



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTI-INSTITUCIONAL EM  
BIOTECNOLOGIA**

**PROPAGAÇÃO DE CASTANHA-DA-AMAZÔNIA (*BERTHOLLETIA  
EXCELSA* BONPL.) POR MINI E MICROESTAQUIA, COM AUXÍLIO DE  
RIZOBACATÉRIAS (*Bacillus spp.*).**

**JÚLIO CÉZAR DEFINO RIBEIRO**

MANAUS/AM  
2023



**JÚLIO CÉZAR DELFINO RIBEIRO**

**PROPAGAÇÃO DE CASTANHA-DA-AMAZÔNIA (*BERTHOLLETIA EXCELSA* BONPL.) POR MINI E MICROESTAQUIA, COM AUXÍLIO DE RIZOBACATÉRIAS (*Bacillus spp.*).**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (PPGBIOTEC) como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Na área de Biotecnologia na produção florestal.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Eiji Hanada

**MANAUS-AM**

**2023**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

R484p Ribeiro, Júlio César Delfino  
Propagação de castanha-da-amazônia (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) por mini e microestaquia, com auxílio de rizobactérias (*Bacillus* spp). / Júlio César Delfino Ribeiro . 2023  
72 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Rogério Eiji Hanada  
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Palavras-chave. 2. Prospecção. 3. Isolamento. 4. Mix. I. Hanada, Rogério Eiji. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me permitir.

Aos meus pais, Lourdes Delfino Ribeiro e Bruno Ribeiro (*in memoriam*).

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas pelos conhecimentos repassados.

À CAPES pela importante contribuição financeira.

Ao meu orientador, Dr. Rogério Eiji Hanada, abnegado colaborador e educador.

Ao meu amigo, Mestre Luis (Tirico) pela inestimável colaboração e ensinamentos.

À minha família pela colaboração, minha filha e genro e minhas netas Bia e Bela, minhas fontes de inspiração.

Dedico esta peça aos à memórias dos meus pais Dona **Lourdes** e o **Sr. Bruno Ribeiro**.



## RESUMO

A Amazônia é a maior área de floresta tropical do planeta, apresentando uma rica biodiversidade em sua flora. Neste contexto, depara-se com a interessante e importante *Bertholletia excelsa*, cuja madeira e castanha têm grande valor comercial e é fonte de renda para os povos da floresta. O objetivo deste trabalho é avaliar a propagação vegetativa da *Bertholletia excelsa* pela técnica de mini e microestquia, com auxílio de Rizobactérias (*Bacillus spp*). Para isso, mudas de castanheiras foram decapitadas e seus botos retirados, excisados e inoculados com os mixes de rizobactérias. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, constituído de 6 tratamentos (5 mixes e testemunhas) com 6 repetições, sendo 1 miniestaca para cada repetição. Os dados foram disponibilizados em tabela no excel. As variáveis analisadas foram: sobrevivência, formação de calos, formação e comprimento das raízes das miniestacas. De acordo com a análise estatística, a sobrevivência das miniestacas tratadas com rizobactérias x testemunhas apresentaram diferença significativa ( $p < 0,01$ ), nas outras variáveis não houve variação significativa. O mix MAO5PB, constituído pelos bacilos MAOPB12A, 12K, 12L, 12J e 12C, através de análise qualitativa, foi selecionado como o mais produtivo e as 5 bactérias que o constituem foram identificadas molecularmente: PB12A como *Bacillus wiedmannii*; 12K como *B. paramycoides*; 12L como *Lysinibacillus fusiformis*; 12J como *B. paramycoides* e 12C como *Lysinibacillus fusiformis*. Com os resultados obtidos nesta pesquisa, pode-se inferir que é possível propagar *B. excelsa* através da técnica de miniestquia auxiliada por rizobactérias e contribuir para diminuir a pressão na floresta, com a recuperação de áreas degradadas, aumentar a produção comercial e favorecer os pequenos produtores na cadeia de produção de madeira e castanha da *B. excelsa*. No segundo experimento, de micropropagação, os explantes foram seguimentos nodais de brotos (200) de plantas decapitadas, que foram desinfestados com solução a 1,5% (testada) de hipoclorito de sódio, para estabelecimento da cultura os explantes foram inoculados em meio  $\frac{1}{2}$  MS enriquecido com citocinina testados com dosagens de BAP (1,5; 3,0; 4,5 e 6,0 mg. L<sup>-1</sup>) e não conseguiram brotar em 6 meses.

**Palavras-chave:** prospecção, isolamento, mix.



## ABSTRACT

The Amazon is the planet's largest area of tropical forest, presenting a rich biodiversity in its flora. In this context, we come across the interesting and important *Bertholletia excelsa*, whose wood and chestnut have great commercial value and are a source of income for forest people. The aim of this work is to evaluate the vegetative propagation of *Bertholletia excelsa* by the mini and micro-cutting technique, with the aid of Rhizobacteria (*Bacillus* spp). For this, seedlings of chestnut trees were decapitated and their sprouts were removed, excised and inoculated with the rhizobacteria mixes. The experiment was conducted in a completely randomized design, consisting of 6 treatments (5 treatments and controls) with 6 replications, with 1 mini-cutting for each replication. The analyzed variables were: survival, callus formation, mini-cutting root formation and length. According to statistical analysis, the survival of mini-cuttings treated with rhizobacteria x controls showed a significant difference ( $p < 0,01$ ), in the other variables there was no significant variation. The MAO5PB mix, consisting of MAOPB12A, 12K, 12L, 12J and 12C bacilli, through qualitative analysis, was selected as the most productive and the 5 bacteria that constitute it were molecularly identified: PB12A as *Bacillus wiedmannii*; 12K as *B. paramycoides*; 12L as *Lysinibacillus fusiformis*; 12J as *B. paramycoides* and 12C as *Lysinibacillus fusiformis*. With the results obtained in this research, it is possible to propagate *B. Excelsa* through mini-cutting technique with the aid of rhizobacteria and contribute to reducing the pressure on the forest, with the recovery of degraded areas, increase commercial production and favoring small producers in the wood production chain and *B. Excelsa* chestnut. In the second experiment, of micropropagation, the explants were nodal segments of shoots (200) of decapitated plants, which were disinfested with a 1,5% solution (tested) of sodium hypochlorite, to establish the culture the explants were inoculated in  $\frac{1}{2}$  Cytokinin-enriched MS tested with BAP dosages (1,5; 3,0; 4,5 and 6,0 mg. L<sup>-1</sup>) and failed to sprout at 6 months.

**Keywords:** prospection, isolation, mix.



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição de bactérias do Mix MAO5PB em Manaus-AM no ano de 2018/2019 .....	<b>34</b>
---	-----------

## LISTA DE FIGURASA

<b>Figura 1.</b> Location of Aruna Farm situated on Itacoatiara-AM.....	29
<b>Figura 2.</b> MAO5PB mix entrose among the 5 tratad with rizobacteriis .....	36
<b>Figura 3.</b> Aspectos macroscópcos de <i>Phomopsis</i> sp (cultivado em BDA) .....	41
<b>Figura 4.</b> Aspectos macroscópcos de <i>Aspergillus</i> sp . (cultivado em BDA).....	42
<b>Figura 5.</b> Aspectos macroscópcos de <i>Phoma</i> sp ((cultivado em BDA).....	43
<b>Figura 6.</b> Aspectos macroscópcos de <i>Ladioplodía</i> sp (ultivaso em BDA).....	44



## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>8</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>10</b>
<b>2.1 A CASTANHEIRA-DO-BRASIL (<i>Bertholletia excelsa</i>)</b>	<b>10</b>
<b>2.2 PROPAGAÇÃO SEXUADA E ASSEXUADA</b>	<b>12</b>
2.2.1 Propagação Sexuada	12
2.2.2 Propagação Assexuada	13
2.2.3 Estaquia	13
2.2.4 Miniestaquia	14
2.2.5 Microestaquia	16
<b>2.3 BACTÉRIAS</b>	<b>18</b>
2.3.1 Bactérias como Organismos	18
2.3.2 Rizobactérias	21
<b>2.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR</b>	<b>23</b>
<b>2.5 BIOECONOMIA</b>	<b>25</b>
2.5.1 O Brasil e a Bioeconomia	25
2.5.2 Socibiodiversidade	26
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
<b>3.1 OBJETIVO GERAL</b>	<b>27</b>
<b>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>27</b>
Capítulo I	27
Capítulo II	38
<b>4. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES</b>	<b>52</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>53</b>
<b>6. APÊNDICES</b>	<b>64</b>
<b>7. ANEXOS</b>	<b>68</b>



## 1. INTRODUÇÃO

A Amazônia abrange uma área de cinco milhões de quilômetros quadrados com cerca de 60% no território nacional. Este bioma possui nichos ecológicos em terra firme e de várzeas, representados por florestas tropicais que estão sendo degradadas a uma taxa de 0,9% ao ano, (Almeida e Tertuliano 2005). Destarte, o estado do Amazonas é uma das unidades que constituem a Amazônia brasileira. Esta apresenta uma logística que possui uma gama de entraves e interrupções nas cadeias de produção das grandes culturas, que provocam solução de continuidade, e assim um aumento nos custos de produção, para toda a cadeia, em cerca de 40% em relação ao restante do país (SOUZA e LOUREIRO, 2019).

Como uma espécie exemplar, a castanheira (*Bertholletia excelsa*) é uma árvore da Amazônia, seu fruto é de grande importância para a região (CLAY, 1997), ela é popularmente conhecida por castanha-do-pará, porém em 1961 ela foi nominada de castanha-do-brasil – para efeito comercial – através do decreto de lei nº 51.209, de setembro de 1961 (BRASIL, 1961).

Em análise comercial, (CAMARGO, 2020), entre 1997 e 2017 o Brasil exportou US\$ 1,23 trilhões e empregou mais de 30 milhões de pessoas, no entanto o consumo de castanhas e nozes no mundo vem subindo na base de 6% ao ano, este segmento apresenta 18% das exportações do país. Continuando, no primeiro trimestre de 2019, o Brasil exportou 3,05 mil toneladas, quantidade bastante inferior ao de 2018, que foi de 6,3 mil toneladas, quanto aos preços, a queda também foi significativa. O preço médio, pago pelo produto com casca, diminuiu de US\$ 2,09 para US\$1,25.kg<sup>-1</sup>, queda de 32,4% e o produto sem casca de US\$ 8,69 para US\$5,88.kg<sup>-1</sup>. A queda das exportações de 2018 para 2019 deu-se, principalmente, devido as não aquisições de Bolívia e Peru, que são os maiores importadores brasileiro (PENNACCHIO, 2019).

A propagação vegetativa pode resolver o problema de oferta de produtos da castanheira. (Xavier e Silva, 2009), em anos anteriores, estudos propiciaram

o desenvolvimento de técnicas de propagação vegetativa conhecidas como miniestaquia e microestaquia, que reduziram dificuldades encontradas em algumas espécies, em especial, no enraizamento de mudas. Atualmente, estudos mostram a importância do uso de rizobactérias na propagação vegetativa.

Em suma, este estudo procurará estabelecer uma técnica de propagação vegetativa (mini e microestaquia) da *B. excelsa*, com utilização de mix de rizobactérias (*Bacilos* spp), que venha contribuir com a produção comercial de castanha, madeira e, também, com o alívio da pressão sobre a floresta.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 A CASTANHEIRA-DO-BRASIL (*Bertholletia excelsa*)

*Bertholletia excelsa*, espécie popularmente denominada de castanheira-do-brasil, foi descrita, em 1808, pelo botânico francês Aimé Jacques Alexandre Goujoud Bonpland, o nome genérico, *Bertholletia*, é uma homenagem ao médico, químico e fisiologista francês Claude Louis Berthollet e *excelsa*, significa majestosa, devido a sua altura que pode atingir 60 m e diâmetro do tronco com até pouco mais de 5 metros (SALOMÃO, 2014).

Chamado de carne vegetal, o fruto da *B. excelsa* apresenta o dobro do teor de proteína em relação a um bife bovino, e possui alto teor proteico, calórico e mineral (Shanley et al., 2010). Já a madeira é uma boa fonte de celulose, adequada para construção civil e naval, além de resistir aos ataques de organismos xilófagos (CARVALHO, 2012).

(Mori e Prance, 1990), a castanheira pode ter como centro de origem o sudeste da Amazônia. Ela está distribuída por toda a região amazônica, sendo com maior evidência na Amazônia brasileira, nos estados do Pará, Amazonas, Acre, Rondônia, Roraima, Tocantins e norte de Goiás e Mato Grosso, e nos países como Peru, Bolívia, Venezuela, Guianas e Colômbia (MÜLLER, 1995), (MORI e PRANCE, 1990).

Sobre a diversidade de diferentes espécies de castanheira, Braga (2007) observou que castanheiros no Estado do Acre, em Brasiléia e Xapuri, classificam as castanheiras de acordo com as características morfológicas, como a forma da copa, daí iniciaram uma pesquisa para verificar essas informações etnobotânicas. Ele informou que no Vale do Rio Acre os extrativistas distinguem dois tipos de castanheira, a vermelha e a branca e um terceiro tipo a castanheira rosa, porém ele não considerou consistente esta informação a respeito do terceiro tipo, pois foi passada por poucos extrativistas.

Na mesma linha, Camargo, (2010) em seus estudos de etnoconhecimento e variabilidade morfológica, registrou que os agroextrativistas, de origem sulista, instalados em assentamentos no município de Cotriguaçu, região noroeste do estado de Mato Grosso, aprenderam a classificar as castanheiras de acordo com os etnoconhecimentos transferidos a eles, quando em contato com a etnia Paiter Suruí. Estes fazem a identificação da *B. exce/sa* de acordo com três tipos etnoclassificados: rosa, rajada e mirim.

Destarte, nos estudos de Guarim Neto *et.al.* (2010) para a região amazônica do estado do Mato Grosso, eles sugeriram que quando a exploração madeireira intensiva se dá de maneira seletiva – espécies de grande valor econômico – pode ocasionar a extinção destas espécies, como é o caso da castanheira, que está paulatinamente desaparecendo.

Comercialmente, a produção de castanheira no Brasil, teve início com os plantios em sistemas agroflorestais, pelos imigrantes japoneses em Tomé-Açu (1929) e Parintins (1931). A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Amazônia Oriental, na década de 1980, iniciaram os plantios em grandes áreas, utilizando técnicas de formação de mudas e de enxertia, estes empreendimentos apresentaram dificuldades de viabilidade econômica. O Brasil perdeu a sua hegemonia, na comercialização de castanha para a Bolívia, e não houve solução para o problema da oferta deste produto, que seria a de incrementar a produção comercial, sendo que o sistema agroflorestal é a forma mais apropriada para viabilizar economicamente a produção, é o que se apresenta para o futuro (HOMMA, 2014).

A produção de castanha apresenta sua maior concentração na Região Norte, representando 95,9% do que produz o Brasil, onde temos o Acre com 35,5%, Amazonas com 30,8% e Pará com 23,5%, faz-se importante registrar que hoje, somente, cerca de 2% da produção nacional é proveniente de áreas cultivadas (Maués *et al.*, 2015). Continuando, devido a não produção comercial, o Brasil perdeu a sua hegemonia na comercialização de castanha para a Bolívia, e ainda não houve solução para o problema da oferta deste produto (Homma *et al.*, 2014), pois os preços

internos satisfazem os extrativistas. Neste contexto, as inoculações simples ou mistas de bactérias promotoras de crescimento de plantas podem estimular o crescimento da produção. (CANELLAS *et al.*, 2015).

As reservas de castanheiras produzem serviços de provisão, serviços ambientais e culturais, levando em consideração essa perspectiva, os custos socioambientais totais da destruição dos castanhais. No período de 1990 a 2010, somente no estado do Pará, foram de R\$ 21,61 milhões por ano, sendo que nenhuma compensação foi realizada. O custo desse passivo, já constatado, é da ordem de R\$ 540,25 milhões a serem pagos aos extrativistas daquela região. A economia considera este fato com uma externalidade, ou seja, o mercado não tem como alocar estes recursos, no próprio mercado, para indenizar os extrativistas (SANTANA *et al.*, 2016).

