

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Catarina Sofia dos Santos Martins

ANÁLISE DO MICROBIOMA *IN VIVO* E *IN*
VITRO DE TAMARILHO
(*SOLANUM BETACEUM* CAV.)

Dissertação no âmbito do Mestrado em Biodiversidade e
Biotecnologia Vegetal, orientada pelos Doutores João Filipe da Silva
Martins e Jorge Manuel Pataca Leal Canhoto e apresentada ao
Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Julho de 2022

Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade de Coimbra

**ANÁLISE DO MICROBIOMA *IN VIVO* E *IN*
VITRO DE TAMARILHO
(*SOLANUM BETACEUM* CAV.)**

Catarina Sofia dos Santos Martins

Dissertação no âmbito do Mestrado em Biodiversidade e Biotecnologia Vegetal,
orientada pelos Doutores João Filipe da Silva Martins e Jorge Manuel Pataca Leal
Canhoto e apresentada ao Departamento de Ciências da Vida da Faculdade de Ciências
e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Julho de 2022



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

“One day, in retrospect, the years of struggle will strike you as the most beautiful.”
- **Sigmund Freud**

Agradecimentos

Finda uma das etapas mais desafiantes e decisivas do meu percurso, não só académico, como também pessoal, não podia deixar de expressar os meus sinceros agradecimentos àqueles que de forma direta e indireta me acompanharam e contribuíram para que tudo isto fosse possível e realizável.

Em primeiro lugar agradeço aos meus orientadores por todo o conhecimento transmitido, por se mostrarem sempre disponíveis a esclarecer qualquer tipo de dúvida ou problema surgido, pelo apoio e incentivo.

Ao Doutor João Martins, pela ajuda e acompanhamento incansável, pela enorme paciência, motivação e sentido de humor.

Ao Professor Doutor Jorge Canhoto, por novamente me acolher tão bem no Laboratório de Biotecnologia Vegetal como sua orientanda, por todo o conhecimento que me transmitiu, pelo apoio e boa disposição demonstrada.

A todos os colegas de laboratório, por serem sempre muito prestáveis para me ajudar naqueles momentos de “aflição repentina”, em especial ao André e à Mariana por toda a paciência, pelos conselhos, pelo apoio e por me disponibilizarem material de laboratório esterilizado quando não tinha e precisava.

Foi um privilégio para mim realizar novamente estágio no Laboratório de Biotecnologia Vegetal do DCV, não só por ter adorado anteriormente estagiar aqui, como também por toda a envolvimento, saio com a certeza de que a Biotecnologia Vegetal é uma área que me fascina imenso e que pretendo seguir.

Às novas amizades académicas que este metrado me proporcionou, especialmente à Louisa por ser a minha metade divertida, por estar sempre pronta para aturar os meus dramas, seja a que horas for, por me mostrar que existe um lado positivo quando as coisas nem sempre correm como é esperado, e por todas as incríveis aventuras que partilhámos nestes dois anos de metrado. À Beatriz por ser a minha energia positiva, por toda a ajuda e motivação, pelas longas conversas, por partilhar o meu lema: “a vida é uma espera”.

Aos colegas das algas, pelo apoio, motivação e boa disposição partilhada.

Aos meus amigos de sempre e aos que são “para” sempre, aqueles que desfrutam da vida a par comigo, com muita partilha de aventuras e conquistas, que me apoiam, que me fazem perceber que a idade é tão somente um número, que os sonhos não têm limite, e que expressam orgulho pelos meus feitos.

Por último, mas não menos importante, expresso enorme gratidão às pessoas que ocupam um lugar decisivo na minha vida, aquelas que me apoiam incondicionalmente em todas as minhas decisões, que nunca me deixam desistir de nada e me incentivam a embarcar em novos desafios apoiando-me sempre sem olhar a custos, os meus pais e a minha avó, sem eles não seria o que sou hoje. Também agradeço ao meu cão por ouvir os meus desabaços, por ser o meu calmante natural que me obriga a ir apanhar ar.

Ao grupo de estudantes Vilanovense, por ser o melhor grupo de jantares académicos que tive ao longo desta vida de estudante. Vão deixar muitas saudades...

A ti Coimbra, por não te querer largar, eterna cidade dos estudantes, os teus segredos levo-os comigo p’rá vida...

“De Coimbra, fica o sonho, fica a graça

Antero de revolta, capa à solta

De Coimbra, fica um tempo que não passa

Neste passar de um tempo que não volta” – Manuel Alegre

Índice

1	Introdução	1
1.1	Considerações gerais	3
1.2	Tamarilho (<i>Solanum betaceum</i> Cav.).....	4
1.2.1	Caraterização científica.....	4
1.2.2	Origem e distribuição geográfica.....	5
1.2.3	Descrição morfológica	7
1.2.4	Importância económica	9
1.3	Propagação e cultura <i>in vitro</i>	10
1.4	Microbioma.....	11
1.4.1	Origem e definição.....	11
1.4.2	Interações do microbioma com a planta.....	11
1.5	Bactérias endófitas	12
1.5.1	Origem, importância e vantagens.....	12
1.6	Objetivos	14
2	Material e métodos.....	15
2.1	Material vegetal.....	17
2.2	Germinação de sementes	17
2.3	Indução de calo	18
2.4	Isolamento de bactérias endófitas	21
2.4.1	Isolamento e conservação de bactérias	22
2.5	Identificação de bactérias endófitas.....	24
2.5.1	Extração do ADN	24
2.5.2	RAPD-PCR <i>fingerprint</i>	24

2.5.3	Análise filogenética	25
2.6	Análise estatística	26
3	Resultados	29
3.1	Germinação de sementes	31
3.2	Indução de calo	34
3.3	Isolamento de bactérias endófitas	35
4	Discussão	51
4.1	Germinação de sementes	53
4.2	Indução de calo	54
4.3	Identificação de bactérias endófitas.....	55
5	Conclusões e perspectivas futuras.....	59
6	Referências.....	63

