.

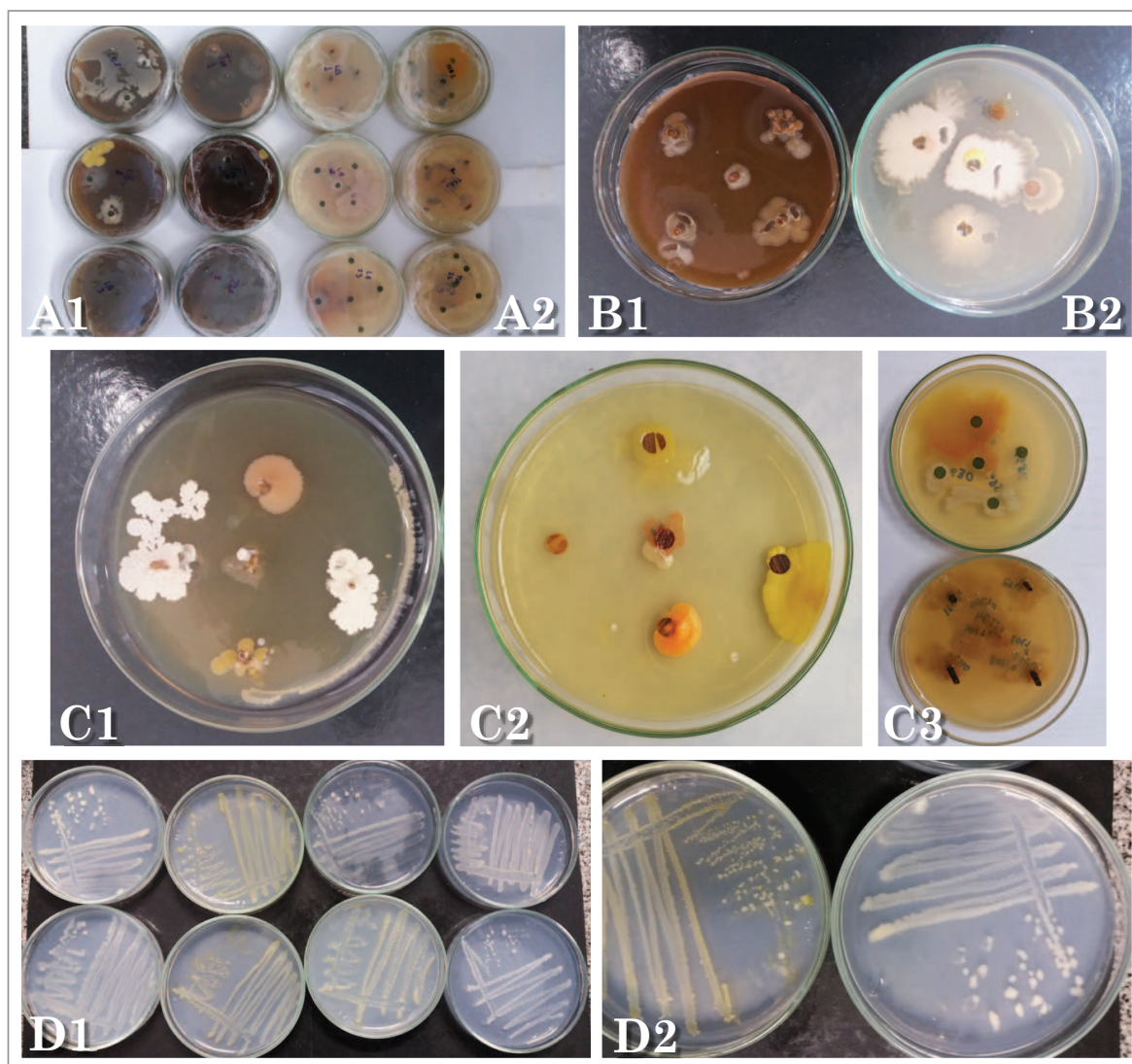
A diversidade de espécies e as principais características morfológicas das bactérias endofíticas isoladas nas duas espécies de *Guadua* estudadas estão demonstradas na Figura 5. A maioria das bactérias 87% apresentou crescimento rápido in vitro, superando o número daquelas que apresentaram crescimento lento ou fastidiosas. Os meios de cultura caldo triptona de Soja (TSB) e Luria-Bertani (LB) com ou sem adição de extrato foram eficientes para o isolamento das bactérias endofíticas do bambu e foram observados dois tipos de crescimento bacteriano, isto é, bactérias de crescimento rápido e bactérias de crescimento lento (ou fastidiosas).