## 2.2 PROPAGAÇÃO SEXUADA E ASSEXUADA

As plantas se propagam tanto por via sexual como por via assexuada. A transmissão das características da planta depende dos genes presentes nos cromossomos. A soma total dos genes determina o genótipo da planta. Em combinação com o ambiente, o genótipo produz uma planta com uma determinada aparência que chamamos de fenótipo.

### 2.2.1 Propagação Sexuada

A propagação sexuada permite a obtenção de outra planta com grandes variações, porém semelhantes à sua progenitora, mas não são idênticas. A variabilidade é consequência da sua genética, recombinação de genes e também a segregação, que se dá no processo sexual (MENDONÇA *et al.* 2012).

Fernandes, (2015), asseverou que, quando o propósito desejado for a produção de propágulos para recuperação de áreas degradadas ou recomposição de áreas de proteção ambiental, o uso de sementes é mais apropriado, levando-se em consideração a variabilidade genética.

## 222 Propagação Assexuada

A propagação vegetativa é o processo de multiplicação que ocorre através de mecanismos de divisão e diferenciação celular.

De acordo com Mendonça *et al.* (2012), a propagação vegetativa se dá por meio da regeneração de partes da planta mãe, ela resume-se ao uso destas partes, sejam elas estacas da parte aérea ou da raiz, gemas ou outras estruturas especializadas, ou ainda meristemas, ápices caulinares, calos e embriões, acontecendo a regeneração por multiplicação mitótica, sem alteração do genótipo.

Estes autores afirmam ainda, que Continuando com o mesmo autor, a propagação baseia-se nos seguintes princípios:

- **Totipotência:** as células da planta contêm todas as informações genéticas para que uma espécie se reconstrua, assim como suas funções;
- **Diferenciação:** as células maduras podem retornar às condições meristemáticas, pois são células somáticas e, por consequência, os tecidos apresentam a capacidade de regeneração de órgãos adventícios e desenvolvem um novo ponto de crescimento.

Os principais processos artificiais de propagação assexuada são: Estaquia, Mergulhia, Alporquia, Enxertia e Cultura de Tecidos.

## 223 Estaquia

Dentre os principais processos de propagação vegetativa, destaca-se a estaquia, que é o processo de propagação assexuada, onde pequenas partes das hastes, folhas ou raízes são postas sob condições que favorecem o enraizamento ou desenvolvimento da copa, formando uma nova planta.

A estaquia pode ser influenciada por diversos fatores, que podem ser inerentes à própria planta ou ao meio ambiente.

Dentre os fatores que podem aumentar a formação de raízes, destaca-se a presença de folhas na estaca, o uso de reguladores de crescimento (favorecendo o

balanço hormonal), o estágio de desenvolvimento da planta e do próprio ramo, além da época do ano em que as estacas são coletadas (HARTMANN, 2011).

O método de propagação vegetativa por enraizamento de estacas é uma alternativa para diversas fruteiras cultivadas, propiciando proveitos na questão do declínio da produção e a precocidade, como também a conservação das características genéticas da planta original.

Este método apresenta resultados que variam conforme a condição fisiológica e idade da planta matriz, o tipo e a época da coleta da estaca, potencial genético do enraizamento, da sanidade do material e do balanço hormonal: que são fatores internos.

Da mesma forma, os fatores externos como a luminosidade, a temperatura, a umidade e o tipo de substrato. Estes fatores, também, podem influenciar o enraizamento das estacas, isoladamente ou em conjunto, principalmente as condições fisiológicas da planta matriz (presença de carboidratos, substâncias nitrogenadas, aminoácidos, auxinas, compostos fenólicos e outras substâncias não identificadas).

A época de coleta, posição das estacas, juvenilidade, estiolamento, presença de folhas e gemas, idade da planta matriz e fatores ambientais, como disponibilidade de água, luminosidade e substrato, são fatores determinantes no sucesso deste tipo de propagação (VERNIER e CARDOSO, 2012). Ainda os mesmos autores informaram que os estimulantes de enraizamento de estacas, como as auxinas, têm sido utilizados com sucesso em plantas frutíferas e considerados essenciais no enraizamento, devido a necessidade do equilíbrio entre promotores e inibidores do processo de iniciação radicular.

#### 2.2.4 Miniestquia

Segundo, Fernandes *et al.* (2018), a grande preocupação, quanto à produção de mudas, é o índice de enraizamento de miniestacas, uma vez que ela vai inferir na viabilidade econômica do viveiro, e ainda que a nova técnica de propagação

assexuada, denominada por miniestaquia, aproveita o potencial juvenil dos propágulos para induzir o enraizamento, sendo que este depende dos seguintes fatores: temperatura, umidade, composição química e física do substrato, adubação, luminosidade, fotoperíodo, juvenilidade dos brotos, a posição do broto nas estacas, diâmetro das estacas, a presença de gemas e/ou folhas, efeito do período de coleta das estacas e tratamento e/ou acondicionamento dos brotos e estacas antes da estaquia. Ainda os mesmos autores, publicaram que estes fatores podem ser manejados, levando-se em consideração o material genético produzido, especificadamente, da necessidade de manejo, visando a maximização da produtividade.

A técnica de miniestaquia pode ser uma alternativa para produção comercial de mudas florestais, principalmente para aquelas que têm dificuldades de enraizamento do material adulto. Pode-se destacar que a miniestaquia é vantajosa no que se refere a diminuição do tempo de enraizamento e também de aclimação. (FERRIANI, 2010).

O método de propagação por miniestaquia é uma técnica que consiste na coleta de brotações de plantas provenientes de estaca enraizada pelo método tradicional de estaquia ou de mudas seminais (ANDREJOW, 2006).

A miniestaquia é executada podando-se os ramos da planta para estimular o lançamento de brotações, que são coletadas em intervalos regulares e estaqueadas em casa de vegetação, onde terão origem as mudas. Em relação ao método de estaquia convencional, a miniestaquia apresenta as vantagens de dispensa do jardim clonal de campo, maior produção de propágulos (miniestacas) por unidade de área, necessidade de menores concentrações ou dispensa de reguladores de crescimento vegetal, redução dos custos com transporte e coleta das brotações, maior eficiência das atividades de manejo no jardim miniclinal: irrigação, nutrição, manutenções e controle de pragas e doenças (FIGUEIREDO et al., 2013; WENDLING, 1999).

De modo geral, as miniestacas apresentam maior sensibilidade às condições ambientais, quando comparadas às estacas convencionais, principalmente pelo fato



de o material vegetativo ser mais tenro e manejado de forma intensiva. O maior controle das condições ambientais e uma nutrição balanceada no jardim miniclinal poderão favorecer o método da miniestaquia (WENDLING *et al.*, 2005).

Mesmo assim, as empresas, em sua maioria, que trabalham com o eucalipto através da propagação clonal, utilizam a técnica de miniestaquia por esta ser uma opção para a propagação vegetativa de certos clones, principalmente aqueles que têm dificuldades na técnica de cultura de tecidos e inviabilizam a microestaquia (XAVIER e WENDLING, 1998).

Na mesma linha, a técnica da miniestaquia, em relação a da microestaquia, considerando que na miniestaquia não existe necessidade de estruturas de laboratório de cultura de tecidos, pode ser considerada como uma boa estratégia, pois reduz o custo na produção das mudas. Só se pode usar a vantagem do custo quando se tem uma situação de igualdade nos resultados de eficiência das duas técnicas.

No entanto, a miniestaquia é viável quando se observa dificuldades no cultivo *in vitro*, como é o caso da recalcitrância, necessidades de ajuste de meio de cultura e outros que inviabilizam a micropropagação. Contudo, cada técnica apresenta vantagens e dificuldades associadas a custo e tempo, e certos clones são de difícil propagação. Por outro lado, existem clones com grande facilidade de propagação vegetativa e que permite procedimentos mais simples, de menor custo, daí a estaquia/miniestaquia, podem atender ao processo de produção de mudas de *Eucalyptus* de forma eficiente (XAVIER, *et al.*, 2001).

## 2.2.5 Microestaquia

A cultura de tecidos vegetais é um conjunto de técnicas do cultivo *in vitro* de células vegetais (explantos), desenvolvido num meio nutritivo sintético, tendo uma composição claramente definida, levando em consideração a assepsia, a nutrição e fatores ambientais como luz, temperatura, O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, para gerar uma planta. Esta técnica tem importância, na prática, para as áreas agrícolas e florestais, bem como para a área científica básica, como a biologia de plantas, devido a técnicas mais

polivalentes, ela apresenta uma alternativa à manipulação de plantas em nível molecular. Assim sendo, a micropropagação propaga plantas *in vitro* a partir de ápices meristemáticos ou segmento nodal, com objetivo de produção de mudas em grande escala (QUISEN e ANGELO, 2008), se trata de uma ferramenta biotecnológica.

A priori, totipotencialidade é a capacidade das células em gerar uma nova planta inteira e geneticamente idêntica às plantas mãe, a partir de um explante. Esta é a base do cultivo *in vitro* de plantas: técnica de propagação assexuada que ocorre em condições assépticas e controladas (Torres *et al.* 2000; Palma *et al.* 2011; Xiao *et al.* 2011).

Destarte, a micropropagação ou propagação vegetativa *in vitro* já vem sendo utilizada em nível comercial em diversos países, inclusive no Brasil, sendo a técnica de cultura de tecidos de plantas a que apresenta aplicação mais difundida e concreta, (GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

XAVIER *et al.*, 2001 demonstraram, conforme se segue, os cuidados a se ter na cultura *in vitro*: as fontes de explantes, para inoculação *in vitro*, provêm de matrizes cultivadas em ambiente protegido, mini ou microjardim clonal, brotações epicórmicas de árvores adultas, brotações de árvores decepadas ou ainda de galhos podados, devendo seguir as seguintes etapas:

Desinfestação: na cultura do eucalipto, a desinfestação superficial de explantes é relativamente simples se utilizado material juvenil retirado de plantas cultivadas em ambientes protegidos. Porém, é mais difícil de obter material limpo e viável de brotações de material oriundo do campo, nesta etapa, em função do tipo e origem do explante, da época do ano e do ambiente onde são coletados, os explantes podem sofrer variações.

Multiplicação: neste momento, o objetivo é a proliferação dos explantes, mantendo-se a estabilidade genética. Os explantes são inoculados em meio de cultura contendo combinações de auxinas e citocininas, dependendo da espécie e do tipo de explantes.

Alongamento: neste momento o objetivo é preparar as brotações para o enraizamento. O desejável é que o alongamento e a etapa anterior ocorram ao mesmo tempo. Em materiais genéticos de difícil propagação *in vitro*, existe a necessidade de uma fase de alongamento em meio de cultura próprio, normalmente é adicionada giberelina(GA) ao meio de cultura, embora alongamento de brotações também seja obtido com diversas combinações entre BAP, ANA, AIB e GA<sub>3</sub>, ou então reduz-se a concentração de citocininas utilizadas na fase de multiplicação.

Enraizamento: neste momento, as brotações são induzidas ao enraizamento, sendo que se utiliza tanto o enraizamento *in vitro* quanto *ex vitro*. No enraizamento *in vitro*, as brotações alongadas são subcultivadas em meio para enraizamento contendo auxina, geralmente o AIB.

Acimação: nesta última etapa da micropropagação, busca-se diminuir o estresse causado pela diferença entre os ambientes *in vitro* e *ex vitro*, ela é realizada em ambiente sombreado, neste momento ocorrem grandes perdas de explantes, logo após as plantas são levadas para área de pleno sol, onde ocorre a rustificação e o crescimento.

A sequência e o número de fases do processo de micropropagação podem ser alterados em função da espécie e dos objetivos.

## 2.3 BACTÉRIAS

### 2.3.1 Bactérias como Organismos

O crescimento da população humana, possivelmente, demandará maior produção de alimentos. Com a tecnologia mais utilizada, atualmente, por meio de sistemas agrícolas intensivos que promovem problemas ambientais, a resolução, deste problema exigirá estratégias agrícolas sustentáveis, que incluam um sistema de gestão de nutrientes dos solos cultivados sem prejudicar o meio ambiente.

Sendo assim, segundo Canellas *et al.* (2015) uma alternativa promissora para este problema está na inoculação de microrganismos capazes de aumentar a

disponibilidade de nutriente e a capacidade de absorção pelas plantas. As inoculações simples, ou mistas, de bactérias promotoras de crescimento de plantas, podem estimular o crescimento destas através de alguns mecanismos, como: fixação biológica de nitrogênio, síntese de hormônios, solubilização de fosfato, controle biológico de patógenos e outros.

As bactérias promotoras de crescimento de plantas são organismos microscópicos, unicelulares e procarióticos. Elas apresentam uma morfologia simplificada, a maioria está nas formas comuns: cocos, bacilos e espiralados e outras em formas especiais: quadradas e estreladas. Os bacilos existem na forma de bastonetes, curtos ou longos, com diâmetro médio de  $0,5\mu\text{m}$  e variando seu comprimento em  $1\mu\text{m}$  ou mais, com extremidade reta ou de ponta arredondada, ou ainda curvos, em forma de vírgula. Eles têm apenas um plano de divisão, apresentando os seguintes arranjos: a) diplobacilo: aos pares e; b) estreptobacilo: em cadeia, com três ou mais células. Algumas destas bactérias se apresentaram na forma de letra chinesa e paliçada (*Corynebacterium*), dependendo do gênero, fase de crescimento ou do meio de cultura, muitos não apresentam arranjos, permanecendo isolados (NASCIMENTO, 2016; NOGUEIRA e MIGUEL, 2009).

Madigan *et al.* (2010); VILLARREAL-DELGADO *et al.* (2018) deram como classificação do *Bacillus*: Gênero *Bacillus*, Filo Firmicutes, Classe Bacilli e Família Bacillaceae.

Eles são compostos por bactérias gram-positivas ou negativas, são resistentes ao calor e dessecação, sendo tipicamente representados por células aeróbicas ou anaeróbicas facultativas móveis, por flagelos. Estas bactérias produzem endósporos, possuem diferentes processos fisiológicos e metabólicos, podendo ser isolados de diversos substratos e habitats, porém são mais frequentes nos solos, pois são saprófitas, vivendo de diversas matérias orgânicas e inorgânicas (BRAVO *et al.*, 2011; SOARES-DA-SILVA *et al.*, 2015).

Continuando, o método de reprodução mais importante que ocorre com as bactérias é a divisão binária transversal ou simples, sendo que a população cresce na

forma de progressão geométrica. Elas podem se reproduzirem num tempo muito curto (15 minutos) ou em tempo muito longo (932 minutos). Segundo NOGUEIRA e MIGUEL (2009) se puder ser estudada esta reprodução, podemos estipular as fases destes processos:

a) Fase Lag, fase adaptativa ou de latência da bactéria, quando se dá intenso metabolismo, porém não acontece a multiplicação. Esta fase é bastante variável conforme a espécie, algumas levam horas e outras, dias. As bactérias vão aumentando o seu tamanho, desde a sementeira, mantendo inalterada, temporariamente, sua população. Elas se encontram muito ativas e podem estar deficientes em enzimas/coenzimas que precisam sintetizar;

b) Na fase Log ou exponencial, a população começa a ter capacidade de se dividir em ritmo constante, tendo uma velocidade máxima de crescimento e a população uniforme, duplicando a população a cada geração. Nesta fase, acontece intensa atividade metabólica e as células são sensíveis, pois estão em fase de formação dos componentes celulares;

c) Fase estacionária ou fase Platô, fase em que o número de células novas sendo geradas diminui, equivalendo-se ao número de células destruídas pelo próprio metabolismo e escassez nutricional. Desta forma, a população continua se multiplicando, mas não cresce, torna-se estável e com alta competitividade por espaço e nutrientes. Nesta fase, as bactérias capazes de formar esporos, iniciam este processo para se manterem viáveis em fase mais crítica e começa um decréscimo gradual para o fim, devido à exaustão de alguns nutrientes e a produção de substâncias tóxicas, caminhando para a morte das células.

d) Fase de declínio (morte), nesta fase, as células raramente se multiplicam, o ambiente é tóxico, baixo teor de nutrientes e espaço, as bactérias morrem mais rapidamente e a produção de novas células é mais lenta do que a morte delas, a população decresce, pois as células entram em colapso. Algumas bactérias sobrevivem por longo tempo, mesmo nestas condições, outras são severamente afetadas e não mais se recuperam isto acontece até a cultura se tornar estéril.