Índice de figuras

Figura 1 - Distribuição geográfica de <i>S. betaceum</i> . Encontram-se destacados os países de origem, onde foi introduzido e o principal produtor e exportador.	6
Figura 2 - <i>Solanum betaceum</i> Cav. (A) Árvore adulta de tamarilho com frutos maduros; (B) Flores em diferentes estados de desenvolvimento; (C) Interior de um fruto maduro, com a polpa e as sementes visíveis.	8
Figura 3 - Frutos de tamarilho de três genótipos existentes no Jardim Botânico da Universidade de Coimbra. (C1) Tamarilho vermelho. (C5) Tamarilho amarelo. (C6) Tamarilho laranja.	9
Figura 4 - Exemplos de aplicações do tamarilho. (A) Compota (Casa de Encosturas, 2017). (B) Sumo. (C) Licor premiado com medalha de ouro em 2017 (Casa de Encosturas, 2017). (D) Salada de tamarilho.	10
Figura 5 - Representação das funções dos microrganismos do microbioma (Bazenga, 2021).	12
Figura 6 - Vias de entrada das bactérias endófitas (Singh et al., 2017).	13
Figura 7 - Esquema resumo da inoculação de segmentos de medula em diferentes condições de cultura. Controlo: meio MS com 3 % sacarose. Meio MS com 3 % sacarose + 2,4-D [2,0 mg L ⁻¹]. Meio MS com 3 % sacarose + 2,4-D [5,0 mg L ⁻¹].	19
Figura 8 - Esquema resumo da germinação de sementes e da indução de calo.	20
Figura 9 - Esquema resumo do isolamento de endófitas de tamarilho.	23
Figura 10 - Esquema resumo da identificação de bactérias endófitas de tamarilho.	27
Figura 11 - Sementes inoculadas em caixas de cultura contendo meio MS. A - Tamarilho vermelho (C1), B - tamarilho laranja (C6) e C - tamarilho amarelo (C5). Todas as culturas foram incubadas durante 60 dias no escuro, a 25 °C.	31
Figura 12 - Sementes inoculadas em caixas de cultura contendo meio MS. A - Tamarilho vermelho (C1), B - tamarilho laranja (C6) e C - tamarilho amarelo (C5). Culturas com oito dias de incubação na câmara de crescimento a 25 °C, com fotoperíodo de 16h de luz.	32

Figura 13 - Sementes inoculadas em caixas de cultura contendo meio MS. A - Tamarilho vermelho (C1), B - tamarilho laranja (C6) e C - tamarilho amarelo (C5). Todas as culturas foram incubadas durante 30 dias na câmara de crescimento a 25 °C, com fotoperíodo de 16h de luz.	32
Figura 14 - Taxa de germinação de sementes (%) de tamarilho vermelho, tamarilho amarelo e tamarilho laranja sob condições de cultura com ausência e presença de luz. Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão (N=50). Letras diferentes representam valores estatisticamente distintos pelo teste de Tukey (p < 0.05).	33
Figura 15 - Indução calo em segmentos de medula de tamarilho vermelho (C1), tamarilho amarelo (C5) e tamarilho laranja (C6) em diferentes condições de cultura. Controle: meio MS com 3 % sacarose. Meio MS com 3 % sacarose + 2,4-D [2,0 mg L ⁻¹]. Meio MS com 3 % sacarose + 2,4-D [5,0 mg L ⁻¹].	34
Figura 16 - Taxa de indução de calo (%) de tamarilho vermelho, tamarilho amarelo e tamarilho laranja em diferentes condições de cultura. Meio MS com 3 % sacarose + 2,4-D [2,0 mg L ⁻¹]. Meio MS com 3 % sacarose + 2,4-D [5,0 mg L ⁻¹] Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão (N=9). Letras diferentes representa valores estatisticamente distintos pelo teste de Tukey (p < 0.05).	35
Figura 17 - Número de isolados de bactérias obtidos do córtex, folhas e medula de tamarilho vermelho, tamarilho laranja e tamarilho amarelo.	36
Figura 18 - Número de isolados de bactérias obtidos em cada meio de cultura: ABM2, LB e R2A de tamarilho vermelho, tamarilho laranja e tamarilho amarelo.	37
Figura 19 - Número de isolados de bactérias obtidos em diferentes pH: 5,5, 7, 8,5 de tamarilho vermelho, tamarilho laranja e tamarilho amarelo.	38
Figura 20 - Número de isolados de bactérias nas diferentes diluições (mL): Solução Mãe, 10 ⁻¹ , 10 ⁻² e 10 ⁻³ de tamarilho vermelho, tamarilho laranja e tamarilho amarelo.	38
Figura 21 - Número de isolados de bactérias obtidos nas duas temperaturas (°C): 20 °C e 30 °C de tamarilho vermelho, tamarilho laranja e tamarilho amarelo.	39
Figura 22 – Número de isolados de bactérias extraídos de cada árvore de tamarilho: (C1) Tamarilho Vermelho, (C5) Tamarilho Amarelo e (C6) Tamarilho Laranja.	39

Figura 23 - Número de isolados de bactérias obtidos em cada meio de cultura: ABM2 e LB de plântulas obtidas por germinação de sementes de frutos de tamarilho vermelho, tamarilho laranja e tamarilho amarelo.	40
Figura 24 - Número de isolados de bactérias em pH: 7 e 8,5 de plântulas obtidas por germinação de sementes de frutos de tamarilho vermelho, tamarilho laranja e tamarilho amarelo.....	41
Figura 25 - Número de isolados de bactérias nas diferentes diluições (mL): Solução Mãe, 10^{-1} , de plântulas obtidas por germinação de sementes de frutos de tamarilho vermelho, tamarilho laranja e tamarilho amarelo.	41
Figura 26 - Número de isolados de bactérias extraídos de cada árvore de tamarilho: (C1) Tamarilho Vermelho, (C6) Tamarilho Laranja e (C5) Tamarilho Amarelo.....	42
Figura 27 - Colônias bacterianas obtidas a partir de material de tamarilho. A e B a partir de material vegetal <i>in vivo</i> ; C e D a partir de material vegetal <i>in vitro</i>	42
Figura 28 - Colônias bacterianas obtidas a partir de material de tamarilho. A e B a partir de material vegetal <i>in vivo</i> ; C e D a partir de material vegetal <i>in vitro</i>	43
Figura 29 - Exemplos de Perfis RAPD, agrupados (Perfil 34 e 37) e únicos (Perfil 35, 36, 38 e 39).....	43
Figura 30 - Número de isolados, perfis RAPD dos isolados bacterianos endofitos de material vegetal de tamarilho <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	44
Figura 31 - Árvore filogenética obtida do género <i>Arthrobacter</i> , baseada na sequência parcial tratada e alinhada do gene 16S rRNA usando o modelo Jukes-Cantor (=JC)....	48
Figura 32 - Árvore filogenética obtida do género <i>Frigoribacterium</i> , baseada na sequência parcial tratada e alinhada do gene 16S rRNA usando o modelo Jukes-Cantor (=JC)....	49
Figura 33 - Árvore filogenética obtida do género <i>Microbacterium</i> , baseada na sequência parcial tratada e alinhada do gene 16S rRNA usando o modelo Jukes-Cantor e gama-distribuído (+G) (=JC + G).....	50

Índice de tabela

Tabela 1 – Identificação preliminar dos géneros dos isolados de bactérias endófitas, obtida por similaridade com as sequências das bases de dados NCBI e EzBioCloud. ...	45
---	----

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

2,4-D: Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	mg: Miligramas
°C: Graus Celsius	min: Minutos
ABM2: Meio tamponado alcalino 2	mL: Mililitros
ADN: Ácido desoxirribonucleico	mM: Milimolar
C1: Tamarilho vermelho	MS: Meio de Murashige e Skoog (1962)
C5: Tamarilho amarelo	NaOH: Hidróxido de sódio
C6: Tamarilho laranja	ng: Nanogramas
cm: Centímetros	pb: Pares de bases
dp: Desvio Padrão	PBS: Tampão Fosfato Salino
Fig.: Figura	p/v: Peso por volume
g: Gramas	R2A: Reasoner's Agar 2A
h: Horas	rpm: rotações por minuto
HCl: Ácido clorídrico	s: Segundos
H ₂ O: Água	SM: Solução stock
KOH: Hidróxido de Potássio	V: Volt
L: Litros	v/v: Volume por Volume
LB: Lysogeny broth	µL: Microlitros
M: Molar	µmol: Micromoles
m: Metros	[100×]: Cem vezes concentrado
	[10×]: Dez vezes concentrado

Resumo

Solanum betaceum Cav. é vulgarmente conhecida como tamarilho, “tree tomato”, ou “tomate de la Paz”, sendo uma pequena árvore pertencente à família Solanaceae, nativa das regiões andinas da Argentina e Bolívia. Produz frutos comestíveis com interesse económico devido às suas propriedades nutricionais. O tamarilho tem sido amplamente estudado do ponto de vista taxonómico e sistemático. No entanto, poucos estudos foram realizados no que diz respeito aos microrganismos que com ele interagem.