A avaliação morfológica das bactérias isoladas foi realizada através das características macro e micromorfológicas das colônias obtidas do cultivo in vitro. A análise macromorfológica foi realizada analisando os seguintes aspectos: a) tamanho: puntiforme quando menores que 1,0 mm; b) forma: circular, irregular ou rizoide; c) bordas: lisa, lobulada, franjada ou ondulada; d) consistência: cremosa, viscosa, granulosa ou seca; e) coloração: amarela, rosada, branca, castanha, alaranjada e f) brilho: brilhante ou opaca.

Nesta pesquisa, as bactérias foram ainda categorizadas quanto à velocidade de crescimento das colônias in vitro. As bactérias que se desenvolveram rapidamente no período de uma semana foram classificadas como de crescimento rápido e as aquelas colônias que apresentaram crescimento lento após sete dias foram classificadas como fastidiosas.

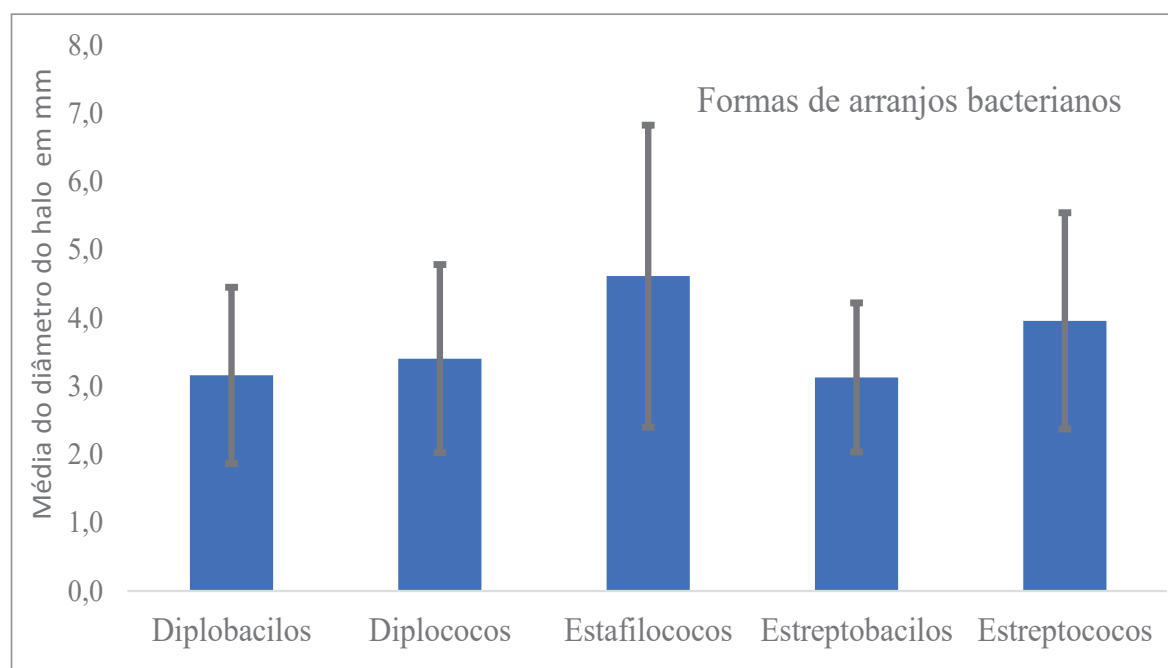
Através das médias de diâmetro dos halos formados foi possível classificar as bactérias isoladas endofíticas de bambu nativo *Guadua* spp. por tipo de arranjo de bactérias nas categorias: diplobacilos, diplococos, estafilococos, estreptobacilus e estreptococos conforme demonstrado na Figura 6.