### 2.3.2 Rizobactérias

Segundo Mafia et al, (2007) a rizosfera, área onde acontecem interações entre solo, microrganismos e plantas, é a zona de influência das raízes. A delimitação, dela, vai desde sua superfície até uma distância de 1 a 3 mm, sendo que este compartimento recebe das raízes exsudados de baixa concentração, permitindo que comunidades microbianas ali permaneçam sendo influenciadas pelas condições abióticas e bióticas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

No caso da castanha-da-Amazônia, esta possui um sistema radicular axial, profundo (5 a 10m) concentrando raízes em raio e profundidade, porém, lateralmente, ele é pouco expandido (MULLER, 1995), o volume de exploração, das raízes, pode alcançar até 10.000m<sup>3</sup> (CAMARGO, 1997).

Gray e Smith, (2005) asseveraram que as bactérias que frequentam a rizosfera são chamadas de rizobactérias. Estes microrganismos ocupam de 7 a 15% do total das superfícies das raízes. No entanto, bactérias promotoras de crescimento de plantas colonizam, naturalmente, o interior e exterior de órgãos de plantas e podem ser benéficas, neutras ou prejudiciais ao seu crescimento. Elas são consideradas plantas epifíticas ou endofíticas e não são fitopatogênicas. Podendo ser utilizadas no tratamento de sementes, mudas micropropagadas, estacas, raízes e pulverizações na parte aérea da planta (MARIANO *et al*, 2004).

As Rizobactérias Promotoras de Crescimentos de Plantas (RPCPs) é um conjunto de diferentes bactérias de vida livre e podem se associar a rizosfera de plantas. São encontradas na rizosfera em grande variedade e, quando associadas com plantas, promovem um aumento importante na área da superfície das raízes, promovendo maior eficiência na retirada de água e micronutrientes pelas plantas (FAN *et al*, 2011; DA SILVEIRA, 2008). Segundo Gray e Smith (2005) elas se favorecem dos exsudatos de plantas na rizosfera, tais como aminoácidos e açúcares, que lhes

fornecem energia e nutrientes, daí a população bacteriana ser maior nesta área do que fora dela.

As RPCPs podem ser influenciadas pelas diferentes espécies vegetais e tipo de solo, a depender da quantidade e qualidade dos compostos orgânicos exsudados, sendo que os mesmos selecionarão ou favorecerão grupos nutricionais de organismos específicos na rizosfera. Elas contribuem para o crescimento e desenvolvimento das plantas, principalmente na fixação do nitrogênio atmosférico; solubilização de compostos minerais como fósforo; produção de sideróforos (quelantes de ferro); produção de hormônios reguladores do crescimento vegetal, tais como auxina, giberelina, citocinina e etileno; e secundariamente, através do antagonismo a organismos fitopatogênicos tais como fungos, vírus e nematoides e indução da resistência sistêmica contra doenças (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Os microrganismos, supracitados, podem participar de uma mistura benéfica entre eles, a exemplo: as doenças causadas pelo fungo *Fusarium oxysporum* que causam perdas significativas nas culturas hortícolas e agrícolas. Nos estudos de Boer et al. (1999), eles mostraram a combinação de microrganismos utilizados na supressão de fusarium da murcha do rabanete, eles informaram que 24 cepas de *Pseudomonas* spp. fluorescentes, suprimiram o fusarium em um bioensaio de envasamento de solo.

Então, provavelmente, a aplicação de uma mistura de agentes de biocontrole imite mais de perto a situação de controle natural.

As RPCPs produzem fitohormônios (hormônios de plantas): auxinas, destacando-se neste grupo o ácido indol acético (AIA), giberelinas e citocininas no desenvolvimento das plantas. Karadeniz *et al.*, (2008); Ashrafuzzaman *et al.*, (2009); Zaharova et al. (1999) asseveraram que, na rizosfera, 80% das bactérias isoladas são capazes de produzir AIA. Kuss *et al.* (2007) descreveram que dentre as substâncias de crescimento vegetal produzidas por bactérias, as auxinas inclusive, Ácido indolacético (AIA) , são as mais ativas e melhores caracterizadas, sendo que o AIA produz o aumento da alongação celular(resposta rápida) e a divisão e diferenciação



celular (resposta lenta), as bactérias associadas à raiz das plantas são mais eficientes na produção de auxinas do que as não associadas. Ainda, Barbieri *et al.*, (1986) afirmaram que entre as auxinas, o AIA é o mais estudado e o mais produzidos pelas bactérias, sendo que ele influencia a morfologia das raízes, aumentando, além do comprimento, o número de pelos radiculares.

Hormônios de plantas são substâncias produzidas pelos vegetais que, em baixas concentrações, atuam em processos de crescimento e desenvolvimento, e são produzidos como sinais endógenos, ou seja, têm a função de disparar algum processo fisiológico no tecido de destino. O número de processos que requerem regulação em uma planta, superior, excede em muito o número de hormônios ou outros reguladores. Em resumo, a regulação hormonal se dá através de interações e modulações coletivas entre sistemas hormonais (AMARAL, 2011), por exemplo: conforme a relação entre auxina e citocinina há a brotação da parte aérea ou o desenvolvimento de raízes.

Destarte, a estaquia é a mais comum técnica de propagação vegetativa, no entanto, apresenta desenvolvimento de baixa qualidade das mudas em seu sistema radicular. Assim sendo, as RPCPs demonstram ser uma tecnologia que pode incrementar o índice de enraizamento, bem como o crescimento e controle biológico. (RAASCH *et al*, 2013).

Portanto, a pesquisa, com a bactéria do gênero *Bacillus*, tem reconhecido que este microrganismo é importante no controle biológico de doenças, porém as espécies de *Bacillus* sp como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas tem sido bastante interessante, contudo, isolados bacterianos tem sido utilizado de maneira adversa (ARAUJO, 2012).

Diante desta situação, a importância do desenvolvimento de estudos – de fácil entendimento e aplicação – com seleção de rizobactérias da espécie *Bacillus*, aproveitando plantas regionais, como é o caso da *B. excelsa*.

## 2.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR



As metodologias moleculares, a partir dos anos de 1980, tem utilizado o DNA genômico total, que é extraído diretamente do meio ambiente. Por meio das ampliações via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), tornam factível identificar os microrganismos desconhecidos e não cultiváveis presentes na amostra (KENT e TRIPLETT, 2002).

A PCR é uma técnica para fazer muitas cópias de uma região específica do DNA, *in vitro*. Com o advento da enzima Taq DNA polimerase, uma enzima termoestável tolerante a altas temperaturas para um determinado período de tempo, facilita a ocorrência da reação da PCR e múltiplos ciclos de síntese de DNA, sem a necessidade de um operador. A região do DNA a ser amplificada é determinada pelo par de primers ou iniciadores, que são segmentos de DNA que pareiam suas bases com a fita molde e sinalizam o início das cópias de DNA a serem formadas, uma vez que eles se hibridizam à fita molde (BROWN, 1998; BEJ, 2004). Katak (2018) em seus estudos de análises moleculares de linhagens de *Bacillus* spp., usou a técnica de PCR em bacilo.

O uso do gene 16S rRNA no campo da ecologia microbiana possibilitou investigar e determinar posições filogenéticas de comunidades bacterianas de meio ambiente (LUDWIG *et al.*, 1997). Os rRNAs são umas das macromoléculas mais conservadas da evolução dos seres vivos e seu papel funcional no sistema de processamento de informações gênicas, pode ter se estabelecido desde os primeiros ancestrais comuns de Bactéria, Arquea e Eucaria. Em todos os organismos contemporâneos eles partem de um ancestral comum e não parecem submeter-se à transferência de genes entre espécies.

Por ser regiões bem conservadas, podem ser usadas para medir distâncias filogenéticas, mesmo entre os organismos mais distintamente relacionados. As variações nas sequências dos nucleotídeos do gene de rRNA são indícios de mudanças evolucionárias, sendo que resultados de filogenia baseados nas análises do gene 16S rRNA revelaram a separação dos 18 domínios Bactéria, Arquea e

Eucaria. Estudos filogenéticos moleculares mostram a importância dos microrganismos na história evolutiva da vida na Terra. (ATLAS e BARTHA, 1998).

A sequência do gene 16S rRNA é considerada como a mais comum na utilização como marcador filogenético para a ecologia microbiana. Não obstante, a sequência do gene 16S rRNA apresenta baixo nível de resolução taxonômico, mostrando-se viável na classificação de bactérias quanto ao gênero, porém insuficiente para classificá-las quanto às espécies (IGUAL *et al.*, 2001).

Devido à incapacidade das técnicas moleculares não conseguirem diferenciar estirpes, outras técnicas vêm sendo utilizadas no controle de qualidade de bactérias. Dentre essas técnicas, supracitadas, temos pequenas sequências intergênicas repetitivas que são encontradas em eubactéria, nomeadas, entre elas temos a ERIC (“Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus”) (124-127 pb) (HULTON *et al.*, 1991).

## 2.5 BIOECONOMIA

### 2.5.1 O Brasil e a Bioeconomia

A bioeconomia trata da aplicação de conhecimentos biológicos com a ligação de operações competitivas, de forma sustentável. O Brasil, no geral, e a Amazônia em especial têm a oportunidade de serem protagonistas na bioeconomia mundial, possuímos um dos maiores patrimônios naturais e uma enorme biodiversidade. Sem contestações, nossa agricultura mostra-se competente no uso da biotecnologia e valiosa aptidão agrícola. Nós necessitamos de políticas que estimulem os pesquisadores, cientistas e ambientalistas, facilitando o acesso ao vasto patrimônio genético de nosso país (CHIAPETTA, 2019). Soluções baseadas na natureza, como novas biomassas, novas variedades de plantas alimentícias e de microrganismos são alguns dos benefícios utilizados da biodiversidade.

A agricultura possibilita que o Brasil ocupe espaço de protagonista da bioeconomia, pois tem competência para assimilar um patamar superior de multifuncionalidade exigido pela bioeconomia (LOPES, 2016), saindo de um conceito

linear de economia para um conceito circular, no qual o uso dos recursos naturais é priorizado, reciclado e respeitado (ROSCOE, 2016).

## 2.5.2 Socibiobiodiversidade

Os extrativistas se aproveitam da abundância de oferta de produtos pela biodiversidade brasileira e, através do uso sustentável, garantem a alimentação e renda de sua família, portanto, o extrativismo é considerado um conjunto de sistemas de exploração de produtos da floresta, ofertando-os quer seja ele localmente, regionalmente, nacionalmente ou mesmo para o mercado internacional, sendo considerado uma atividade econômica então inseridas em cadeias produtivas, caso da castanha-do-Brasil e outros produtos vegetais não madeireiros (SOUZA e LOUREIRO, 2019). No caso da Castanha-do-Brasil, que tem um relevante papel social, juntamente com a seringueira, constituem-se como a base de sustentação das famílias extrativistas. Portanto, elas favorecem a preservação do Bioma Amazônia em que se encontram inseridas (PENNAACCHIO, 2021)

Continuando com o mesmo autor, ele informou que no mercado, no ano de 2021, a safra da castanha voltou à normalidade, assim como os preços, que sofreram forte queda na safra anterior devido a crise sanitária de COVID-19. Quanto à produção, ele comentou que esta apresenta número menor em quantidade e, qualidade inferior em relação à safra anterior, já a exportação, que antes representava 70% do total, caiu para 22%, ela teve a realidade modificada, sendo que os produtores voltaram-se para o mercado interno, que apresentava preços remuneradores.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a propagação vegetativa da *Bertholletia excelsa* pelas técnicas de mini e microestaquia com auxílio de Rizobactérias (*Bacillus* spp).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

##### Capítulo I

- Isolar *Bacillus* spp, de rizosferas de *Bertholletia excelsa*;
- Avaliar a formação de calos nas miniestacas;
- Avaliar a formação de raízes nas miniestacas;
- Avaliar a mortandade de miniestacas;
- Identificar molecularmente os bacilos do mix de *Bacillus* mais eficiente no desenvolvimento e crescimento da *Bertholletia excelsa*;
- Avaliar a técnica de miniestaquia como método de multiplicação da *Bertholletia excelsa* com o auxílio de Rizobactéria (*Bacillus* spp.).

##### Capítulo II

- Avaliar as microestacas, da *B. excelsa*, a serem utilizadas;
- Avaliar as dosagens das soluções de hipoclorito de sódio na a desinfestação das microestacas a serem utilizadas;
- Avaliar a produção de brotos pelos efeitos de cada uma das 4 dosagens de BAP;
- Avaliar a técnica de microestaquia como método de multiplicação da *Bertholletia excelsa*.

## Capítulo I

### Vegetative propagation by mini-cuttings of Brazil nut “*Bertholletia excelsa* Bonpl” with the aid of rhizobacteria mixes

**Júlio César Delfino Ribeiro**

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

**Rogério Eiji Hanada**

Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Brasil

**Suely de Souza Costa**

Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Brasil

### 2. Methodology

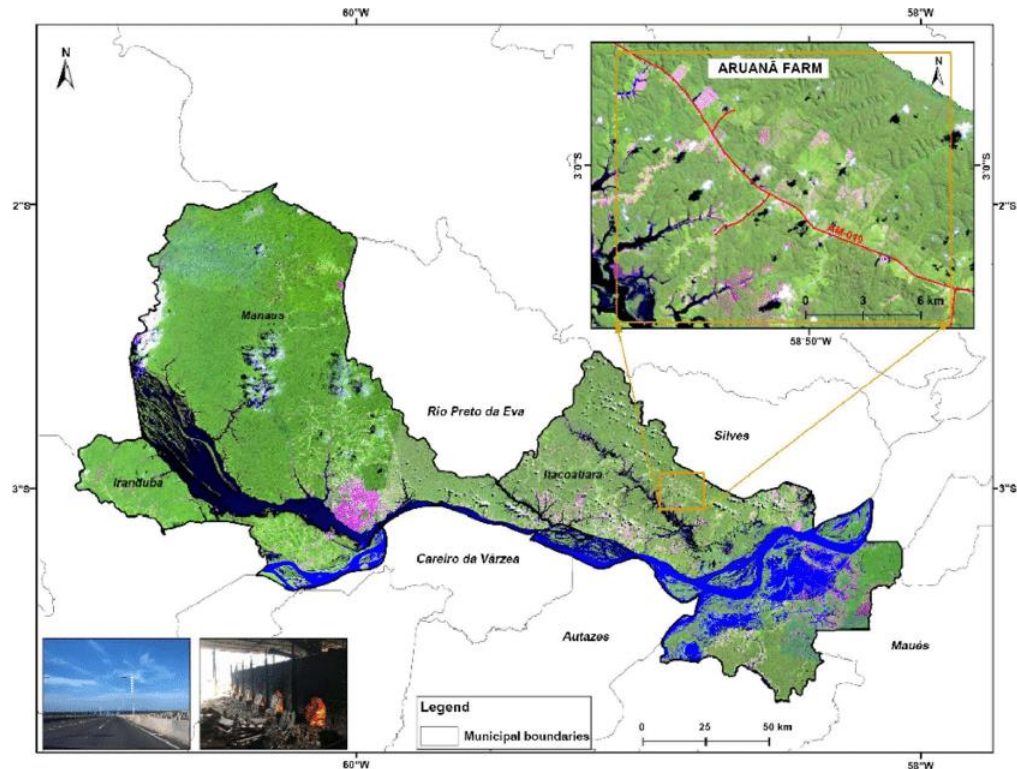
Due to this work of vegetative propagation, of *B. excelsa*, through the mini-cutting technique with the aid of rhizobacteria mix, being the first, a descriptive research was carried out with a demonstrative experimental technical procedure and data collection, adapted from Gil, 2008, mainly taking into account root formation, according to Stork *et al.*, 2000, demonstrative experiments serve to analyze the viability of a technical procedure without the need for statistical analysis, however, statistical analysis was also performed.