O microbioma consiste na população total de microrganismos associada a uma determinada espécie e nas suas interações. Estes microrganismos podem subdividir-se entre os que têm preponderantemente funções associadas à nutrição das plantas, à sua proteção e à bioestimulação. As bactérias endófitas são um exemplo destes microrganismos, vivem dentro de uma planta durante um tempo da sua vida, sem causar danos aparentes ao hospedeiro. Do ponto de vista biotecnológico, estudar um microbioma vegetal pode ser uma ferramenta útil para melhorar o setor agrícola, uma vez que estas bactérias podem conferir vantagens às plantas hospedeiras, promovendo o crescimento, produzindo fito-hormonas, sideróforos e aumentando a resistência a patógenos. Deste modo, adquirir conhecimento sobre espécies bacterianas que estabelecem uma relação simbiótica com as plantas, é o primeiro passo para atingir maiores rendimentos, quando se trata de biotecnologia vegetal.

Este projeto teve como objetivo isolar e identificar bactérias endófitas de material vegetal *in vivo* e *in vitro* de três árvores de tamarilho (vermelho, amarelo e laranja) presentes no Jardim Botânico da Universidade de Coimbra. Como material vegetal *in vivo* foram utilizadas folhas, córtex e a medula de segmentos do caule. A medula foi utilizada para a indução de calo, e posterior isolamento de bactérias endófitas. As sementes isoladas dos frutos colhidos das três árvores foram também utilizadas para a obtenção de plântulas de tamarilho germinadas *in vitro*, e das quais se procedeu ao isolamento de bactérias endófitas

A extração das bactérias endófitas ocorreu por maceração do material vegetal com tampão PBS. O filtrado foi inoculado em meio ABM2, R2A e LB, com pH 5,5, 7,0, e 8,5, as bactérias cultivadas a 20 °C e 30 °C. 231 isolados de bactérias foram obtidos, 214 provenientes de material *in vivo* e 17 de material *in vitro*. As melhores condições de isolamento foram obtidas no meio ABM2 com pH 7, sem diluição, as duas temperaturas testadas apresentaram resultados semelhantes.

91 isolados foram submetidos à técnica RAPD-PCR *fingerprint* para avaliar a sua diversidade genética. Os perfis RAPD dos isolados foram agrupados em 71 clusters. Os isolados referentes aos perfis obtidos foram purificados e sequenciados para obter uma sequência parcial do gene 16S rRNA. Após uma pesquisa na base de dados EzBioCloud os isolados selecionados foram identificados como pertencendo a 22 géneros: *Acerihabitans*, *Aquimarina*, *Arenivirga*, *Arthrobacter*, *Aureimonas*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Brevundimonas*, *Cellulomonas*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Frigoribacterium*, *Kineococcus*, *Kocuria*, *Marmoricola*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Paracoccus*, *Rhizobium*, *Staphylococcus*, *Sphingobacterium*, *Serinibacter*.

Futuramente é relevante continuar o estudo do microbioma do tamarilho, não só para se obter uma identificação completa dos isolados obtidos, mas também para realizar testes bioquímicos de modo a perceber as interações destas bactérias endófitas com o metabolismo da planta.

Palavras-chave: bactérias endófitas; genótipos; *in vivo*; *in vitro*; microbioma; RAPD-PCR *fingerprint*; tamarilho; 16S rRNA

Abstract

Solanum betaceum Cav., commonly known as tamarillo, “tree tomato”, or “tomate de la Paz”, is a small tree belonging to the Solanaceae family, and native to the Andean regions of Argentina and Bolivia. It produces edible fruits of economic interest due to their nutritional properties. Tamarillo has been extensively studied from a taxonomic and perspective, however, few studies have been carried out with regard to the microorganisms that are related to it.

The microbiome consists of the total population of microorganisms associated with plant and their interactions between them. These microorganisms can be subdivided into those that have predominantly functions associated with plant nutrition, plant protection and biostimulation. Endophytic bacteria are an example of these microorganisms. They live inside a plant for a period or during all its life without causing apparent harm. From a biotechnological point of view, studying a plant microbiome can be a useful tool to improve the agricultural sector, since these bacteria can confer advantages on host plants, promoting growth, producing phytohormones, siderophores and increasing resistance to pathogens. Thus, acquiring knowledge about bacterial species that establish a symbiotic relationship with plants is the first step towards achieving higher yields when it comes to plant biotechnology.

This project aimed to isolate and identify endophytic bacteria from plant material in vivo and in vitro from three tamarillo trees (red, yellow and orange) growing in the Botanical Garden of the University of Coimbra. As plant material in vivo, leaves, cortex and pith of stem segments were used. The pith was used for callus induction, and later isolation of endophytic bacteria. The seeds isolated from the fruits harvested from the three trees were also used to obtain in vitro germinated tamarillo seedlings, from which endophytic bacteria were isolated.

The extraction of endophytic bacteria occurred by macerating the plant material with PBS buffer. The filtrate was inoculated in ABM2, R2A and LB medium, with pH 5.5, 7.0, and 8.5, the bacteria cultivated at 20 °C and 30 °C. 231 bacterial isolates were obtained, 214 from in vivo material and 17 from in vitro material. The best isolation

conditions were obtained in ABM2 medium with pH 7, without dilution, the two temperatures tested showed similar results.

91 isolates were submitted to the RAPD-PCR fingerprint technique to assess their genetic diversity. The RAPD profiles of the isolates were grouped into 71 clusters. The isolates referring to the profiles obtained were purified and sequenced to obtain a partial sequence of the 16S rRNA gene. After a search in the EzBioCloud database, the selected isolates were identified as belonging to 22 genera: *Acerihabitans*, *Aquimarina*, *Arenivirga*, *Arthrobacter*, *Aureimonas*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Brevundimonas*, *Cellulomonas*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Frigoribacterium*, *Kineococcus*, *Kocuria*, *Marmoricola*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Paracoccus*, *Rhizobium*, *Staphylococcus*, *Sphingobacterium*, *Serinibacter*.