Figura 5. Características morfológicas das colônias de bactérias endofíticas isoladas de bambus *Guadua* spp. A1 e A2: meios de cultura TSB e LB com e sem adição de extrato; B1 e B2: aspecto geral de bactérias endofíticas obtidas de fragmentos de caule e folhas respectivamente; C1, C2 e C3: diversidade de diferentes formas e cores e D1 e D2: colônias purificadas pelo método de esgotamento por estrias isoladas utilizando meio TSB.



Fotos: Sônia Maria Lima Santos do Vale

Figura 6. Média de diâmetro dos halos formados e tipos de arranjo de bactérias endofíticas isoladas de bambus *Guadua* spp. no Acre.



Fotos: Sônia Maria Lima Santos do Vale

Considerando-se os tipos de arranjos de bactérias isoladas dos bambus das três áreas, as mais abundantes foram os estreptococos com 37,5% (n=99), seguidos pelos estreptobacilos 23,1% (n=61), diplococos 22,0% (n=58) e estafilococos 10,6% (n=28). Os grupos mais raros foram os diplobacilos 4,2% (n=11), cocobacilos 1,5% (n=4) e tétrades 1,1% (n=3) (Figura 5). Trabalhos recentes destacam o grupo dos bacilos e estafilococos como bactérias endofíticas de grande importância na agricultura, como promotores de crescimento vegetal (VENDAN et al., 2010).

As bactérias foram analisadas quanto à composição das paredes através do método de coloração de Gram, conforme metodologia descrita por Pelczar et al. (1996), contando com os seguintes procedimentos: a) coleta de células bacterianas com auxílio da alça bacteriológica das colônias; b) deposição em uma gota de solução salina em uma lâmina de vidro;

c) adição de solução de cristal violeta por 1 minuto; d) adição de corante lugol por 1 minuto; e) adição de álcool etílico a 95% por 1 minuto; f) deposição em uma gota de solução de safranina por 1 minuto; e g) lavagem entre cada reagente com água corrente. Após coloração e secagem, as lâminas foram montadas em lamínulas e submetidas à observação através de microscópio óptico comum, visando caracterizar a forma e o arranjo das bactérias, assim como a classificação em bactérias do tipos gram positiva ou negativa.

As colônias bacterianas isoladas de folhas e pecíolos de *Guadua chaparensis* e *Guadua weberbeauri* apresentaram diferentes características morfológicas, como coloração amarela, laranja, rosa, castanha e branca; consistência cremosa, viscosa e seca; forma puntiforme, circular, irregular, rizoide; borda inteira, franjada e lobulada, a maioria brilhante, e poucas opacas.

5. Testes biológicos de solubilização de fosfato e fixação de nitrogênio por bactérias endofíticas isoladas de *Guadua* spp.

O fósforo e o nitrogênio são macronutrientes necessários em quantidades grandes pelas plantas, uma vez que fazem parte da composição estrutural de ácidos nucleicos, proteínas e coenzimas (SANTOS, 2013; TOSTA, 2009). A carência desses elementos pode prejudicar a produção agrícola de muitas espécies de plantas sob fatores de estresse como mudanças climáticas, solos desgastados, então é necessária a disponibilização de microrganismos benéficos que podem solucionar os problemas de produção agrícola (SAHARAN; NEHRA, 2011; SANTOS, 2013).

5.1 TESTES DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS OBTIDAS DE *GUADUA CHAPARENSIS* E *GUADUA WEBERBEAURI* NO ACRE

O potencial de utilização biotecnológica de microrganismos endofíticos se deve a ações como: controle de pragas via indução de resistência a insetos e patógenos, promoção de crescimento vegetal, solubilização de fosfatos de rocha, fixação biológica de nitrogênio, contribuindo para a redução da utilização de agroquímicos.