The isolation of *Bacillus* spp. was carried out in the phytopathology laboratory of the National Institute for Research in the Amazon (INPA), in Manaus, AM. The experiments with the plants were carried out in a greenhouse with 50% shading and in the Seedling Nursery of the Biodiversity Coordination (COBIO), of the National Institute for Research in the Amazon (INPA), Campus III (V8) in Manaus, AM (3° 08' S and 60° 01' W). The nursery was covered with a 70% shading screen; the floor was covered with pebble; and irrigation was done by intermittent nebulization controlled by an evaporation scale. Molecular identification of the bacteria was carried out in the molecular biology laboratory of Embrapa of Western Amazon.

Young specimens (seedlings) – 18 months old – of *B. excelsa*, for prospecting of rhizobacteria, were obtained in the Forest Garden of Manaus-AM City Hall, and the seedlings – 4 months old –, for the extraction of mini-cuttings, were

obtained on the Aruanã farm, (Fig. 01) located in the municipality of Itacoatiara-AM. All seedlings were initially kept in the greenhouse.

**Figure 1** Location of Aruana Farm situated on Itacoatiara – AM



Source: Alves *et al.* (2020)

Aruanã Farm was established in 1970 at 213 KM of Manaus – Itacoatiara Highway (AM-010). Among other activities, the farm produces high quality Brazil nut seedlings.

## 2.1 Isolation of rhizobacteria

From the seedlings, obtained from the Forest Garden of Manaus-AM City Hall, ten of them had their roots extracted and taken to the laboratory where they were washed, and the soil adhered to the roots, in up to 3 mm, was maintained. They were fractionated and placed in an Erlenmeyer flask with 50 mL of sterilized saline solution (0.01M MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O). The solution and the parts of the root with soil, inside the Erlenmeyer flask (250 mL), were subjected to 30 minutes of agitation in a mechanical shaker and the solutions were subjected to a thermal shock of 80°C/20 minutes in an oven, to select the genus *Bacillus*. Samples of 1mL removed from the flask were



submitted to serial dilutions in test tubes with 9 mL of sterile distilled water, which were carried out until  $10^{-8}$ , and 100  $\mu\text{L}$  of the last dilution were inoculated in Petri dishes (14 cm in diameter). The plating was carried out with 0.1 mL aliquots, collected in test tubes in NA medium (nutritive agar), with incubation of 96 hours, in an oven at  $28^{\circ}\text{C}$ . Colony-forming bacteria were considered belonging to the genus *Bacillus*. They were conserved in Castellani, until their use, at the time of inoculation, identification and conservation.

## 2.2 Collection of shoots and preparation of mini-cuttings

Part of the *Bertholletia excelsa* seedlings (36 seedlings) obtained, with 20 to 25 cm in height, had their apical shoots pruned to cause lateral shoots, from which the mini-cuttings were removed. Shootings were collected in the morning with pruning shears previously disinfected in 70% ethanol (v/v). The mini-cuttings were prepared using the apical part of the shoots, with dimensions between 4 and 8 cm, containing one, two or three leaves, adapted from (Titon *et al.*, 2003).

Bacterial suspensions (rhizobacteria mix) were applied to the mini-cuttings, with immersion of the base of the mini-cuttings for a period of approximately one hour, for proper inoculation. These suspensions were prepared as follows: a) all the bacteria were grown on NA medium (Nutrient Agar); b) remained in B.O.D. for 48 hours; c) after 48 hours, scraping was performed in saline solution (0.85% NaCl) and placed in an Erlenmeyer flask. One concentration was not diluted and it was measured with a spectrophotometer (2.52 Abs at 54nm), the other concentrations were diluted to  $10^{-8}$ . Then they were placed under refrigeration (refrigerators) until the moment of use.

After the application of suspensions of bacterial isolates, the mini-cuttings were cut (2 cm deep) in 110 cm<sup>3</sup> tubes containing commercial substrate VivattoSlim Pro 10 (a mixture of bio-stabilized pine bark, vermiculite, charcoal powder, phenolic foam and water), without adding fertilizer) was properly sterilized. The tubes and trays used were previously washed with neutral detergent and disinfected in hot water at  $83^{\circ}\text{C}$  for 30 seconds (Alfenas *et al.*, 2009). The tubes were deposited in plastic trays and taken to a greenhouse regulated with 70% luminosity, with maintenance of humidity via

intermittent nebulization, controlled by an evaporation scale. After 90 days, survival, rooting and callus formation were analyzed.

### 2.3 Molecular identification of bacteria

Molecular identification was performed according to protocols used in the molecular biology laboratory of EMBRAPA of WESTERN AMAZON in Manaus-AM. The bacteria, which were preserved in liquid medium (Castelani Method), were inoculated (0.1 mL) in LB liquid culture medium (5 mL) for identification.

Molecular identification was carried out according to the following steps: a) genomic DNA extraction (breaking of the cell membrane – lyse, separation of DNA from impurities, proteins, RNA), DNA quality and quantity analysis by NANODROP 1000, the quality was considered good, concentration (ng/μL with purity degree between 1,8 and 2,0); b) PCR for amplification of the 16S rDNA gene (conventional PCR, where the reactions of the gene amplification were executed in a thermocycler and the reactions of amplification, with the following primers: Primer 8F – 5` AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3` (t) and Primer 1401R 5` CGG TGT GTA GGC GGA ACG-3` ( f); c) purification of PCR samples (the amplified 16S gene fragments were purified using Kit, according to the protocol, soon after, they were evaluated by running them in an electric field on a 1.5% agarose gel, stained with ethidium bromide for visualization and documentation; d) sequencing reaction (Sequencing performed by the -3500 sequencer – Genetic Analyzer (HITACHI); e) Molecular identification (done with the UGENE program and the BLAST tool).

## 3. Results and Discussion

### 3.1 Isolation of bacilli

From 50 plants, obtained from the forest garden of Manaus-AM City Hall, aged around 18 months and height of 1.5 meters (average), roots of 10 plants were extracted and taken to the laboratory where 68 colony forming bacteria were isolated and were previously considered to belong to the genus *Bacillus*.



In world agriculture, plant growth promoter microorganisms are widely used, however in the area of forest production this almost does not happen, nevertheless there are reports of success in the clonal production of hybrids of *E. urophylla* x *E. grandis* (Teixeira *et al.*, 2007). However, the inoculation of rhizobacteria in forest species can provide considerable gains in plant development, in the rooting and growth of eucalyptus, two isolates of *Bacillus subtilis*, S1 and 3918, selected, were effective for rooting (Mafia *et al.*, 2007) Also, in studies on the isolation and characterization of bacteria in Brazil nut rhizospheres in northern Brazil, it was concluded that among the 90 isolates of rhizobacteria, 22 of them showed favorable characteristics for promoting plant growth and can be used in production of Brazil nut seedlings (Chalita *et al.*, 2019), the results of this work were isolated from 68 bacteria considered bacilli, in comparison the similarity of results can be extended. Also, in 10 locations in the western region of the State of São Paulo, a group of 127 bacterial isolates belonging to the genus *Bacillus* were prospected from the eucalyptus rhizosphere, all of which were considered positive for auxin production and 15 presented potential to promote growth (Moreira & Araújo, 2013), yet, in studies to verify the possibility of rhizobacteria acting as growth promoters of citrus plants, in Paraná, 30 rhizobacteria were prospected in seedling nurseries and in the field, 13 of which were of the genus *Bacillus*, concluded that bacterial isolates, including *Bacillus*, can act as growth promoters of citrus plants (Freitas & Aguilar Vildoso, 2004). Also, they bioprospeted bacteria of the genus *Bacillus* in the rhizosphere of *Brachiaria brizantha* and concluded that they can promote plant growth when previously inoculated in seeds (Araujo *et al.*, 2012), interesting data, which are similar to the data found in this work.

In other experiments (Rodrigues, 2018), 81 bacteria were isolated from sugarcane rhizosphere under organic management in nitrogen-free culture media, with the genus *Bacillus* being the second most found, these cellulase-producing microorganisms were widely distributed in the sugarcane rhizosphere. The data observed during this study demonstrate that many bacilli inhabit the rhizosphere of *Bertholletia excelsa*.

In some studies, bacterial isolates (bacilli) evaluated were considered positive for auxin production (Moreira & Araújo, 2013), information that reinforces the purpose of this work. In the same way (Rodrigues, 2018), the potential for inhibiting pathogens and the production of cellulases in rhizobacteria have important role in the penetration of these organisms into the host plant during colonization.

### **3.2 Collection of shoots and preparation of mini-cuttings**

The decapitation of the apical shoots caused a break in dominance and production of lateral shoots. Dominance is the control exercised by the apical shoots over the lower axillary buds (Cline, 1991), the axillary buds of the ministumps assume dominance over the lower ones (MANTOVANI, 2017). In this experiment with *B. excelsa*, each pruned plant put forth a sprout.

At 15 days of decapitation, all the plants started sprouting, after 15 to 17 days, the shoots had dimensions from 5 to 8 cm and were cut.

### **3.3 Application of bacterial isolates and cutting**

The bacilli mixes were inoculated into mini-cuttings to verify rooting, callus formation and survival. In the rooting verification, the root length was obtained by measuring with a ruler. The results are shown in Table 1. Qualitatively, the MAO5PB mix was considered the most productive mix in Figure 2.

**Table 1.** Data obtained from the treatment with rhizobacteria mixes inoculated in mini-cuttings of *B. excelsa* in Manaus-AM in the year 2020.

Mix	Nº of bacteria	SB(%)	RF(%)	N/LR(cm)	CF(%)
MAO2PB	12	100	50,0	1/3 1/13-4 1/17	100
MAO5PB	05	100	83,3	1/1 1/0,5 1/8-9-15* 1/11 1/1,5-1-3	100
MAO3PB	19	100	16,6	1/8* 1/6	100
MAO22PB	11	100	83,3	1/1 -1 1/2-1,5 1/1,5-2 1/3,5 1/14,5*-2,5-3	100
MAO4PB	6	100	66,6	½ 1/2-1,5 1/3-3-1-2-2 ¼ - 4,5 - 2	100

\*With root primordia – SB: Survival of mini-cuttings – RF: Root formation – N/LR: Number of roots/root length – CF: Callus formation.

Source: Author (2020).

**Figure 02** - MAO5PB mix chosen among the 5 treated with rhizobacteria mixes.



Source: Author (2020).

This photo illustrates the six cuttings that were treated with MIX MAO5PB and the control. About rooting, 05 cuttings have formed roots, where, from right to left: Cutting 1 had a root of 1 cm, Cutting 2 had a root of 0.5 cm, Cutting 3 had 3 roots, one with 8 cm, another with 9 cm and one with 15 cm, all with root hairs, Cutting 4 had a root with 11 cm, with root hairs, Cutting 5 had no root, but had callus, Cutting 6 had 3 roots, one with 1.5 cm, another with 1 cm and the other with 3 cm. About callus formation, all of them presented callus, with exception of control cutting. In terms of survival, all cuttings survived, except control cutting. The control cutting (in the center of the image) did not form roots or calluses, it did not survive (necrotized).

The present work has showed the survival of all (100%) mini-cuttings treated with rhizobacteria; studies on ipe-roxo (*Handroanthus heptaphyllus*), the survival of treated mini-cuttings was greater than 84% (Oliveira *et al.*, 2016); in other experiments it was 100% (Mantovani *et al.*, (2017); and in studies with *Eucalyptu sglobulus*, it was 91% (BORGES *et al.*, (2011),

All mini-cuttings in this study formed calluses. They are formed as a result of the cuttings, the plant responds to the stress it has suffered, initiating a regeneration through disordered meristematic cells. The tissue formed would be the scar tissue, which

formation is independent of roots formation and which serves as a barrier against microorganisms, (Fachinello *et al.*, 2005).

Of the 30 mini-cuttings inoculated with a rhizobacteria mix, in a commercial substrate, the relative rates of root formation ranged from 16.6 to 83.3%, bearing in mind that the substrate did not contain fertilizer, unlike the fertilized experiments, which reached rates from 18.8 to 95.8% root development of mini-cuttings of *Anadenanthera macrocarpa* (Angico-vermelho) (Dias *et al.*, 2015); rooting experiments of guarana tree cuttings, without fertilization, measured a percentage of rooting, from 6.25 to 73.75% (Albertino *et al.*, 2012). In studies on the rooting of cuttings using fertilizer in *Eucalyptus globulus*, root formation rates ranged from 25.0 to 100.0% (Borges *et al.*, 2011). controls), In this study, reported here, with regard to the mini-cuttings (controls), which were treated with distilled water, they did not survive, they became necrotic.

### 3.4 Molecular identification

In the molecular identification of the most productive mix – MAO5PB, the following rhizobacteria were found: MAO5PB12-A – *Bacillus wiedmannii*; 12K – *Bacillus paramycoides*; 12L – *Lysinibacillus fusiformis*; 12J – *Bacillus paramycoides* and 12C – *Lysinibacillus fusiformis*.

About *Bacillus wiedmannii*, it was suggested the inclusion of this bacterium, through the strain (spnov), in the important group of *Bacillus cereus* (Miller *et al.* 2016). Epiphytic isolates of *B. cereus* (C210) showed antibiosis against *Xanthomonas campestris* spv. *Campestris* (Luna *et al.*, 2002); they reduced disease severity in the field by 78% in 'Midori' cabbage plants (ASSIS *et al.*, 1997).

In studies on the mitigation of water stress in wheat, the bacilli *B. Paramycoides* and *B. paranthrais* played a crucial role in improving plant growth during stress and, simultaneously, ensuring soil fertility and health, these microorganisms were bioprospeted from plant rizosphere in a state of water stress (YADAV *et al.*, 2022). As for the rhizobacterium *Lysinibacillus fusiformis*, it was efficient in the degradation of aflatoxin B1, reaching aflatoxin detoxification rates of 61.3% (ADEBO *et al.*, 2017).



Aflatoxin can attack plantations in their pre-harvest and post-harvest stages, what may cause economic losses (Patriarca & Fernández, 2017). In rhizosphere soils of halophytic plants, from saline environments, in three regions of Rio de Janeiro, the rhizobacterium *L. Fusiformis* was identified (Xavier, 2021), it is a soil bacterium that stands out.

## Capítulo II

Propagação vegetativa da *Bertholletia excelsa* pela técnica de microestaquia com auxílio de Rizobactérias (*Bacillus* spp).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### CULTURA DE TECIDOS

#### Local dos experimentos

Os experimentos foram executados no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental. O clima local é do tipo Ami, segundo a classificação de Köppen, com média da umidade relativa do ar em torno de 80%. Os Experimentos foram executados conforme protocolos da EMBRAPA (QUISEN e ÂNGELO (2008). A identificação genérica dos fungos endofíticos foram realizadas no laboratório de fitopatologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) localizado no Campus III (V8) em Manaus, AM (3° 08' S e 60° 01' O).

#### 2.1 As Microestacas

A formação do matrizeiro se deu pela aquisição de 150 (plantas matrizes), mudas, oriundas da fazenda Aruanã, com idade de 8 meses, cultivadas em sacolas plásticas com substrato coletado de solos dos castanhais da fazenda Aruanã.

As microestacas (explantes) foram seguimentos nodais oriundos de brotos gerados após a decapitação de mudas de castanheiras, portanto sendo material rejuvenescido. Estes lançamentos foram submetidos a assepsia mecânica com detergente neutro por esfregação e, depois, lavados em água corrente (com água destilada esterilizada em autoclave, sob temperatura de 118°C por 15 minutos e 1,3 atm de pressão).

Para a coleta dos explantes foram escolhidos aqueles que possuíam entre dois e três segmentos nodais, os seguimentos apicais foram excisados.

A manipulação do material vegetal foi realizada dentro de câmara de fluxo laminar horizontal, sob condições assépticas, para evitar que alguma contaminação acontecesse durante o experimento, foram utilizados pinças, bisturis, tubo falcon e placas de petri esterilizados em autoclave.