In the future, it is relevant to continue the study of the tamarillo microbiome, not only to obtain a complete identification of the isolates obtained, but also to carry out biochemical tests in order to understand how the interactions of these endophytic bacteria with the plant affect plant development and different metabolic pathways.

Keywords: bacterial endophytes; genotype, *in vivo*; *in vitro*; microbiome; RAPD-PCR fingerprint; tamarillo; 16S rRNA

1 Introdução



INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

A biodiversidade do planeta está ameaçada e o principal culpado é aquele que, paradoxalmente mais depende dela, o ser humano. A biodiversidade, em qualquer região, cria ecossistemas constituídos por mais ou menos espécies que, coletivamente, influenciam a evolução de ecossistemas individuais e, da própria biodiversidade global (Benton *et al.*, 2021). Embora a mudança climática tenha sido um processo constante na terra, nos últimos tempos, aproximadamente nos últimos 100 anos, o ritmo dessa variação aumentou consideravelmente, de maneira a fazer perigar a sobrevivência de muitas espécies, a humana incluída (Arora, 2019).

De um modo geral, o impacto das mudanças climáticas é muito abrangente, mas os seus efeitos a longo prazo são agora claramente visíveis no setor agrícola, que depende da produção de alimentos e da economia do mundo. Os sistemas de produção de alimentos requerem uma gama diversificada de plantas, animais, bactérias e fungos, tanto para o funcionamento direto de alimentos como para a manutenção do equilíbrio dos agro-ecossistemas subjacentes que tornam a agricultura possível, desde o abastecimento de água até ao aumento da fertilidade do solo, polinização e controlo natural de pragas (Benton *et al.*, 2021).

A produção agrícola nos últimos 60 anos mais do que triplicou, em grande parte devido ao aparecimento de tecnologias que potenciaram o aumento da produtividade e levaram a uma maior utilização de terrenos, água e outros recursos naturais para fins agrícolas (Portugal Foods, 2019). No entanto, apesar deste aumento da produtividade, segundo o último relatório sobre a segurança alimentar global (The State of Food Security and Nutrition in the World - SOFI), quase um décimo da população mundial passou fome em 2020, tendo este aumento sido agravado com a situação pandémica causada pela COVID-19 (UNICEF, 2021). A guerra atualmente em curso na europa, terá também um forte impacto negativo na segurança alimentar global. O setor terá ainda de enfrentar um crescimento mais elevado da procura, devido ao aumento populacional esperado até 2050 (Portugal Foods, 2019), estimando-se que a população mundial chegue aos 9,7 mil milhões de habitantes (De Wrachien *et al.*, 2021). Desta forma, a produção do setor agroalimentar terá que acompanhar este crescimento, de modo a

INTRODUÇÃO

criar métodos avançados e eficientes para aumentar a produção de alimentos e energia renovável sem, contudo, esgotar os recursos naturais (Vargas *et al.*, 2018).

A biotecnologia é um instrumento de grande importância no combate à fome, que pode ajudar não só a promover mais produtividade na obtenção de alimentos, mas também a utilização sustentável dos recursos agrícolas, pecuários, florestais e pesqueiros. A Biotecnologia Vegetal, pelo seu potencial de utilização e otimização dos recursos vegetais, é crucial para o aumento da produção agrícola mundial. O aperfeiçoamento destas novas tecnologias, e a sua aplicação ao desenvolvimento de sistemas de propagação de plantas, apresenta-se como uma área com inúmeras potencialidades e possibilidades de exploração científica e socioeconómica (Canhoto, 2010).

É neste contexto que o Laboratório de Biotecnologia Vegetal do Centro de Ecologia Funcional da Universidade de Coimbra tem vindo a desenvolver projetos no âmbito do melhoramento de plantas de algumas espécies, com particular destaque no tamarilho, no sentido de afirmar a produção e o consumo deste fruto exótico em Portugal. O estudo que agora se apresenta é mais uma contribuição nesse sentido, tendo como principal aspeto inovador a caracterização preliminar do microbioma de tamarilho.

1.2 Tamarilho (*Solanum betaceum* Cav.)

1.2.1 Caracterização científica

Solanum betaceum Cav. (syn. *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.) é vulgarmente conhecida como tamarilho, tree tomato ou “tomate de la paz” (Correia *et al.*, 2011). Esta espécie foi inicialmente denominada por *Solanum betaceum* pelo botânico espanhol Cavanilles (Ramírez and Kallarackal, 2019) em 1801 e posteriormente integrada no género *Cyphomandra* por Sendtner, em 1845 (Guimarães *et al.*, 1996). No entanto, em 1995, o género mudou novamente para *Solanum*, após imensos trabalhos

morfológicos, taxonômicos, filogenéticos e etnobotânicos realizados por Bohs e seus colegas de trabalho (Acosta-Quezada *et al.*, 2011).

A designação tamarilho surgiu em 1967, na Nova Zelândia, após um rápido aumento da produção e consumo deste fruto, o que levou à necessidade de um nome comercialmente apelativo, que permitisse a distinção entre este e o tomate vulgar (*Solanum lycopersicum*), pertencente à mesma família (Correia and Canhoto, 2012).

Taxonomicamente, o tamarilho pertence à família Solanaceae sendo esta uma das famílias de plantas mais importantes economicamente, pois fornecem à humanidade plantas de cultivo familiares como a batateira (*Solanum tuberosum*), o tomateiro (*Solanum lycopersicum*), os pimenteiros (*Capsicum* sp.), a beringela (*Solanum melongena*) e o tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Bohs, 1989; Wang and Zhu, 2020). Além disso, muitos medicamentos têm por base a utilização de solanáceas, podendo referir-se como exemplo, os medicamentos à base de atropina (Al, 2014).

1.2.2 Origem e distribuição geográfica

A origem exata do tamarilho é desconhecida, mas pode ser encontrado nas regiões andinas da Argentina e Bolívia (Schotsmans *et al.*, 2011) o que parece indicar que pode ser originário numa destas áreas. Da América do Sul espalhou-se para a América Central e Sudeste Asiático (Índia, Malásia, Tailândia, Indonésia e Vietnam), e mais tarde para as ilhas portuguesas dos Açores e Madeira e para o sul da Europa (Itália, Alemanha, Espanha, França e Holanda), assim como também para África (África do Sul, Uganda e Ruanda) (Canhoto *et al.*, 2005; Diep *et al.*, 2020) (Fig. 1).

No final do século XIX, chegou à Austrália e à Nova Zelândia (Correia and Canhoto, 2012). Este último país é hoje, juntamente com a Colômbia, um dos principais países produtor e exportador de tamarilho e também é o principal local onde se desenvolveram vários novos cultivares (Correia and Canhoto, 2012). Atualmente apenas três países, Austrália, Colômbia e Nova Zelândia, cultivam tamarilho com objetivos de exportação (Diep *et al.*, 2020).