A população microbiana de origem endofítica, quando associada aos tecidos da planta, pode promover a solubilização de fosfatos inorgânicos e torna aquele fósforo insolúvel disponível para as plantas, abrindo a possibilidade de emprego em programas de interação com organismos fixadores de nitrogênio.

No caso específico das bactérias endofíticas obtidas de *Guadua* spp. do Acre, os isolados bacterianos foram submetidos ao teste de solubilização de fosfato inorgânico. O experimento consistiu na adição de fosfato insolúvel ao meio tornando-o turvo quando o resultado era positivo denunciando a capacidade de uso do fosfato pela bactéria.

Neste trabalho, foi utilizado meio de cultivo composto de glicose 10 g; NH_4Cl , 5 g; NaCl , 1 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; CaHPO_4 , 0,8 g; ágar, 15 g, ajustando-se o pH do meio para 7,2. As bactérias foram inoculadas no meio de cultivo, incubadas a 28°C por 72 horas. As bactérias foram capazes de solubilizar fosfato, formando um halo claro ao redor de suas colônias, mensurados os diâmetros das colônias e do halo de solubilização obtendo-se o índice de solubilização. Foi feita uma média dos

índices de solubilização obtidos entre as três repetições. Dos 289 bacterianos isolados testados no experimento, 113 foram positivos para solubilização de fosfato.

Os isolados caracterizados como estafilococos Gram-positivos apresentaram maior média de índices de solubilização de fosfato com 4,61, seguido dos estreptococos, estreptobacilos, diplococos e diplobacilos, que também apresentaram índice médio de solubilização significativos de 3,9, um índice considerado alto para a capacidade desses isolados de solubilizar o fosfato inorgânico.

DANTAS et al., (2015) também relataram que bactérias endofíticas presentes em quatro espécies de bambu foram capazes de solubilizar fosfato inorgânico *in vitro*, utilizando o índice de solubilização que foi obtido pela relação entre o halo da colônia de bactérias e o halo de solubilização. Os autores detectaram que apenas nove das 23 bactérias foram consideradas positivas para solubilização de fosfato nos isolados que apresentaram halo translúcido de solubilização no entorno das colônias.

Neste trabalho, verificou-se que os grupos diplobacilos e estreptobacilos apresentaram alta capacidade de solubilização de fosfato, sendo estes resultados corroborados com o estudo feito por Saharan; Nehra (2011) que sugere o uso de estirpes bacterianos de *Bacillus* como fertilizantes naturais, pois quando inoculados em solos com pouca disponibilidade de minerais aumentaram a absorção de nutrientes em plantas de pimenta e pepino, uma vez que os microrganismos endofíticos podem fornecer fosfato e nitrogênio para as plantas.

5.2 TESTE DE FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS OBTIDAS DE *GUADUA CHAPARENSIS* E *GUADUA WEBERBEAURI* NO ACRE

A literatura é rica em trabalhos envolvendo as bactérias endofíticas conhecidas como diazotróficas, as quais vivem nos tecidos internos das plantas, colonizando as folhas, caules, frutos e raízes e trazendo diversos benefícios para as plantas, como a fixação biológica do nitrogênio. Surette et al., (2003) estudaram as bactérias endofíticas isoladas de *Daucus carota* L. e identificaram que bactérias do gênero *Staphylococcus* apresentaram atividade promotora de crescimento devido a solubilização de fosfatos e fixação de nitrogênio.

As bactérias endofíticas obtidas de *Guadua chaparensis* e *Guadua weberbeauri*, no Acre, foram avaliadas quanto à capacidade de fixar nitrogênio atmosférico utilizando o método de crescimento em meio de cultura livre de nitrogênio. Nessa condição, o semissólido desprovido de fonte nitrogenada é capaz de criar um ambiente com baixo nível de oxigênio semelhante ao que ocorre no solo e na planta onde estão localizadas as bactérias diazotróficas.