Em fase preliminar, foi realizado um teste com 21 explantes, seguimentos nodais, para conhecer os materiais usados no teste, tendo usado o meio de cultura  $\frac{1}{2}$  do MS, para inoculação dos explantes que sofreram esfregaço mecânico com detergente neutro e escova plástica, logo após foram introduzidos em solução de hipoclorito de sódio a 1%, por 30 minutos. Depois de 8 dias, todos os explantes apresentavam manifestação fúngica. Das extremidades superiores das microestacas foram retirados fragmentos fúngicos, que foram inoculados no meio BDA em placas de 9 centímetros de diâmetro. Foi avaliada as características velocidade de crescimento, que é uma das características para identificação genérica dos fungos, medindo de 24 em 24 horas o diâmetro das culturas de fungos inoculadas na placa de petri e, também, foram avaliadas a cor, textura, forma, formação dos círculos, aparência, frutificação, esporulação, conídios, micélios. Logo após foram consultados Barnett e Hunter (1998) para a identificação genérica

A desinfestação foi feita inicialmente com o esfregaço dos brotos com detergente neutro, após serem excisados, eles foram lavados em água corrente e submetido ao etanol ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ) a 70% (v/v) durante um minuto. Como agente desinfestante foi utilizada solução de hipoclorito de sódio ( $\text{NaClO}$ ) a 1,5% por 30 minutos, escolhida por teste com 4 concentrações e imediatamente eles foram lavados em água destilada esterilizada por tríplice lavagem. Os seguimentos nodais foram isolados em câmara de fluxo contínuo, sendo cortados os ápices e as bases, permanecendo os nós e parte dos ramos, cujo comprimento ficou entre 0,8 e 1,2 cm.

Para avaliar a produção da brotação de 200 explantes, foi executado um teste com 4 diferentes concentrações do fitoregulador benzilaminopurina (BAP), uma citocinina para estimular a brotação: (1,5, 3,0, 4,5 e 6,0  $\text{mg.L}^{-1}$ ). Estas concentrações



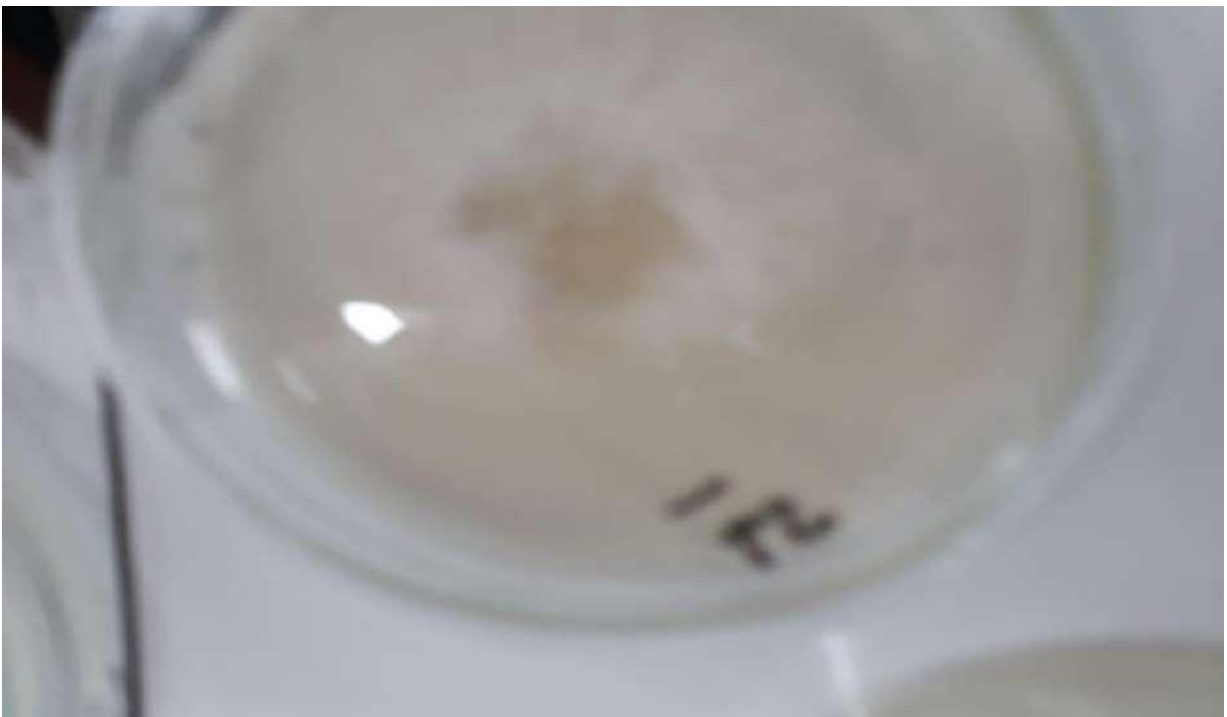
foram juntadas ao meio de cultura  $\frac{1}{2}$  MS (MURASHIGE; SKOOG,1962), comercial, adicionados de  $2 \text{ g.L}^{-1}$  de gelificante Phytigel,  $2 \text{ g.L}^{-1}$  do antioxidante PVP (polivinilpirrolidona), enriquecidos com  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose. Foi realizado o ajuste de pH dos meios de cultura para 5,8 com hidróxido de potássio (KOH) (1N) ou ácido clorídrico (HCL) (1N). Nestes meios foram inoculados 200 explantes. Inicialmente, os explantes, inoculados, ficaram 08 dias em ambiente escuro.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em teste preliminar, foram analisados 21 explantes expostos a hipoclorito de sódio a 1% por 30 minutos, inoculados em meio ½ MS. Depois de 8 dias todas as microestacas apresentaram manifestação de fungos endofíticos, estes microrganismos foram identificados genericamente, no laboratório de fitopatologia do INPA sendo consultados Barnett e Hunter (1998). Foram identificados os fungos: *Phomopsis* sp., *Aspergillus* sp., *Phoma* sp., *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp. e *Lasiosdiploia* sp.

*Phomopsis* sp., a colônia apresentou forma circular plana, cor marrom, micélio elevado, aparência cotonoso, anéis concêntricos, crescimento relativamente lento, com frutificação (picnídios) abundantes e também apresentou abundante esporulação (Figura 3).

Figura 03 Aspectos macroscópicos de *Phomopsis* sp (cultivo em BDA)



*Autor: Luis*

*Aspergillus* sp., a colônia apresentou forma circular, plana, cor verde, micélio elevado, aparência cotonoso, abundância de esporulação (conídios) e crescimento rápido (Figura 04).

Figura 04. Aspectos macroscópicos de *Aspergillus* sp (cultivado em BDA)



Autor: Luis

*Phoma* sp., a colônia apresentou forma circular, plana, cor cinza, micélio elevado, frutificação (picnídios), aparência cotonoso, anéis concêntricos, crescimento lento, abundância de picnídios e esporulação (Figura 05).

Figura 05. Aspectos macroscópicos de *Phoma* sp (cultivado em BDA)



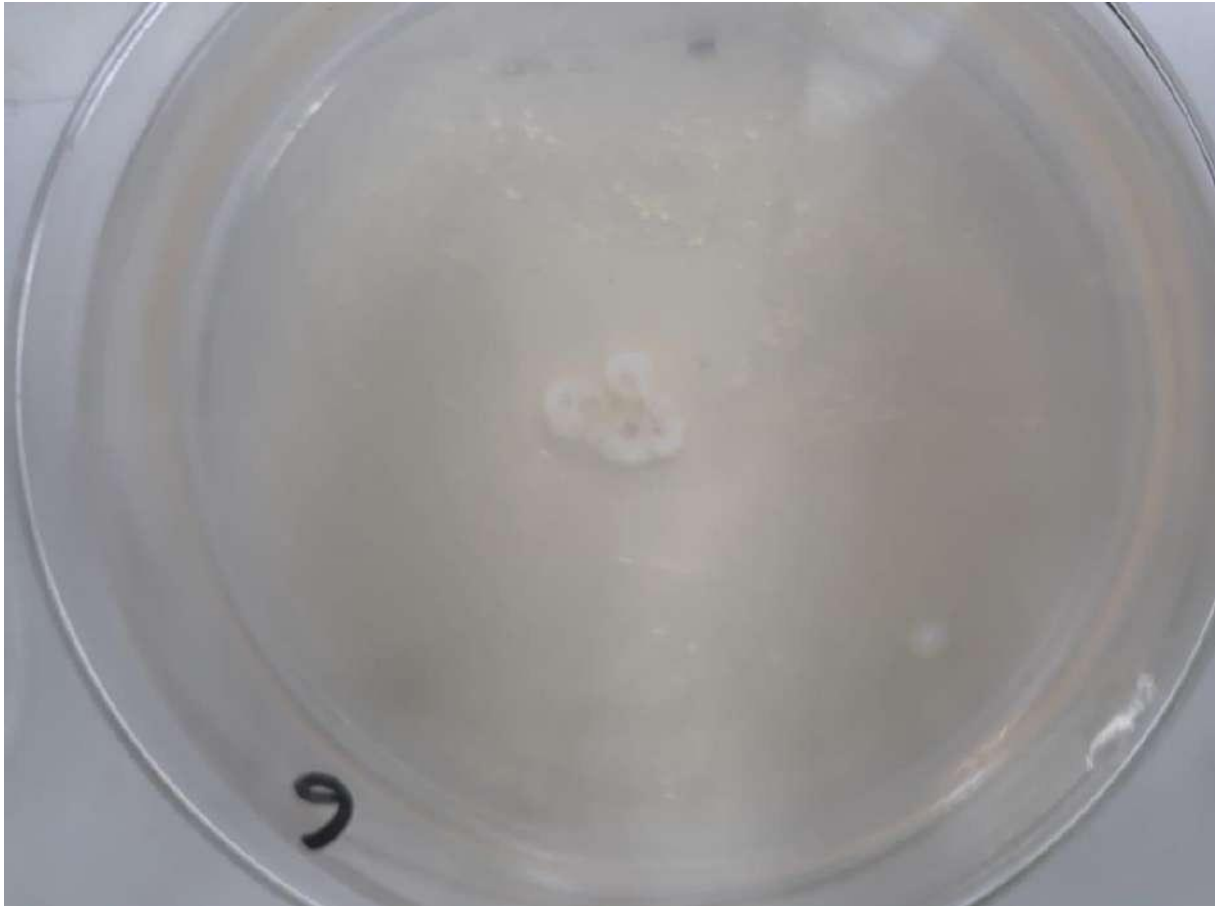
*Autor Luis*

*Fusarium* sp., a colônia apresentou forma circular, plana, cor branca, micélio elevado, frutificação (picnídios), aparência cotonoso, crescimento lento, pouca formação de conídios.

*Colletotrichum* sp., a colônia apresentou forma circular, plana, cor branca, micélio elevado, crescimento lento, frutificação (picnídios), massa de conídios abundantes e esporulação.

*Lasiosdiplozia* sp., a colônia apresenta forma circular, cor escura, micélio elevado, aparência cotonoso, com frutificação (picnídio) abundante, crescimento lento. Apresentou abundância de esporulação (conídio) (Figura 6)

Figura 06. Aspectos macroscópicos de *Lasioiplodia* sp (cultivado em BDA)



Autor: Luis

A avaliação, nos 20 explantes da *B. excelsa*, foi iniciada pela infestação, foi realizado um teste a fim de testar a concentração mais eficiente, na solução de hipoclorito de sódio (comercial): a 1,0% (30), 1,5 (30), 2,0 (30), e 2,5% (20 minutos), sob constante agitação, resultado quadro 1.

Quadro 1 Resultado do teste de Hipoclorito (20 explantes) da *Bertholletia excelsa*

Hipoclorito%	Oxidação	Contaminação	Tempo/min
1,0	2	1	30
1,5*	2	-	30
2,0	5	-	30
2,5	5	-	20

\*Concentração escolhida (1,5%).

Optou-se pela concentração de 1,5% por apresentar o menor número de oxidação e não apresentar contaminação, conforme quadro 1.

### 3.1 CULTURA DE TECIDOS

Na cultura de tecidos vegetais o genótipo, a fonte de explantes e a condição da cultura são os fatores que determinam o sucesso do início e regeneração de tecidos *in vitro*. Ou seja, qual a espécie a ser regenerada, qual o tipo de tecidos vai ser utilizado e qual o meio de cultura hormônios, luz, temperatura serão utilizados, a escolha e a combinação desses fatores desses fatores, que devem ser adotados através de testes (CALDAS *et al.*, 1998),

Nas atividades de cultura de tecidos, conforme Teixeira e Torres (1998) deve-se conseguir um alto grau de assepsia, para garantir que não aconteçam as contaminações, pois o meio nutritivo é um ambiente apropriado para crescimento acelerado de microrganismos que causam a morte das culturas. Portanto, nesta pesquisa, as atividades foram realizadas em ambiente asséptico, com temperatura e iluminação controladas e uso de antioxidante, visando a otimização das respostas aos estímulos para melhor crescimento das culturas. Todavia, as contaminações foram consideradas irrelevantes, avaliados em datas diferentes. Em sendo assim, contaminações por bactérias e fungos, assim como a oxidação, são os maiores fatores de impedimento de se conseguir tecidos saudáveis no estabelecimento *in vitro* de espécies lenhosas (THORPE *et al.*, 1991; GRATTAPAGLIA e MACHADO, 1998).

O MS de Murashige e Skoog (1962), sem contestação, é o meio de cultura mais usado para as espécies florestais, cuja formulação é a mais utilizada em diferentes processos de cultura de tecidos, o mesmo é muitas vezes, utilizado com diluições, devido a sua alta concentração de sais (MANTOVANI e FRANCO, 1998). Por conseguinte, neste trabalho o meio MS também foi diluído.

Meios de cultura apresentam, entre si, algumas modificações para atender as necessidades específicas *in vitro*, os meios nutritivos se baseiam nas exigências das plantas quanto aos nutrientes minerais. Meios nutritivos utilizados para a germinação e crescimento *in vitro*, devem fornecer as substâncias essenciais para o seu crescimento e desenvolvimento. Sendo que, as mesmas vias bioquímicas e metabólicas básicas utilizadas pelas plantas *ex vitro*, são conservadas no material vegetal *in vitro*. Por isso, é de fundamental importância que o material de trabalho se estabeleça num meio nutritivo adequado (SANTOS, 2003 e CALDAS *et al.*, 1998). Neste experimento usou-se o meio MS diluído a 50%, visando o desfavorecimento à contaminação, devido à forte presença de sais neste meio.

### 3.2 BROTAÇÃO

A indução de brotos, desenvolvimento de raízes, alongamento de entre nós, e a frutificação são respostas fisiológicas induzidas por biomoléculas denominadas como reguladores de crescimento (BARRUETO-CID, 2014).

As citocininas, conforme Souza (2020), são utilizadas na cultura de tecidos para promover a brotação de gemas e podem inibir a dominância apical.

Na indução de brotações, na micropropagação, são usados os reguladores de crescimento, de maneira geral, suplementando meios de cultura, principalmente o meio MS, com baixas doses de citocininas. Nogueira *et al.* (2007) relatou, em seu trabalho com muricizeiro, na Amazônia, que conseguiu, com diferentes dosagens de BAP, excelentes resultados, exceto dosagens superiores a  $4,0 \text{ mg.L}^{-1}$  em brotos axilares, em seguimentos nodais. Também, Nogueira (2003), em seus estudos com segmentos nodais de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) constataram que dosagens de BAP acima de  $4,0 \text{ mg L}^{-1}$  não foram eficientes para indução de brotos axilares. Destarte, Soares *et al.* (2007) asseveraram que a multibrotação de segmentos nodais de mangabeira se deu com uso de dosagens  $1,0$  ou  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ , embora tenham induzido formação de calos na base dos explantes. Em suma, conforme Caldas *et al.* (1998), o BAP, além de favorecer uma alta multiplicação de brotos, induz a formação dos mesmos.