INTRODUÇÃO

O tamarilho é uma cultura bastante adaptável que não requer condições muito exigentes. Todavia, existem algumas limitações ao seu cultivo impostas principalmente pelo vento forte; pela temperatura, não suporta temperaturas muito baixas apresentando baixa tolerância a geadas, o mesmo acontece com temperaturas muito elevadas que lhe causam alguma sensibilidade; e pelas condições do solo, pois não tolera solos inundados devido ao seu sistema radicular superficial (Guimarães *et al.*, 1996; Feicán *et al.*, 2016). Desta forma, são caracterizadas como regiões ideais de cultivo de tamarilho aquelas com temperaturas entre 18 e 22 °C, precipitações anuais de 600 a 800 mm e altitudes entre 1500 e 3000 metros (Bohs, 1989; Feicán *et al.*, 2016).



Figura 1 - Distribuição geográfica de *S. betaceum*. Encontram-se destacados os países de origem, onde foi introduzido e o principal produtor e exportador.

1.2.3 Descrição morfológica

Em termos botânicos, o tamarilho é uma pequena árvore ou arbusto perene (Fig. 2A), de crescimento de rápido e com raízes superficiais, que pode atingir alturas de 2 a 4 metros (Canhoto *et al.*, 2005; Ramírez and Kallarackal, 2019). As árvores começam a produzir dentro de 12 a 18 meses após plantio, atingindo o pico de produção em 3 a 4 anos (Acosta-Quezada *et al.*, 2015). As folhas apresentam cor verde, são grandes, ligeiramente pubescentes em ambos os lados, alternas, pontiagudas no ápice e possuem um formato oval (Morton, 1987; Bohs, 1989).

As flores são perfumadas, apresentam cor branca, rosa ou lavanda e estão agrupadas em inflorescências (Fig. 2B). Nas nossas condições climáticas, a floração ocorre entre os meses de maio e junho (Correia *et al.*, 2009; Mavi and Uzunoğlu, 2020), por alo ou autopolinização. No primeiro caso vetores abióticos como o vento ou vetores bióticos como os insetos polinizadores para transferir o pólen (Schotsmans *et al.*, 2011) são necessários. No entanto, a reduzida diversidade genética encontrada em populações naturais parece indicar que a autopolinização desempenha um papel crucial (Pringle and Murray, 1991; Lewis and Considine, 1999). Os frutos são bagas com formato oval, de exocarpo liso e com ápices pontiagudos, surgindo geralmente em grupos de 3 a 12 (Fig. 2C) (Correia and Canhoto, 2012). O seu desenvolvimento leva entre 21 a 26 semanas, mas como a floração é contínua, os frutos também são formados durante todo o ano atingindo o pico no final do outono e inverno (Schotsmans *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2021). Podem encontrar-se entre 150 a 300 sementes por fruto (Mavi and Uzunoğlu, 2020), estas são planas e redondas, podem ser consumidas, mas são maiores e mais duras do que as do tomate (Correia and Canhoto, 2012).

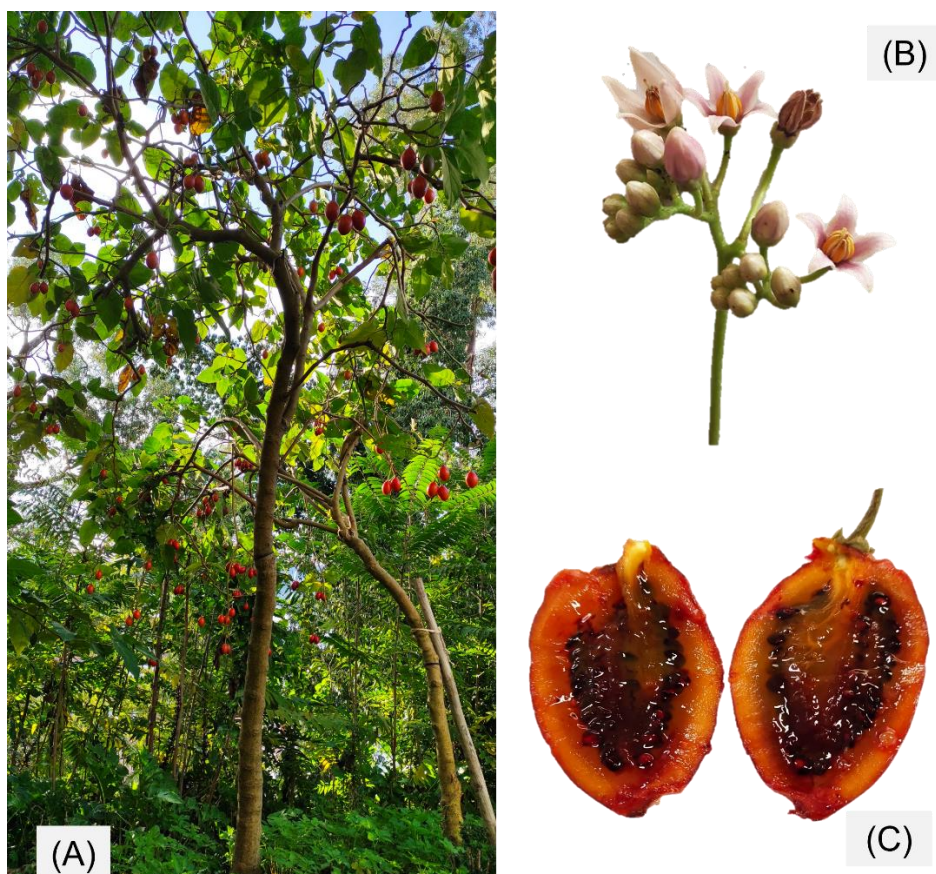


Figura 2 - *Solanum betaceum* Cav. (A) Árvore adulta de tamarilho com frutos maduros; (B) Flores em diferentes estados de desenvolvimento; (C) Interior de um fruto maduro, com a polpa e as sementes visíveis.

Existem várias cultivares de tamarilho que podem ser classificadas de acordo com a cor dos frutos vermelha, amarela ou alaranjada (Fig. 3), dependendo dos pigmentos que se acumulam na polpa e no epicarpo que apresenta uma consistência espessa, rígida e sabor desagradável. Por sua vez, o mesocarpo, é parecido com o do tomate. A polpa (endocarpo) é sumarenta, macia, com um sabor agridoce consistente e succulenta (Correia *et al.*, 2009; Correia and Canhoto, 2011). Os frutos das cultivares vermelhas são os mais apreciados devido ao seu sabor mais agradável, ou seja, menos adstringente e amargo (Chen *et al.*, 2021).



Figura 3 - Frutos de tamarilho de três genótipos existentes no Jardim Botânico da Universidade de Coimbra. (C1) Tamarilho vermelho. (C5) Tamarilho amarelo. (C6) Tamarilho laranja.