Neste ensaio, as bactérias foram cultivadas em tubos de vidro com a seguinte composição: ácido málico, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, NaCl, KOH, solução de micronutrientes, azul de bromotimol, vitaminas e água destilada. Os tubos com meio de cultura contendo 289 bactérias distintas foram incubadas a 28° C por 72 horas.

A presença de véu no meio de cultura indicou a capacidade de fixação de N_2 pela bactéria. No presente estudo, 181 dos tubos incubados (52 %) apresentaram bactérias endofíti-

cas fixadoras de nitrogênio atmosférico, sendo caracterizadas como bactérias endofíticas diazotróficas, positivas para fixação de nitrogênio, podendo ser indicadas para sua utilização na promoção de crescimento vegetal.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As colônias bacterianas isoladas de folhas e pecíolos de *Guadua chaparensis* e *Guadua weberbeauri* apresentaram diferentes características morfológicas. Essas características, juntamente com as características microscópicas, como: estreptococos, diplococos, estreptobacilos, estafilococos, diplobacilos, cocobacilos e tétrades demonstraram grande diversidade de bactérias nos três locais de coleta. Tais características podem ser utilizadas para orientar na identificação dos isolados até o nível de gênero e espécie, permitindo que se faça a coleta de grupos de maior interesse, visando estudos futuros.

As bactérias endofíticas obtidas a partir do bambu *Guadua* spp., neste trabalho, apresentam propriedades fisiológicas favoráveis para serem utilizadas na promoção de crescimento vegetal, porque a maioria dos isolados foi capaz de solubilizar o fosfato inorgânico, com índices médios de solubilização acima de 3 que é considerado alto. Cerca de 52 % dos isolados bacterianos foram capazes de fixar o nitrogênio atmosférico e disponibilizar esse nutriente para a planta em forma de amônia.

7. REFERÊNCIAS

BAMBOO PHYLOGENY GROUP. An updated tribal and subtribal classification of the Bamboos (Poaceae: Bambusoideae). **Bamboo Science and Culture**. v. 24, p. 1-10. 2012.

BARRETTI, P. B.; SOUZA, R. M.; POZZA, E. A. Bactérias endofíticas como agentes promotores do crescimento de plantas de tomateiro e de inibição in vitro de *Ralstonia solanacearum*. **Ciência Agrotécnica**. v. 32, n. 3, p. 731-739. 2008.

BYSTRIAKOVA, N., KAPOV, V., LYSENKO, I. **Bamboo Biodiversity: África Madagascar and the Américas**. Cambridge, United Kingdom: UNEP-WCMC; 2004. Disponível em: <http://www.unep-wcmc.org/resource/publications/UNEP_WCMC_bioseries/19.htm>. Acesso em: 19.nov.2018.

COLETTA, R. D.; GOMES, J. E.; ROSSI, M. L.; OLIVEIRA, E. T.; TSAI, S. M.; CALDAS, D. G. G. **Caracterização molecular de bactérias endofíticas em explantes micropropagados de bambu**, 2010. Anais Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP. 2010. Disponível em: <https://updoc.site/download/caracterizacao-molecular-de-bacterias-endofiticas-em-explantes_pdf> Acesso em: 18.nov.2018.

CRUZ-MARTÍN, M.; GARCÍA-RAMÍREZ, Y.; SÁNCHEZ-GARCÍA, C.; ALVARADO-CAPÓ, Y.; ACOSTA-SUÁREZ, M.; ROQUE, B.; LEIVA-MORA, M.; FREIRE-SEIJO, M. Identificación y control de *Bacillus* sp., contaminante del establecimiento in vitro de *Guadua angustifolia* Kunth. **Bioteología Vegetal** v. 7, n.1, p. 9-13. 2007

DANTAS, P. V. P.; SILVA, E. R. A.; TENORIO, R. R.; TORRES, G. R. C.; HOULLOU, L. M. Solubilização de fosfato inorgânico por bactérias endofíticas do bambu. **Anais. Simpósio Mineiro de Ciência do Solo**, 3, Viçosa, MG, 2015. p. 403-40.