Em estudos com a *Conobea scoparioides* (pataqueira), uma erva que tem como centro de origem a Amazônia, Costa *et al.* (2014) utilizaram para micropropagação dessa espécie, 4 dosagens de BAP ( $0, 1, 2$  e  $3 \text{ mg.L}^{-1}$ ) em meio MS, solidificado com phytigel a  $0,2\%$ . Eles constataram a sobrevivência de apenas  $29\%$  no tratamento com seguimento nodal e  $0,84\%$  no intermodal para produção de brotos. Ainda, verificaram que no tratamento do controle houve  $96,67\%$  de morte dos explantes, menor do que os índices das outras 3 dosagens. Continuando, eles responsabilizam, também o BAP na participação da morte dos seguimentos, que



apresentam duas incisões nos explantes, o BAP estaria exigindo muito dos tecidos danificados. Isto, conforme Taiz e Zeiger (2004) as citocininas estimulam a maior produção de brotos quando induzem a divisão celular, este argumento deles podem justificar os resultados, neste experimento com *B. excelsa*, conforme quadro 2 e 3, onde está demonstrado a ausência de brotações com dosagens de BAP (3,0; 4,5 e 6,0 mg.L<sup>-1</sup>)

Com efeito, Fernandes (2016), em seus estudos na multiplicação *in vitro* de *Myracrodruon urundeuva* Allemão, avaliou 5 concentrações de BAP (0,0; 3,0; 6,0; 9,0 e 12,0 mg. L<sup>-1</sup>) e verificou que os valores cresceram até 6,0 mg. L<sup>-1</sup>, e conclui que a dosagem de 3,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP favoreceu o desenvolvimento de brotações.

Destarte, a adição de 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP ao meio de cultura MS favoreceu o número de brotações de morangueiro italiano "Purcinque"(2,5) (CAMARGO, 2018), Assim como, Andrade et al. (2000) que apresentou 90% de indução de brotações, testando diferentes concentrações de BAP (0,0; 0,5; 1,0 e 1,5 mg L<sup>-1</sup> ) com micropropagação de *Myracrodruon urundeuva* (Aroeira), na formação de brotos no tratamento com 1,0 mg L<sup>-1</sup> de BAP

Contudo, segundo Grattapaglia e Machado (1998) a diminuição na taxa de multiplicação e no número de brotações por explante, com a adição de concentrações elevadas de BAP, pode estar ligada ao fato de que as citocininas estimulam a maior produção de partes aéreas até determinada concentração, o que varia de acordo com a espécie e, a partir desta, ocorre efeito tóxico. Para avaliação da brotação, neste trabalho com a *B. excelsa* foi realizado o teste do BAP, utilizando 4 concentrações (1,5; 3,0; 4,5 e 6,0 mg. L<sup>-1</sup> de BAP) este teste foi analisado em 2 etapas (quadro 2 e 3) e apresentou apenas uma brotação, que foi considerado um acidente.

Quadro 2 Resultados do teste de BAP (1ª etapa/outubro/22) da *Bertholletia excelsa*

BAP mg. L <sup>-1</sup>	Brotados	Contaminados	Aproveitamento parcial	Oxidados
1,5	1	1	43	5
3,0		1	40	9
4,5		1	47	2
6,0		1	44	5

Em suma, analisando os experimentos de vários pesquisadores que trabalharam com o uso de BAP em meios de cultura, na cultura de tecidos, com espécies lenhosas, eles categoricamente, asseveram que o BAP induz a produção de brotos. Dentre outros autores, podemos citar Fermínio Júnior *et al.* (2009) em seus estudos com Teca (*Tectona grandis* L.f) e usou citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) nas concentrações de 0,0; 2,2 µM; 4,4 µM; 8,8 µM; 17,7 µM combinados com 0,5 µM da auxina ácido naftalenoacético (ANA)., Rocha *et al.* (2007) em seus estudos com Cedro-Canjerana (*Cabralea canjerana*) testou o BAP em concentração de 2,5 µM conseguindo 27% de brotação e Schottz *et al.* (2007), com uma espécie que ocorre na Amazônia: o Mogno (*Swietenia macrophylla* King), realizou experimentos com meios de cultura acrescidos de 6-benzilaminopurina (BAP) (2,5; 5; 10; 20 e 50 µM), porém os dados foram para multiplicação, os resultados apontam que a brotação aconteceu.

Após 4 meses e 15 dias (135 dias) foi realizada a segunda etapa do teste, sem alterar o meio e os explantes, onde foi constatado que não houve outros explantes brotados e os outros itens mantiveram, relativamente, o mesmo ritmo de desenvolvimento da primeira etapa.

Quadro 3 Resultados do teste de BAP (2ª etapa/março/23) na *Bertholletia excelsa*

BAP mg.L <sup>-1</sup>	Brotados	Contaminados	Aproveitamento parcial	*Oxidados
1,5	1	3	12	34
3,0		1	7	42
4,5		3	9	38
6,0		2	8	40

O período de realização deste experimento foi de 11/agosto/2022 até 03/março/2023, sendo que aguardamos a brotação até março/2023, quando foram observados os seguintes resultados: a) no tratamento com a dosagem de 1,5, somente 1 explantes produziu 1 broto, 3 apresentaram contaminação, 12 apresentaram condições parciais de aproveitamento (pequenas injurias) e 34 estavam oxidados; b) no tratamento com a dosagem de 3,0, obteve-se os resultados de 1 contaminado, 7 em condições de aproveitamento parcial (pequenas injurias) e 42 oxidaram; c) no tratamento com dosagem de 4,5 tivemos 3 contaminados, 9 apresentando condições de aproveitamento parcial e 38 oxidaram; no tratamento com 6,0mg.L<sup>-1</sup> 2 explantes apresentaram contaminação, 8 apresentaram condições de aproveitamento parcial (pequenas injurias) e 40 contaminaram,

### 3.3 OXIDAÇÃO

A oxidação se dá devido a presença de altas concentrações de compostos fenólicos, que são frequentes em plantas lenhosas, estes compostos acabam oxidando e matando o material vegetal (KERBAUY, 2004), dificuldade que se dá na

micropropagação de lenhosas, os explantes escurecem pela oxidação (Grattapaglia e Machado, 1998),

A priori, Taiz e Zeiger (2004), em seus estudos com *Eugenia involucrata*, constataram que injúrias provocadas pelo hipoclorito de sódio foram responsáveis por (57,55%) de oxidação fenólica, que pode ter sido resposta celular ao estresse causado, uma vez que ferimentos contribuem para a atividade da enzima fenilalanina amonialiase, relacionada à formação de compostos fenólicos. Sendo assim, aumentar a concentração ou o maior tempo de exposição de contato dos tecidos de *Eugenia involucrata* com o hipoclorito de sódio, visando a melhorar a eficiência da desinfestação, deve ser avaliado. Neste trabalho, com *B. excelsa*, em teste realizado (quadro 1), o resultado com concentração de 1,5% por 30 minutos foi de 10% de oxidação. Portanto, acredita-se que houve contribuição do hipoclorito com a oxidação dos explantes.

Destarte, os resultados encontrados, neste trabalho com o uso do PVP, constatou que o meio de cultura não escureceu e a oxidação se caracterizou nos explantes e ainda corroboram com a afirmação de Sartori *et al.* (2013) de que o antioxidante necessita de elevadas dosagens para tratamento de lenhosas no combate ao efeito da oxidação de explantes.

Em suma, Carvalho *et al.* (1990), em estudos com eucalipto, afirma que o melhor tratamento é com a concentração de  $10\text{g.L}^{-1}$ , principalmente por causa de características lenhosas, em que o antioxidante associado ao meio de cultura tem função na diminuição da formação de fenóis produzidos pelo próprio explante nas condições de cultivo.

#### 4 CONCLUSÕES e RECOMENDAÇÃO

É possível propagar vegetativamente a *B. excelsa*, através da técnica de miniestaquia com auxílio de mixes de rizobactérias.

Por ser tratar de um trabalho inédito, recomenda-se o desenvolvimento de novos experimentos.

O protocolo definido para o estabelecimento da cultura de tecidos, no que diz respeito ao BAP (1,5; 3,0; 4,5 e 6,0 mg.L<sup>-1</sup>) não estimularam a produção de brotos.

Portanto, para propagação vegetativa por microestaquia recomenda-se o aprofundamento de estudos para a definição de um protocolo para o estabelecimento da cultura de tecidos desta importante espécie *B. Excelsa*.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTINO, S. M. F.; NASCIMENTO FILHO, F. J.; SILVA, J. F.; ATROCH, A. L.; GALVÃO, A. K. L. Enraizamento de estacas de cultivares de guaranazeiro com adubação de plantas matrizes. **Pesquisa Agropecuária**. Bras., Brasília, v.47, n.10, p.1449-1454,2012.
- ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. Clonagem e doenças do eucalipto. Viçosa: **Editora UFV**, p. 500, 2009.
- AMARAL, L. I.V, 2011. Os Hormônios Vegetais. Disponível em <<http://nead.uesc.br/arquivos/Biologia/mod4bloco4/eb7/eb7-os-hormonios-vegetais.pdf>>Acesso em 20 de junho de 2019.
- Almeida, R.J., Tertuliano, M.F. Diagnose dos sistemas ambientais: métodos e indicadores. *In: Avaliação e perícia ambiental*. Bertrand Brasil, Rio de Janeiro, Brasil. p. 115-171, 2005.
- ANDRADE, M. W.; LUZ, J. M. Q.; LACERDA, A. S.; MELO, P. R. A. Micropropagação da Aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All). *Ciência Agrotécnica*, Lavras, v. 24, n. 1, p. 174-180, 2000.
- ANDREJOW, G. M. P. Minijardim clonal de *Pinus taeda* L.. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR. 2.006, p. 103
- ARAUJO, F. F. et al. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development.. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 1639-1645, 2005.
- ARAUJO, F. F.; GUABERTO, L. M.; SILVA, I. F. Bioprospecção de rizobactérias promotoras de crescimento em *Brachiaria brizantha*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, n.3, p.521-527, 2012.
- ASHRAFUZZAMAN, M. et al. Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. **African Biotechnology**, v.8, n. 7, p. 1247 a 1252, 2009.
- ATLAS, M.; BARTHA, R. Microbial evolution and biodiversity. In: ATLAS, M.; BARTHA, R. **Microbial ecology**. Menlo Park: Benjamin/Cummings Science, P.27-57, 1998.

BARBIERI, P., ZANELLI, T., GALLI, E. e ZANELLI, G. Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3acetic acid production. **FEMS Microbiology Letters**, 36:87-90, 1986.

BARNETT, H. L. e HUNTER, B. B. **Illustrated genera of imperfect fungi. The american phytopathological society**. P. 220, 1998.

BARRUETO-CID, L. P. Cultivo in vitro de plantas. 3. ed. Brasília: Embrapa, p. 325, 2014.

BEJ, A.K. Detection of microbial nucleic acids by polimerase chain reaction in aquatic samples. Second Edition . In: **Molecular Ecology Manual**, p. 369-432 2004.

BETTIOL, W. Isolamento seletivo de *Bacillus*. In: MELO, I.S.; SANHUEZA, R.M.V. (Coord.) Métodos de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos. Jaguariúna: **Embrapa-CNPMA**, 1995.p.35-36.

BOER M. DE, VAN DER SLUIS VAN DER I., C. VAN LOON L.,BAKKER P. A.H.M. . Combining fluorescent *Pseudomonas* spp. strains to enhance suppression of fusarium wilt of radish.**European Journal of Plant Pathology**, 105: 201–210, 1999.

BORGES, S. R.; XAVIER, A. ; OLIVEIRAL, L. S. , MELO,L. A., Rosado, A. M. Enraizamento de Miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus globulus*. **Revista Árvore**, v.35, n.3, p.425-434, 2011.

BRAGA, E.T.M. Diversidade morfológica e produção de *Bertholletia excelsa* H.B.K. (Lecythidaceae) no sudeste do estado do Acre, Brasil. 2007. 45p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Manejo de Recursos Naturais) - UFAC (Universidade Federal do Acre), Rio Branco, AC.

BRAVO, A., LIKITVIVATANA VONG., GILL, S.S., SOBERON, M. *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. **Insect Biochem Molec.**, 41(7): 423-31, 2011.

BROWN, T.A. **Molecular Biology**. 2 ed. Manchester: Academic Press, (Gene Analysis; v. II), 255 p.1998.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios Nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética. Brasília: **Embrapa-SPI / Embrapa-CNPQ**, v.1 p.87-132, 1998.

CAMARGO, F. F. Etno conhecimento e variabilidade morfológica de Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl: Lecythidaceae em área da Amazônia

Matogrossense. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) UFMT (Universidade Federal do Mato Grosso), Cuiabá, 2010.

CAMARGO, I. P. Estudos sobre a propagação de castanheira-do-Brasil (*Bertolletia excelsa* Humb & Bonpl.), Tese (Doutorado) UFLA, Lavras, MG, p. 127, 1997.

CAMARGO, J. E. M. Nozes e castanhas: a nova galinha dos ovos de ouro do agronegócio. Disponível em <https://www.comexdobrasil.com/nozes-e-castanhas-a-nova-galinha-dos-ovos-de-ouro-do-agronegocio/>. Acesso em 19 de março de 2020.

CAMARGO, S. da S.; Avanços no sistema de micropropagação de cultivar italiana de morangueiro „Pircinque”, recentemente registrada e protegida no Brasil. 2018. 154 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2018.

CANELLAS, L. P.; DA SILVA, S. F.; OLK, D. C.; OLIVARES, F. L. Foliar application of plant growth-promoting bacteria and humic acid increase maize yields. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v.13, n. 1, 2015.

CANIATTO, M. M. **Promoção de crescimento e potencial de indução de resistência em tomateiro à mancha-alvo mediadas por rizobactérias.** Dissertação (Mestrado em Agricultura no trópico úmidos, INPA), Manaus-AM. Disponível em < <https://bdtd.inpa.gov.br/handle/tede/2569> >Acessado em 17 de maio de 2020.

CARVALHO, S. M. S. **Cultivo in vitro de sementes imaturas de *Bertolletia excelsa* H.B.K.** Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) – Área de Concentração em Ambiente, Saúde e Sustentabilidade, Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, RO, 2012.

CARVALHO, D.; PINTO, J. E. B. P.; PASQUAL, M. Uso de fungicida e antioxidantes em cultura in vitro de segmentos nodais ou *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden. **Revista Ciência e Prática**, Lavras, v. 14, n. 1, p. 97- 106, 1990.

CHALITA, P. B., FARIAS, E. N. C., COSTA, I. B., SOUSA, B. F., SANTOS, M. A. O., ALBUQUERQUE, T. C. S., VITAL, M. J. S., SILVA, K. Characterization of bacterial endophytes from the roots of native and cultivated Brazil nut trees (*Bertolletia excelsa*). **Acta Amazônica**, n. 4, v. 49, p. 257 – 267, 2019.

CHIAPETTA, M. S. Bioeconomia. Disponível em <<https://www.ecycle.com.br/4518>>- Acesso em 22.07.2019.

CID, L.P.B. e TEIXEIRA, J.B. - Explante, meio nutritivo, luz e temperatura. In: Cid, L.P.B. (Ed.) - Cultivo in vitro de plantas. Brasília: EMBRAPA, 325 p. 2014.