1.2.4 Importância económica

O tamarilho é frequentemente consumido fresco, mas pode ser processado em geleia, compota, iogurte, gelado, sumo e até em licores (Fig. 4). Caracteriza-se pela sua riqueza nutricional nomeadamente pelo seu elevado teor em fibras, vitaminas A, B6, C e E, minerais particularmente potássio, antocianinas e compostos fenólicos, que conferem a elevada atividade antioxidante deste fruto (Murillo-Gómez *et al.*, 2017; Diep *et al.*, 2020). Apresenta baixo teor em hidratos de carbono exibindo um défice calórico inferior a 40 kcal. Devido ao seu alto teor de antioxidantes, pode ter propriedades desejáveis para combater doenças vasculares, cancro, trazer outros benefícios para a saúde do fígado, amígdalas, dor de garganta, prevenir doenças respiratórias e anemia (Sinaga *et al.*, 2018; Diep *et al.*, 2020).

Em Portugal a planta é normalmente cultivada como ornamental de exterior, embora tenham sido feitas algumas tentativas de exploração comercial desta espécie devido aos elevados preços (10 - 15 euros/Kg) alcançados pelos seus frutos nos mercados (Correia *et al.*, 2009).

Desta forma, sendo esta espécie economicamente muito interessante e com potencial para se tornar um sucesso comercial no nosso país, torna-se importante otimizar a produção desta espécie fruteira, tanto em termos quantitativos como qualitativos.

INTRODUÇÃO



Figura 4 - Exemplos de aplicações do tamarilho. (A) Compota (Casa de Encosturas, 2017). (B) Sumo. (C) Licor premiado com medalha de ouro em 2017 (Casa de Encosturas, 2017). (D) Salada de tamarilho.

1.3 Propagação e cultura *in vitro*

O tamarilho pode ser cultivado usando diferentes técnicas, sejam elas convencionais como a sementeira, estacaria ou enxertia, ou por processos biotecnológicos de propagação e cultura *in vitro*, que têm vindo a ser estudados e aplicados ao melhoramento de tamarilho. Uma destas técnicas de estabelecimento da cultura é a propagação por via seminal (Correia and Canhoto, 2012). Devido à facilidade de germinação das sementes torna-se fácil a obtenção de plantas de tamarilho provenientes da germinação de sementes, sendo este um dos métodos mais utilizado na sua propagação.

1.4 Microbioma

1.4.1 Origem e definição

O conceito de microbioma foi introduzido após as descobertas de Joshua Lederberg, premiado com o Nobel em 1958, que utilizou o termo para descrever um sistema de microrganismos comensais, simbióticos e eventualmente patogênicos que residem no corpo humano (Liu *et al.*, 2020). Na atualidade, o termo microbioma é utilizado para se referir uma coleção de genomas dos microrganismos que vivem num nicho específico, e o grupo de microrganismos em si mesmos, tal como bactérias, fungos, Archaea é designado por microbiota. Em termos gerais, os microrganismos do microbioma podem subdividir-se entre os que têm preponderantemente funções associadas à nutrição das plantas, proteção e bioestimulação (Bazenga, 2021). O microbioma vegetal consiste na população microbiana total associada e nas interações que estabelece com uma determinada espécie.

1.4.2 Interações do microbioma com a planta

Milhões de anos de evolução levaram as plantas a desenvolver uma gama diversificada de mecanismos para lidar com stresses bióticos e abióticos. Estabelecer um relacionamento contínuo com as bactérias, evidentemente, aumentou a capacidade de as plantas lidarem com estes stresses, facilitando também a sua adaptação a condições ambientais que vão não apenas variando ao longo do ano, mas também durante o ciclo de vida de uma planta ou a evolução de uma espécie (Liu *et al.*, 2017). As bactérias podem viver tanto externamente como internamente na planta hospedeira. As que vivem fora das plantas hospedeiras são designadas por epífitas, vivem nas superfícies das folhas das plantas, ou rizosféricas, aquelas que se hospedam nas raízes das plantas no solo. Por sua vez, as bactérias que vivem e prosperam dentro da planta hospedeira são chamadas de bactérias endófitas (Afzal *et al.*, 2019).

INTRODUÇÃO

Do ponto de vista dos microrganismos, a figura 5 mostra que eles se podem agrupar em patogênicos, os que têm potencial de indução de doenças nas plantas; as micorrizas, fungos com funções específicas de extensão do sistema radicular das plantas que facilitam a nutrição vegetal a partir do solo; os benéficos, que promovem a disponibilidade dos nutrientes necessários e os saprófitas.

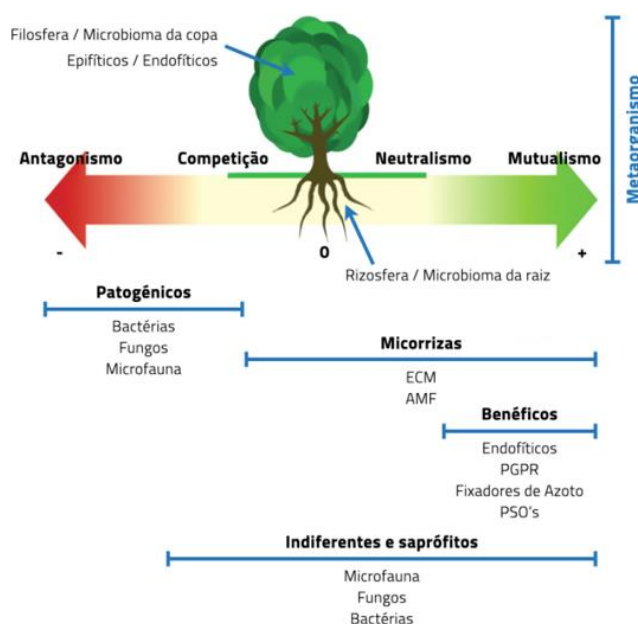


Figura 5 - Representação das funções dos microrganismos do microbioma (Bazenga, 2021).

1.5 Bactérias endófitas

1.5.1 Origem, importância e vantagens

O termo “endófitos” foi utilizado pela primeira vez por De Bary em 1866 (Basumatary *et al.*, 2021) referindo-se a bactérias que vivem dentro de uma planta durante um tempo da sua vida, sem causar danos aparentes no hospedeiro. Estas bactérias podem ser isoladas de tecidos vegetais após uma desinfecção superficial

(Ferreira *et al.*, 2008). Embora as bactérias endófitas ocupem principalmente os espaços intercelulares, devido à abundância de hidratos de carbono, aminoácidos e outros nutrientes, algumas também são capazes de realizar a colonização intracelular (Pinski *et al.*, 2019). Vários estudos mostraram que as bactérias endófitas podem, após a colonização da rizosfera, ser detetadas no interior da endorriza, em caules, folhas, bem como no interior de órgãos reprodutivos de diferentes plantas hospedeiras (Fig. 6).

A diminuição dos custos de sequenciação permitiu uma análise aprofundada da composição e dinâmica do microbioma associado ao hospedeiro (Rodriguez *et al.*, 2019). Há inúmeras pesquisas realizadas em interações entre plantas e o microbioma, que tradicionalmente se concentram nas interações patogênicas, no entanto, após várias descrições e tentativas de avaliar a ocorrência e o papel da diversidade microbiana associada às plantas, apenas uma pequena fração dos microrganismos que interagem com as plantas são patogênicos (Andreote *et al.*, 2014).