DANTAS, P. V. P. **Prospecção biotecnológica de fungos endofíticos de bambu (*Bambusa vulgaris*) micropropagado na produção de enzimas e atividade antimicrobiana.** 83f., 2017. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) UFPE, Vitória de Santo Antão, PE.

DARMA, R.; PURNAMASARI, M. I.; AGUSTINA, D.; PRAMUDITO, T. E.; SUGIHARTI, M.; SUWANTO, A. A Strong antifungal-producing bacterium from bamboo powder for biocontrol of *Sclerotium rolfsii* in melon (*Cucumis melo* var. *amanta*). **Journal of Plant Pathology & Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 2-7. 2016.

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

FILGUEIRAS, T. S.; VIANA, P. L. Bambus brasileiros: morfologia, taxonomia, distribuição e conservação. In: DRUMOND, P. M.; WIEDMMAN, G. **Bambus no Brasil: da Biologia à Tecnologia.** ICH: Rio de Janeiro, 2017. p.10-27.

FILGUEIRAS, T. S.; GONÇALVES, A. P. S. A checklist of the basal grasses and bamboos in Brazil (Poaceae). **Bamboo Science and Culture**. v. 18, n. 1, p. 7-18. 2004.

GUERREIRO, C. I., LIZARAZU M. A. Flowering of *Bambusa tuldoides* (Poaceae, *Bambusoideae*, *Bambuseae*) in southern South America. **Darwiniana**, v. 48, n. 1, p. 25-31. 2010.

GUILHERME, D. O.; RIBEIRO, N. P.; CEREDA, M. P. Cultivo, manejo e colheita do bambu. In: DRUMOND, P. M.; WIEDMMAN, G. **Bambus no Brasil: Da Biologia à Tecnologia.** ICH: Rio de Janeiro, 2017. p. 28-29.

LIZARAZU, M. A.; AGRASAR, Z. R.; VEGA, A. S. A new species of *Guadua* (Poaceae, *Bambusoideae*, *Bambuseae*) and synopsis of the genus in Argentina and Neighboring Regions. **Systematic Botany**, v. 38, n. 4, p. 1062-1075. 2013

LONDOÑO, X.; ZURITA, E. Two new species of *Guadua* (Bambusoidea: Guaduinae) from Colombia and Bolivia. **Journal of the Botanical Research Institute of Texas**, v. 2, n. 1, p. 25-34. 2008.

LONDOÑO, X. **Identificación taxonômica de los bambues de la región noroccidental del Perú**. Lima: ITTO, 2010. 36.p

MELATTI, M. V.; MARTINS E; PRAÇAL. B; BERRY, C; SUJII E; MONNERAT, R. G. **Elaboração de metodologia de bioensaio seletivo e de dose de *Bacillus thuringiensis* contra o pulgão do algodoeiro (*Aphis gossypii*)**. Brasília: SPI Embrapa. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 12). 2008. 12p.

NAIR, D. N.; PADMAVATHY, S. Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. **The scientific world journal**, 2014. 11p. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2014/250693>>. Acesso em 05.02.2019.

OLIVIER, J.; PONCY, O. A taxonomical revision of *Guadua weberbaueri* Pilg. and *Guadua sarcocarpa* Londonõ & P.M. Peterson (Poaceae). **Candollea**, v. 64, n. 2, p. 171-178. 2009.

PAZ, I. C. P. **Bactérias endofíticas de eucalipto e potencial uso no controle de doenças e promoção de crescimento de mudas em viveiros florestais**. 2009. 129f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

PELCZAR JR., M. J., CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R., **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**, v. 1, 2.a ed., São Paulo: MAKRON Books. 1996.