- CLAY, J. W., Ed. **Brazil nuts: the use of a keystone species for conservation and development.** Harvesting Wild Species: Implications for Biodiversity Conservation. Baltimore, MD: The John Hopkins University Press, p.246-282. 1997.
- CLINE, M. G. Apical Dominance. **The Botanical Review**, New York, v. 57, n. 4, p. 318-358, 1991.
- CONCEIÇÃO, J. B. F.; FERREIRA, S. A. N.; LIMA, N. N. Potencial de resgate vegetativo da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) a partir de brotações epicórmicas de ramo sdestacados, 2.019, p. 34 - 56. Disponível em <https://btda.inpa.gov.br/bistream/tede/3153/2/> acessado em 08.06.2020.
- COSTA, M, P,;; LAMEIRA, O, A.; INNECO, R.; , BARBOSA, S. M. Produção de mudas in vitro para a indústria de perfumaria. 18º Seminário de Iniciação Científica e 2º Seminário de Pós-graduação da **Embrapa Amazônia Oriental**. Belém-PA, 2014.
- DA SILVEIRA, E. L. Inoculações de bactérias promotoras de crescimento no cultivo de arroz em solução nutritiva. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2008.
- DIAS, P. C.; XAVIER, A.; OLIVEIRA, L. S.; CORREIA, A. C. G.; BARBOSA, G. A. Tipo de miniestaca e de substrato na propagação vegetativa de angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 25, n. 4, p. 909-919, out.-dez., 2015.
- DUTRA, L. F., WENDLING, I., BRONDANI, G., E.. A Micropropagação de **Eucalipto**. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 58, p. 49-59, Colombo, 2009.
- FACHINELLO, J. C; HOFFMANN, A.; NACHTGAL, J. C. Propagação de plantas frutíferas. Brasília: **Embrapa Informações Tecnológicas**, p. 221, 2005.
- FAN, B. CHEN X. H., BUDIHARJO A., BLEISS W., VATER J, BORRISS R. Efficient colonization of plant roots by the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, engineered to express green fluorescent protein. **Journal of Biotechnology**, n. 4, v. 151, p. 303-311, 2011.
- FERRIANI, A. P., ZUFFELLATO-RIBAS, K. C., WWNSKUBF, I. Miniesataquia aplicada a espécies florestais. **Revista Agroambiente**, v.4, n. 2, p. 1002-109, 2010.
- FERNANDES, A.C. Propagação vegetativa e estabelecimento *in vitro* de *Swietenia macophylla* King e *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S. O. Grose. Dissertação



(Mestrado em Engenharia Florestal), Instituto de Pesquisa da Amazônia – INPA, Manaus, 2015.

FERNANDES, D. A. Germinação e propagação in vitro de *Myracrodruon urundeuva* Allemão (aroeira-do-sertão). Tese de Doutorado, Cuiabá-MT, 2016.

FERNANDES, S. J. O.; SANTANA, R. C.; SILVA, E. B.; SOUZA, C. M. P.; SILVA, C. T. Período de enraizamento de miniestacas de eucalipto provenientes de diferentes lâminas de irrigação em minijardim. **Ciência Florestal**, Santa Maria-RS, v.28 n. 2, p. 591-600, 2018.

FERMINO JÚNIOR, P. C. P.; NAGAO, E. O.; PEREIRA, J. E. S. Estabelecimento, germinação e multiplicação in vitro de teca (*Tectona grandis* L.f.) a partir de genótipos da Amazônia Sul-Occidental. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 37, n. 84, p. 427-435, 2009.

FIGUEIREDO, G. R. G.; VILLASBOAS, F. S.; OLIVEIRA, S. J. R.; SODRÉ, G. A.; SACRAMENTO, C. K. Propagação da gravioleira por miniestaquia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v.35 n.3, p.860-865, 2013.

FREITAS, S. S. & C. I. AGUILAR VILDOSO. Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, n. p 987-994, 2004.

GRAY, E.J. & SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology And Biochemistry** 37: 395-412, 2005.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília: **ABCTP/ EMBRAPA CNPH**, p. 183-260, 1998.

GUARIM NETO, G.; GUARIM, V.L.M.dos.; CARNIELLO, M.A.; SILVA, C.J. da.; PASA, M.C. Etnobiologia, etnoecologia e etnobotânica: as conexões entre o conhecimento humano e os ambientes em Mato Grosso, Brasil. In: Etnobiologia e etnoecologia: pessoas e natureza na América latina. (Org.) ALMEIDA, A.L.de.; SILVA, V.A.da.; ALBUQUERQUE, U.P. 1º Edição. Recife: **NUPEEA**, 2010.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O.; FRAGA, H. P. F.; VIEIRA, L. N.; FRITSCHKE, Y. Biologia I. Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Fitotecnia. 44 p. 2016.

HARTMANN, H. T.; KESTER, D. E. **Plant propagation: principles and practices**. Prentice-Hall. Boston, USA, 2011.

HOMMA, A. K. O; MENEZES, A. J. E. A. 2. Castanheiro-do-pará: os desafios do extrativismo para plantios agrícolas. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**,n.9, v.2, p. 29, 3-306, Belém, 2014.

HULTON, C.S.J.; HIGGINS, C.F.; SHARP, P.M.ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of Escherichia coli, almonella typhimurium and other enterobacteria. **Molecular Microbiology**,v.5, p.825-762, 1991.

IGUAL, J.M.; VALVERDE, A.; CERVANTES, E.; VELÁSQUEZ, E. Phosphatesolubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of update molecular techniques in their study, **Agonomie**, Montpellier, v.21, p.561-568, 2001.

KARADENIZ, A., TOPCUOGLU, S. F; INAN, S. Auxin, Gibberellin, Cytokinin and Abscusic Acid Production em Some Bactéria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 10, p 1061 a 1064, 2006.

KERBAUY, G. B. Fisiologia vegetal. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 452p, 2004.

KENT, A. D.; TRIPLETT, E. W. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems.**Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v.56, p. 211-36, 2002.

KUSS,A. V.; KUSS V. V.; LOVATO T.; FLÔRES, M. L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas.**Pesquisa agropecuária brasileira**, no.10, vol.42 Brasília, 2007.

LAFETÁ, B. O.; MATOS, M. P.;LAGE, P.;FERRARO, A. C.;PENIDO, T. M. A. Ácido indol-3-butírico (AIB) no enraizamento de estacas de fedegoso gigante. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, v. 36, n. 88, p. 489-496, 2016.

LOPES M.,2016. Brasil apto para a bioeconomia. Disponível em <<https://www.embrapa.br/>>Acesso em 23 de julho de 2019.

LUDWIG, W. et al. Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum.**FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.153, n.1, p. 181-90, 1997.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., PARKER, J. (Eds.). **Microbiologia de Brock. 12ª Edição**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2010.

MAFIA, R. G. *et al.* Efeito de rizobactérias sobre o enraizamento e crescimento de clones de eucalipto em diferentes condições de propagação clonal. **Revista Árvore** n.5, v.31, 2007.

MANTOVANI, N.C.; FRANCO, E.T.H. Cultura de tecidos de plantas lenhosas. Santa Maria: UFSM/CEPEF, p.123, 1998.

MANTOVANI, N.; ROVEDA, M.; TRES, L.; FORTES, F. O.; GRANDO, M. F. Cultivo de canafístula (*Peltophorum dubium*) em minijardim clonal e propagação por miniestacas. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 27, n. 1, p. 225-236, 2017.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônoma**, Recife, vol. 1, p.89-111, 2004.

MARMUR, J. A. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. **Journal of Molecular Biology**, v. 3, p. 208-218, 1961.

MAUÉS, M. M.; KRUG, C.; WADT, C. H.O.; DRUMOND, P. M.; CAVALCANTE, M. C.; SANTOS, A. C. S. A castanheira-do-brasil: avanços no conhecimento das práticas amigáveis à polinização. *Funbio*, 84 p. 2015.

MENDONÇA, V.; FREITAS, W. E. S.; DANTAS, L. L. G. R.; ALMEIDA, J. P. N.; PEREIRA, E. C. Propagação de Fruteiras. Universidade Federal Rural do Semi-árido, Departamento de Ciências Vegetais, Lavras, 37p, 2012.

MOREIRA, F. M. S. & SIQUEIRA, J. O. Rizosfera In: MOREIRA, F. M. S. & SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2ª edição atualizada e ampliada. Lavras, Editora UFLA, p 407-447, 2006.

MOREIRA, A.L.L. e ARAÚJO, F.F. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* spp. como potenciais promotores de crescimento de *Eucalyptus urograndis*. **Revista Árvore**, n.5, v.37, p.933-943, 2013.

MORI, S. A.; PRANCE, G. T. Taxonomy, ecology and economic botany of the Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl. Lecythidaceae). *Adv. Econ. Bot.* v. 8, p. 130-150. 1990.

MÜLLER, C.H.; FIGUEIREDO, F.J.C.; KATO, A.K.; CARVALHO, J.E.U.; STEIN, R.L.B.; SILVA, A.B. A cultura da castanha-do-brasil. **Embrapa**, Brasília, p. 65, 1.995.  
NASCIMENTO, J. S., 2016. Biologia de Microrganismos. Disponível em <[http://portal.virtual.ufpb.br/biologia/novo\\_site/Biblioteca/Livro\\_4/6-Biologia\\_de\\_Microrganismos.pdf](http://portal.virtual.ufpb.br/biologia/novo_site/Biblioteca/Livro_4/6-Biologia_de_Microrganismos.pdf)> Acesso em 15 de junho de 2019.

MURASHIGUE, t.; SKOOG, F. A revised médium for rapid growt and bioassays with tabacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, Lund, v. 15, n. 3. P. 473-497, 1962.

NOGUEIRA, R.C. **Propagação *in vitro*, análises anatômicas e bioquímicas de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.)**. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, MG, p. 88, 2003.

NOGUEIRA, R. C.; PAIVA, R.; OLIVEIRA, L. M.; SOARES, G. A.; SOARES, F. P.; CASTRO, A. H. F.; PAIVA, P. D. O. Indução de calos em explantes foliares de murici-pequeno. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 366-370, 2007.

NOGUEIRA, J. M. R.; MIGUEL, L. F. S., 2009. Bacteriologia.  
<<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/8661>> Acesso em 16 de junho de 2019.

OLIVEIRA, T. P. F.; BARROSO, D.G.; LAMÔNICA, K. R.; CARVALHO, G. C. M. W. Aplicação de AIB e tipo de miniestacas na produção de mudas de *Handroanthus heptaphyllus* Mattos. **Ciência Florestal**, v. 26, n. 1, p. 313-320, 2016.

Palma D, Schuelter A, R, Stefanello S & Fortes, A. M. T. Aspectos morfofisiológicos e controle da hiperhidricidade na cultura de tecidos vegetais. **Current Agricultural Science and Technology** 17: 174-184. 2011.

PEIXOTO, C. P. Curso de Fisiologia Vegetal. Cruz das Almas, UFRB. 177pp, 2011.

PENNACCHIO, H. L. Castanha do Brasil. **Boletim da Sociobiodiversidade**. Companhia Nacional de Abastecimento, v.5, n. 2, p.15-16, 2021.

QUISEN, R. C.; ANGELO, P. C. S. Manual de procedimentos do laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental, p. 44, 2008.

RAASCH, L. D; BONALDO, S. M; OLIVEIRA, A. A. F. *Bacillus subtilis*: enraizamento e crescimento de miniestacas de eucalipto em Sinop, norte de Mato Grosso, Brasil. **Biosci. J., Uberlândia**, v. 29, Supplement 1, p. 1446-1457, 2013.

RAMBAUT, A. 2009. **Tracer 1.5**. Disponível em <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer> Acesso em 19 de julho de 2019.

ROCHA, S. C.; QUORIN, M.; RIBAS, L. L. P.; KOEHLER, H. S. Micropropagação de *Cabralea canjerana*. **Revista Árvore, Viçosa**, v. 31, n. 1, p. 43-50, 2007.

RODRIGUES, A. A. Diversidade e prospecção de rizobactérias associadas à cana-deaçúcar sob manejo orgânico: metodologias clássicas e moleculares a serviço da agroecologia. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais). Universidade Federal de Goiás, GO, 2018.

ROSCOE R., 2016. Brasil apto para a bioeconomia. Disponível em <<https://www.embrapa.br/>> Acesso em 23 de julho de 2019.

SALOMÃO, R. P. A castanheira: história natural e importância socioeconômica. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, 9 v.2, p. 259-266, Belém, 2014.

SANTANA, A. C., SANTANA, Á. L., SALOMÃO R. P., SANTANA Á. L., COSTA N. L., SANTOS, M. A. S. O custo socioambiental da destruição de castanheiras (*Bertholletia excelsa*) no estado do Pará. **Revista de Estudos Sociais**, n. 37, v. 18, p.3, 2016.

SANTOS, E., ARAUJO, R. R. NT Testes de comparação de protocolos de extração de DNA e de maceração de tecido de *Platonia insignis* Mart. (Clusiaceae). **Revista Brasileira de Biocência**, Porto Alegre, v. 15, n.4, p. 199-202, 2017.

SANTOS, E. K. Totipotência celular e cultura de tecidos vegetais. In: FREITAS, L. B.; CERED, F. **Genética e evolução vegetal**. Rio Grande do Sul: UFRGS, p. 415-444, 2003.

SARTOR, F. R. ; ZANOTTI, R. F. ; PÔSSA, k. F. ; PILON, A. M. ; FUKUSHIMA, C. H.. Diferentes meios de cultura e antioxidantes no estabelecimento *in vitro* do JACARANDÁ DA BAHIA. **Bioscience Journal**. Ubertândia, v. 29, n. 2, p. 408-411, 2013.

SCHOTTZ, E. S.; KALIL FILHO, A. N.; TRACZ, A. L.; KOEHLER, H. S.; RIBAS, L. L. F.; QUOIRIN, M. Multiplicação *in vitro* de *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae) a partir de material juvenil. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 17, n. 2, p. 109-117, 2007.

SHANLEY, P.; SERRA, M.; MEDINA, G. (eds). Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica. 2ª edição revista e ampliada. **Cifor. Embrapa Informação Tecnológica**. P. 316 p., 2010.

SOARES, F.P. et al. Efeito de meios de cultura, concentrações de GA<sub>3</sub> e pH sobre a germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, p.1847-1852, 2009. Disponível em:



<<http://www.scielo.br/pdf/cagro/v33nspe/25.pdf>>. Acesso em: 11.7.2023. doi: 10.1590/S1413-70542009000700025.

SOARES-DA-SILVA, J., PINHEIRO, V. C., LITAIFF-ABREU, E., POLANZYK, R. A., TADEI, W. P. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from the state of Amazonas, in Brazil, and screening against *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). **Revista Brasileira de Entomologia**. 59: 1-6, 2015.

SOUZA, Ê. C. M., LOUREIRO, I. S. Povos e Comunidades Tradicionais e sua relação com a conservação ambiental. **Boletim da Sociobiodiversidade**. Companhia Nacional de Abastecimento, n.1, v. 3, p.5-9, 2019.

SOUZA, E. C. M.; LOUREIRO, I. S. A comercialização de produtos oriundos da sociobiodiversidade. **Boletim da Sociobiodiversidade**. Companhia Nacional de Abastecimento, v.3, n. 2, p.25-30, 2019.

SOUZA, R. Estabelecimento in vitro, micropropagação e variação somaclonal de lúpulo (*Humulus lupulus* L.). Dissertação (Mestrado), Universidade de Santa Catarina, PPG, Produção Vegetal, p. 80, 2020.

STEFANEL, C.M. (2016) - Aspectos da qualidade e sementes e do estabelecimento in vitro de *Eugenia involucrata* de Candolle. Dissertação (Mestrado). Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria. 101 p. 2016.

TAIZ, L. e ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, p. 719, 2004.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Mol Bio Evol** v.30, p.2725-2729, 2013.

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, n. 1, p. 118-123, São Paulo, 2007.

TEIXEIRA, S.L.; TORRES, A.C. Organização do laboratório de cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de tecidos e transformação genética de plantas. Brasília : **Embrapa-SPI/Embrapa-CNPQ**. v. 1, p. 71-86, 1998.

TITON M., XAVIER A., REIS G. G. Otoni W. C. Eficiência das minicepas e microcepas na produção de propágulos de clones de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**, n.5, v.27,p.619-625, Viçosa-MG,2003.

THORPE, T.A.; HARRY, I.S.; KUMAR, P.P. Application of micropropagation to forestry. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. Micropropagation: technology and application. Dordrecht: Kluwer Academic Press, p. 311-336, 1991.

TORRES, A. C., FERREIA, A. T., . EMBAPA Hortaliças, SÁ, F. C., BUSO, J. A., CALDAS, L. S., NASCIMENTO, A. S., BÍGIDO, M. M., OMANO. Glossário de biotecnologia vegetal. **EMBRAPA** hortaliças, Brasília, 128 p., 2000.

VERSALOVIC J. SCHNEIDER M., DE BRUIJN F.J., LUPSKI J.R., Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequences based on PCR (rep-PCR), **Methods in Molecular and Cellular Biology**, New York, v.5 p.25–40, 1994.