Do ponto de vista biotecnológico, estudar um microbioma vegetal pode ser uma ferramenta útil para melhorar o setor agrícola, uma vez que estas bactérias podem conferir vantagens às plantas hospedeiras, promovendo o crescimento, produzindo fito-hormonas, sideróforos e aumentando a resistência a patógenos (Nawangsih *et al.*, 2011). Assim, adquirir conhecimentos sobre estirpes bacterianas que estabelecem uma relação simbiótica com as plantas, é o primeiro passo para atingir maiores rendimentos, quando se trata de biotecnologia vegetal (Yang *et al.*, 2017; Toju *et al.*, 2019).

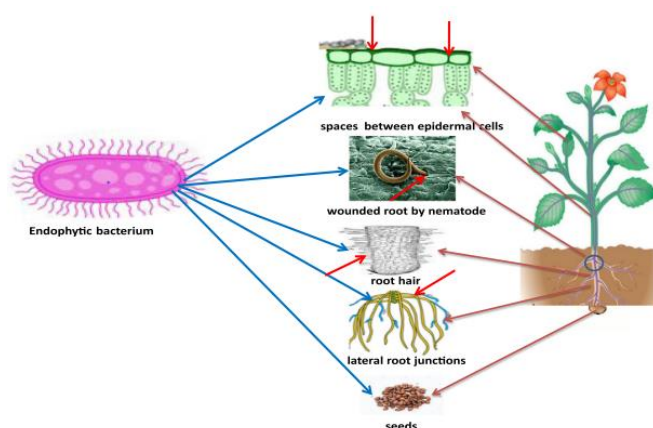


Figura 6 - Vias de entrada das bactérias endófitas (Singh *et al.*, 2017).

1.6 Objetivos

O tamarilho tem sido amplamente estudado do ponto de vista taxonómico e sistemático. No entanto, poucos estudos foram realizados no que diz respeito à avaliação da diversidade biológica de microrganismos que com esta espécie interatuam. É neste sentido que os objetivos deste projeto se focam no microbioma do tamarilho, mais propriamente nas bactérias endófitas. Neste contexto, o principal objetivo deste projeto visa identificar bactérias endófitas presentes em material vegetal de tamarilho *in vitro* e *in vivo* dos três genótipos existentes no Jardim Botânico da Universidade de Coimbra. Para concretizar este objetivo, foram definidos ensaios experimentais com o objetivo de isolar bactérias a partir de diferentes proveniências como folhas e segmentos de caule. Foi também feito o isolamento a partir de material *in vitro*, em condições assépticas, resultante de plântulas obtidas por germinação de sementes de frutos maduros de tamarilho vermelho, laranja e amarelo. Tentou-se igualmente o isolamento a partir de calo obtido *in vitro* pela cultura de segmentos caulinares. Após a extração procede-se ao isolamento de colónias bacterianas obtidas e à identificação através da técnica RAPD-PCR *fingerprint*. Esta técnica foi usada para selecionar os isolados bacterianos com padrões diferentes correspondentes a diferentes tamanhos específicos para cada estirpe.

Por fim, para obter uma identificação completa das bactérias isoladas, recorre-se ao gene 16S rRNA para estudar a filogenética e taxonomia bacteriana. Este tem sido de longe o marcador genético mais comum usado por várias razões: está presente em todas as bactérias; a sua função permaneceu constante ao longo do tempo; com 1500pb este gene é grande o suficiente para fins de informática e continua a ser uma ferramenta útil para identificação bacteriana (Patel, 2001; Srinivasan *et al.*, 2015).

2 Material e métodos



MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Para realizar este trabalho de acordo com os objetivos delineados, foi utilizado material vegetal de tamarilho proveniente de árvores localizadas no Jardim Botânico da Universidade de Coimbra, nomeadamente folhas, ramos e frutos de três árvores: C1 (frutos vermelhos), C5 (frutos amarelos) e C6 (frutos laranja), expostas às mesmas condições.

As folhas e ramos foram utilizados para o isolamento de bactérias endófitas, e a medula, ou seja, o parênquima que ocupa a parte interna do cilindro central do caule, foi utilizada para a indução de calo, e posterior isolamento de bactérias endófitas.

As sementes retiradas dos frutos colhidos de três árvores foram utilizadas para a obtenção de plântulas de tamarilho germinadas *in vitro*, e das quais se procedeu ao isolamento de bactérias endófitas.

2.2 Germinação de sementes

As plântulas de tamarilho foram estabelecidas por via seminal, usando sementes de frutos maduros de árvores de tamarilho vermelho, amarelo e laranja (Fig. 7). Após a remoção das sementes e lavagens sucessivas com água destilada para remover a polpa, procedeu-se à desinfecção com etanol a 70 % (v/v) por 30 segundos, seguida de uma esterilização com hipoclorito de cálcio a 5 % (p/v) com 2-3 gotas de detergente Tween20, durante 10 minutos, sob agitação. As sementes foram lavadas posteriormente, em condições assépticas na câmara de fluxo laminar com fluxo horizontal, com água destilada autoclavada pelo menos 3 vezes. Após os procedimentos de desinfecção, as sementes foram inoculadas em caixas de cultura de plástico Microbox (O119/140+OD119/140 com filtro verde, Sac O₂, Deinze, Bélgica) contendo 10 mL de 1/4 de meio MS (Murashige and Skoog, 1962), suplementado com sacarose (1 %, p/v, Duchefa Biochemie, Haarlem, Países Baixos), com pH entre 5,6 e 5,8, ajustado com KOH (base) ou HCl (ácido), e agar como agente gelificante (0,7 %, p/v, Duchefa). Este meio foi

MATERIAL E MÉTODOS

esterilizado em autoclave durante 20 minutos à temperatura de 121 °C, e uma pressão de uma atmosfera, tal como as caixas de cultura. Foram utilizadas 50 sementes por caixa e um n=3.

As culturas foram incubadas na estufa, no escuro a 25 °C, durante 60 dias. Depois de 60 dias nestas condições foram transferidas para uma câmara de crescimento a 25 °C, com fotoperíodo de 16 horas de luz ($15\text{-}20 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), durante mais 30 dias. No final foi determinada a percentagem de germinação das sementes dos frutos das três árvores utilizadas.

2.3 Indução de calo

Para induzir calo foi usada medula com um milímetro de espessura, de segmentos de caule não lenhificados com 30 cm, de três árvores de tamarilho vermelho, amarelo e laranja. Após a recolha dos segmentos de caule procedeu-se à desinfeção e esterilização, começando por lavar muito bem os segmentos de caule com água destilada. Seguiu-se a desinfeção com etanol a 70 % (v/v) por 30 segundos e a esterilização com hipoclorito de cálcio a 5 % (p/v) com 2-3 gotas de detergente Tween20, durante 10 minutos sob agitação. Finalmente, em condições assépticas, enxaguaram-se os segmentos de caule três vezes com água destilada esterilizada. Com uma pinça e um bisturi procedeu-se à remoção do córtex e tecidos vasculares para se obter apenas segmentos com um milímetro de medula, facilmente distinguíveis pela sua cor branca. Seis segmentos medulares foram inoculadas em caixas de Petri contendo 10 mL de meio MS (Murashige and Skoog, 1962) preparado tal como descrito anteriormente mas suplementado com 3 % de sacarose. Foram testadas duas concentrações do regulador de crescimento (auxina) 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ e $5,0 \text{ mg L}^{-1}$, e um grupo controlo sem adição de 2,4-D (Fig. 7).