PEREIRA, M. A. R.; BERALDO, A. L. **Bambu de corpo e alma**. Bauru, SP: Canal 6. 2007. 240 p.

RAMÍREZ, L. A.; CASTAÑO, S. M.; LÓPEZ, R. Identificación de bacterias que afectan el establecimiento in vitro de segmentos nodales de *Guadua angustifolia* Kunth. **Revista de Investigaciones Universidad del Quindío**. v. 1, n. 1, p. 151–158. 2009.

RAY, S. S.; ALI, M. N.; MUKHERJEE, S.; CHATTERJEE, G.; BANERJEE, M. Elimination and molecular identification of endophytic bacterial contaminants during in vitro propagation of *Bambusa balcooa*. **World Journal Microbiol Biotechnology**, v. 33, n. 2, p. 2-9. 2017.

SILVA, M. A. B; MELO. L. V. L; RIBEIRO, R. V; SOUZA, J. P. M; LIMA, J. C. S.; MARTINS. D. T. O.; SILVA R. M. C. Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como anti-hiperlipidêmicas e anorexígenas pela população de Nova Xavantina, MT, Brasil, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 549-562. 2010.

SAHARAN, B. S.; NEHRA, V. Plant growth promoting rhizobacteria: A critical review. **Life Sciences and Medicine Research**, v. 21, n. 1, p. 1-30. 2011.

SANTOS, M. P. **Fixação de N₂, Solubilização de Fosfato e Produção de AIA por estirpes de *Bradyrhizobium* simbióticas em Angico Vermelho e Tamboril**. 70f., 2013. Dissertação (Mestrado em Microbiologia e Bioquímica do Solo) – Ufla, Lavras, MG.

SILVA, R. M. C. **O Bambu no Brasil e no mundo**. 2010. Disponível em: < http://www.embambu.com.br/imagens/bambu_brasil_mundo.pdf>. Acesso em: 20.fev.2019.

SILVEIRA, M. A. **A Floresta aberta com bambu no sudoeste da Amazônia: padrões e processos em múltiplas escalas**. Rio Branco: Editora da Ufac. 2005. 153p.

SUNGKAEW, S.; STAPLETON, C. M. A.; SALAMIN N., HODKINSON, T. R. Non-monophyly of the woody bamboos (Bambuseae; Poaceae): a multi-gene region phylogenetic analysis of Bambusoideae. **Journal of Plant Research**, v. 122, n. 1, p. 95-108. 2009.

SURETTE, M. A.; STURZ, A. V.; RAJASEKARAN, R. L.; NOWAK, J. Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. sativus): their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. **Plant and Soil**, v. 253, n. 2, p. 381-390. 2003.

TARAZI, M. F. A. **Comunidade endofítica de microplantas de abacaxizeiro: estrutura, diversidade e a sua influência na morfofisiologia após antibióticoterapia**. 2010. 137f., Tese (Doutorado em Ciências) – USP, Piracicaba, SP.

TORRES, G. R. C., HOULLOU, L. M., DE SOUZA, R. A. Control of contaminants during introduction and establishment of *Bambusa vulgaris* in vitro. **Research in Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 58-67. 2016.

TSAVKELOVA, E. A.; KLIMOVA, Y. S.; CHEDYNTSEVA, T. A.; NETRUSOV, A. I. Microbial producers of plant growth and their practical use: a Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**. v. 42, n. 2, p. 117-126. 2006.

VENDAN, R. T.; Yu, Y. J.; LEE, S. H.; RHEE, Y. H. Diversity of endophytic bacteria in Ginseng and their potential for plant growth promotion. **The Journal of Microbiology**. v. 48, n. 5, p. 559-565. 2010.

WYSOCKI, W. P.; CLARK, L. G.; ATTIGALA, L.; RUIZ-SANCHEZ. E.; DUVALL, M. R. Evolution of the bamboos (Bambusoideae; Poaceae): a full plastome phylogenomic analysis. **BCM Evolutionary Biology**, v. 15, n. 1, p. 1-50. 2015.