VERNIER, R. M.; CARDOSO, S. B. Influência do ácido indol-butírico no enraizamento de estacas em espécies de frutíferas e ornamentais. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência**, n.2, v.2, p.11-16, 2012.

VILLARREAL-DELGADO M.F., VILLA-RODRÍGUEZ E.D., CIRACHÁVEZ L.A., ESTRADA-ALVARADO M.I., PARRA-COTA F.I., VILLALOBOS, S. S.. The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. **Revista Mexicana de Fitopatología**, n.1, v. 36, p. 95-130, 2018.

WENDLING, I. Propagação clonal de híbridos de *Eucalyptus* spp. por miniestaquia. Viçosa, MG: UFV, 1999. 70p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal)– Universidade Federal de Viçosa, 1999.

WENDLING, I.; FERRARI, M.P.; DUTRA, L.F. Produção de Mudanças de corticeira-domato por miniestaquia de propágulos juvenis. Paraná: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Florestas. **Comunicado Técnico**, Curitiba, 2005.

XAVIER, A., ANDRADE, H. B., OLIVEIRA, M. L., WNDLING, I. Desempenho do enraizamento de microestacas e miniestacas de clones híbridos de *Eucalyptus grandis*. **Revista Árvore**. V.25, n.4, p. 403-411, Viçosa-MG, 2001.

XAVIER, A., WENDLING, I. Miniestaquia na clonagem de *Eucalyptus*. (**Informativo Técnico SIF**, 11). 10p. Viçosa, MG: SIF, 1998.

XAVIER, A.; SILVA, R. L. Evolução da silvicultura clonal de *eucalyptus* no Brasil. **Agronomía Costarricense**. San José, v. 34 n. 1, p. 93 – 98, 2010.

Xiao Y, Niu G & Kozai T . Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 105: 149-158, .2011.



## 6 APÊNDICES

**Tabela 2.** Lista de *Bacillus* spp isolados no município de Manaus-AM no ano de 2019.

Espécie	Local	ID. Isolados	Data do isolamento	Observações
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO5PB12D	16.5.19	
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO5PB12C	16.5.19	
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO5PB12J	16.5.19	
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO5PB11A	16.5.19	
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO5PB12L	16.5.19	
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO5PB12K	16.5.19	
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO5PB12A	16.5.19	
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO5PB12B	16.5.19	
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO5PB11A2	16.5.19	
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO5PB11B	16.5.19	
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO5PB12A2	16.5.19	
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO5PB12C	16.5.19	
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO3PB12A	12.6.19	
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO3PB12B	12.6.19	
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO3PB12C	12.6.19	
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO3PB12D	12.6.19	
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO3PB12E	12.6.19	
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO3PB12F	Cont.12.6.19	
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO3PB12G	Cont.12.6.19	

<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO3PB12H	12.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO3PB12I	12.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO3PB12J	12.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO3PB12A2	12..6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO3PB11A	12..6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO3PB11B	12.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO3PB11C	12.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO3PB11D	12.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO3PB12B2	12.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO3PB12C2	12.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO3PB12X	12.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO3PB11A2	12.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO2PB12A	03.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO2PB12B	03.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO2PB12D	03.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO2PB12E	03.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO2PB12F	03.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO2PB12G	03.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO2PB12H	03.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO2PB12I	03.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO2PB12J	03.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO2PB12L	Cont.03.6.19

<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO2PB11A	03.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO2PB11A2	03.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO2PB11B	03.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO4PB12A	03.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO4PB12B	03.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO4PB12C	03.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO4PB12D	03.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO4PB11A	03.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAO4PB11B	03.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAOPB22	03.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAOPB33	03.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAOPB21	03.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAOPB32	03.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAOPB52	03.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAOPB53	03.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAOPB31	03.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAOPB21A	03.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAOPB14A	03.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAOPB14B	03.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAOPB22C	03.6.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAOPB22H	02.2.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAOPB22I	Cont.02.2.19



<i>Bacillus</i>	Manaus	MAOPB22J	02.2.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAOPB33A	02.2.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAOPB33B	02.2.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAOPB33C	02.2.19
<i>Bacillus</i>	Manaus	MAOPB38B	02.2.19

---

## 7 ANEXOS

### Etapas para sequenciamento de amostras

#### 1ª ETAPA → PCR convencional

##### 2ª A EXO-SAP

1. Adicionar 0,5, uL de Exo-Sap para 5 uL da solução de PCR
2. Incubar a 37°C por 15 minutos (Ativação da enzima) e 80°C por 15° (Desativação da enzima). Ir para etapa 3

#### 2ª B ETAPA → Purificação da PCR (PEG) (Realizar na Falta da Exo-Sap)

- 2.1 Adicionar 5 µL de PEG 20% e homogeneizar (vortex);
- 2.2 Colocar em termociclador (37°C por 15 minutos);
- 2.3 Centrifugar (2.500rfc por 15 minutos) a temperatura ambiente e descarte o sobrenadante (Inverta a placa na centrífuga e centrifugue a 140g x 20seg);
- 2.4 Adicionar 125 µL de Etanol 80% refrigerado;
- 2.5 Centrifugar (1.450rfc por 2 minutos) a temperatura ambiente e descarte o sobrenadante (Inverta a placa na centrífuga e centrifugue a 140g x 20seg);
- 2.6 Evaporar o álcool em termociclador a 95°C por 3min;
- 2.7 Adicionar 5 µL de água Ultra-pura e homogeneizar suavemente.

#### 3ª ETAPA → Reação de Sequenciamento

Reagentes	1 reação	12 reações
H <sub>2</sub> O UP	2µL	24 µL
Tampão Big Dye	1,5 µL	18 µL
Big Dye Terminator (v3.1)	0,5 µL	6 µL
Primer F ou R (3,2pmol)	1 µL	12 µL
Produto de PCR	5 µL	60 µL
Volume Final	10 µL	120 µL

#### Incubar no termociclador (programa gravado)

96°C por 1min – 1x

96°C por 15seg

50°C por 15seg 35x

60°C por 4min

10°C ∞

4ª ETAPA → Purificação para precipitação das reações de sequenciamento (placa c/96poços) 10 µL de reação

- 4.1 Remova a placa de reação de 96 poços do termociclador e centrifugue rapidamente (spin);

- 4.2 Adicione 5  $\mu\text{L}$  de EDTA 125mM em cada poço;
- 4.3 Adicione 60  $\mu\text{L}$  de Etanol 100% em cada poço;
- 4.4 Sele a placa, cubra com papel alumínio e misture com vortex;
- 4.5 Incube a temperatura ambiente por 15min;
- 4.6 Centrifugue à 4°C, 3000g x 30min;
- 4.7 Inverta a placa na centrífuga e centrifugue a 185g x 20seg, em seguida retire da centrífuga;
- 4.8 Adicione 60  $\mu\text{L}$  de Etanol 70% em cada poço;
- 4.9 Centrifugue à 4°C, 1650g x 15min;
- 4.10 Inverta a placa na centrífuga e centrifugue a 185g x 20seg, em seguida retire da centrífuga  
(Nota: comece a contar o tempo (1') quando o rotor começar a se mover)
- 4.11 Evaporar o álcool em termociclador a 95°C por 3min;
- 4.12 Ressuspenda as amostras em 10  $\mu\text{L}$  de tampão de injeção (HI-DI formamida);
- 4.13 Misture com vortex (3s) e centrifugue 2000g x 30seg;
- 4.14 Incubar em termociclador a 95°C por 3min e colocar imediatamente no gelo e levar para sequenciamento.

## PROTOCOLO EXPERIMENTAL — EXTRAÇÃO DE DNA (CTAB) MODIFICADO

- 1) Prepare de antemão as soluções listadas na tabela 1. Ligue o banho-maria a 65°C. Prepare três conjuntos idênticos de tubos devidamente numerados. Anote na ata de laboratório a correspondência entre os números nos tubos e a identificação das amostras.
- 2) Para cada microextração serão utilizados 700 µL de tampão de extração. Calcule a quantidade total necessário de tampão de extração multiplicando o número de amostras por 700 µL e adicione mais alguns mL para segurança. Adicione 2-mercaptoetanol à quantidade necessária de tampão de extração. Mantenha o tampão de extração aquecido em banho-maria a 60 - 65°C.

Obs.: Para macroextração tubos de 15 mL, usar 5 mL de tampão de extração caso utilize acetato de potássio e 7 mL de tampão de extração para extrações sem o uso de acetato de potássio, com 1 – 3 g de amostras.

Para tubos de 50 mL usa-se 15 mL de tampão de extração, com 3-5 g das amostras.

- 3) Pese 50 a 200 mg de tecido fresco para cada amostra. Se estiver utilizando folhas, corte as folhas em tiras de aproximadamente 3 a 5 mm de largura. Disponha as tiras de tecido dentro do almofariz para a maceração do tecido.
- 4) Adicione N<sub>2</sub> líquido em quantidade suficiente para cobrir a amostra. Espere até que o tecido esteja bem congelado (“crocante”) antes de iniciar a maceração. Este detalhe é muito importante. Uma vez iniciada a maceração não é indicado adicionar mais nitrogênio líquido. Se for adicionado, o tecido fragmentado pode ser expelido do almofariz e ocorre, portanto, perda de material. Em geral é possível congelar e macerar 2 a 4 amostras simultaneamente antes que o nitrogênio líquido evapore.
- 5) Macere o tecido utilizando um pistilo por uns 20 a 40 segundos ou até o tecido ficar totalmente pulverizado. Depois de macerado adicione 700 µL de tampão de extração. Misture o tecido no tampão, transfira para um tubo devidamente identificado.
- 6) Incube os tubos em banho-maria a uma temperatura de 60-65°C por no mínimo 30 minutos. Esta incubação pode se prolongar até 60 minutos, sem em geral, alterações nos resultados da extração. Durante a incubação, agite a cada 10 minutos para homogeneizar a suspensão. Retire do banho-maria.
- 7) Adicionar solução de proteinase K, de modo a obter a concentração final de 100 µg/mL e misturar. f) Incubar a 50°C por três horas, misturando algumas vezes.
- 8) Retire os tubos do banho-maria e adicione 200 µL de acetato de potássio (3M pH 5.2). Homogeneizar por inversão e incubar no gelo por 15 minutos.

Obs.: para tubos de 15 mL adicionar 2 mL de acetato de potássio 3M, e tubos de 50 mL adicionar 5 ml de acetato de potássio 3M.

Obs. Para extração com Fenol saturado, Em capela de exaustão usar 1 volume de fenol saturado. Agite os tubos durante 5 minutos invertendo-os no mínimo 20 vezes ou até fazer uma emulsão homogênea. Centrifugue os tubos em microcentrífuga a velocidade máxima (12000 a 15000 RPM) 5 minutos para microtubos. Tubos de 15 e 50 mL centrifugar a velocidade máxima de 4800 RPM, por um tempo de 15 minutos. Transfira o sobrenadante para um novo tubo e adicione 1 volume de Fenol-

Clorofórmio/Álcool Isoamílico (25:24:1). Agite os tubos durante 5 minutos invertendo-os no mínimo 20 vezes ou até fazer uma emulsão homogênea. Centrifugue os tubos em microcentrífuga a velocidade máxima (12000 a 15000 RPM) 5 minutos para microtubos. Tubos de 15 e 50 mL centrifugar a velocidade máxima de 4800 RPM, por um tempo de 15 minutos. Transfira o sobrenadante para um novo tubo.

- 9) Em capela de exaustão adicione 600  $\mu\text{L}$  de CIA (clorofórmio/ álcool isoamílico 24:1). Agite os tubos durante 5 minutos, invertendo-os no mínimo 20 vezes ou até fazer uma emulsão homogênea. Centrifugue os tubos em microcentrífuga a velocidade máxima (12000 a 15000 RPM) 5 minutos.

Obs.: Tubos de 15 e 50 mL adicionar 1 volume CIA (clorofórmio/ álcool isoamílico 24:1). Agite os tubos durante 5 minutos e centrifugar a velocidade máxima de 4800 RPM, por um tempo de 15 minutos.

- 10) Retire os tubos da centrífuga cuidadosamente. Evitando perturbar a interface entre as duas fases formadas, pipete a fase aquosa para um novo tubo. Para acelerar esta operação, é útil regular a pipeta para 180  $\mu\text{L}$  e retirar 3 alíquotas (~540  $\mu\text{L}$ ) fixas. Mesmo que isso implique em deixar algum volume para trás, este procedimento ajuda a evitar possíveis contaminações com a fase orgânica inferior.
- 11) Adicione 2/3 do volume da solução aquosa (~400  $\mu\text{L}$ ) de isopropanol frio (-20°C). Misture gentilmente para precipitar os ácidos nucleicos. Se o precipitado não for visível, coloque o tubo a -20°C por 30 minutos ou mais. **Este é o ponto adequado para parar o procedimento de extração se não for possível continuar no mesmo dia.**
- 12) Centrifugue os microtubos a velocidade de 6000 a 7500 RPM em microcentrífuga durante 3 a 5 minutos, para formação do pellet Se o pellet não for visível coloque o tubo a -20 por 30 minutos ou mais, e centrifugue novamente.
- 13) Gentilmente derrame o máximo possível de sobrenadante sem perder o pellet. Este em geral será difuso e solto e estará no fundo ou ao longo da parede do tubo dependendo do ângulo do rotor.
- 14) Lave o pellet duas vezes em 1 mL de 70% etanol. Deixe o pellet imerso por 5 a 10 minutos cada vez. Geralmente o pellet fica mais branco a este ponto, centrifugue por 1 minuto e retire o etanol 70%.
- 15) Lave o pellet uma vez em 1 mL de 95% etanol (ou etanol absoluto) durante 2 a 3 minutos centrifugue por 1 minuto. Deixe o pellet secar ao ar durante algumas horas se possível em fluxo laminar, ou seque-o em centrífuga a vácuo por 5 a 10 minutos.
- 16) Eluir o pellet em 25 a 100  $\mu\text{L}$  (o volume final vai depender do tamanho do pellet) de tampão [TE], contendo 10  $\mu\text{g/mL}$  de RNase A 10 mg/mL. Incube a 37°C de 30 a 120 minutos para a degradação do RNA.



- 17) Corra um minigel de eletroforese (1 % agarose em TBE) para estimar a concentração de DNA por  $\mu\text{L}$  e consequentemente a quantidade total de DNA extraído. A decisão sobre quantos microlitros carregar no gel dependerá basicamente do tamanho dos pellets obtidos, da viscosidade da solução de DNA e da experiência anterior com o material. Tipicamente carrega-se de 2 a 5  $\mu\text{L}$  das soluções de DNA extraído. Lado a lado com as amostras, carregue quantidades conhecidas de DNA procurando ter no gel quantidades que cubram a faixa de concentração na qual as amostras extraídas se enquadrem. Geralmente com esta minipreparação são obtidas concentrações de 10 a 200  $\text{ng}/\mu\text{L}$ . Portanto como padrão é interessante se carregar quantidades crescentes como 10, 50, 100 e 200  $\text{ng}$  de DNA. Geralmente utiliza-se como padrão o DNA não cortado do fago Lambda

Tabela 1. Soluções utilizadas no protocolo de extração de DNA para análise

Tampão de extração 2 x CTAB	
Para preparar 100 mL	
2,0% CTAB <i>PA A04</i>	2,0 g
1,4 M NaCl <i>PO4 A02</i>	8,12 g
20 mM EDTA <i>gelatina PH 8,0</i>	4 mL de um estoque 0,5 M
100 mM Tris-Cl pH 8,0 <i>gelatina HCl</i>	10 mL de um estoque 1M
1,0% polyvinylpyrrolidone <i>PO4 A02</i>	1 g
	água até 100 mL
0,2% 2-mercaptoetanol (adicionar antes do uso)	2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de tampão

ou mesmo o Lambda cortado com *Hind III* ou outra enzima, de maneira que seja possível calcular a quantidade de DNA em cada banda a partir da informação do seu mapa de restrição.

Tampão TE	
Para preparar 1000 mL	
10 mM Tris-Cl	10 mL de um estoque 1M Tris-Cl (pH 8,0)
1 mM EDTA	2 mL de um estoque 0,5 M EDTA (pH8,0)
	água até 1000 mL