Foram inoculados seis segmentos de medula de cada genótipo por caixa, perfazendo um total de nove caixas para cada uma das condições de cultura. Em todas as condições, as medulas foram colocadas para indução de calo no escuro, a 25 °C,

durante 60 dias. A figura 8, resume os procedimentos experimentais utilizados na germinação de sementes e na indução de calo.

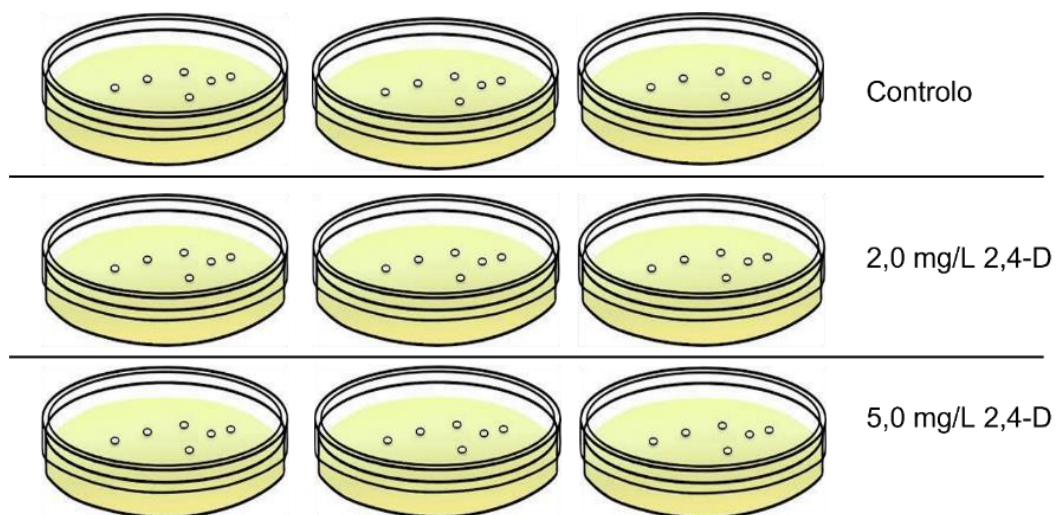


Figura 7 - Esquema resumo da inoculação de segmentos de medula em diferentes condições de cultura. Controlo: meio MS com 3 % sacarose. Meio MS com 3 % sacarose + 2,4-D [2,0 mg L⁻¹]. Meio MS com 3 % sacarose + 2,4-D [5,0 mg L⁻¹].

MATERIAL E MÉTODOS

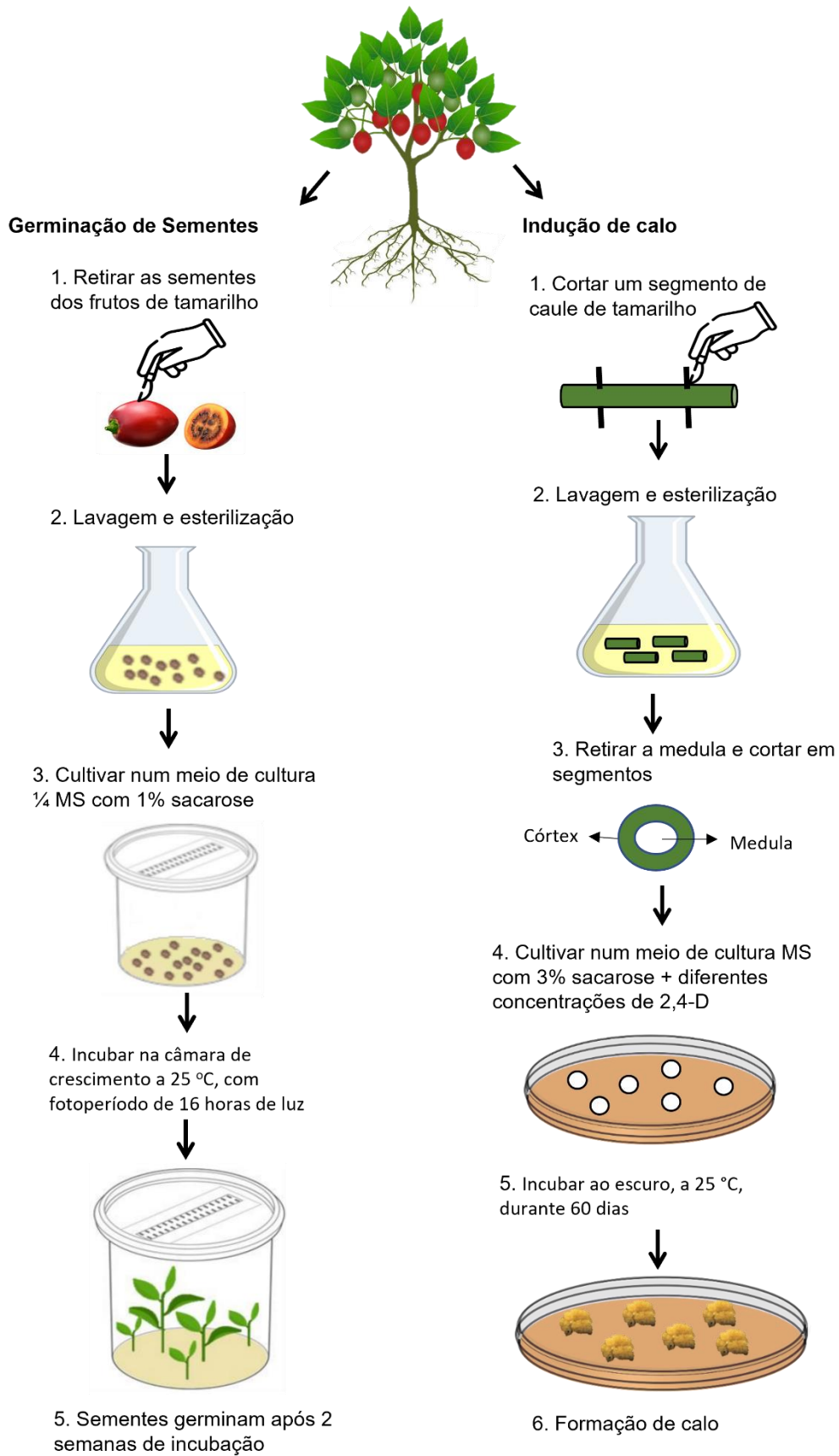


Figura 8 - Esquema resumo da germinação de sementes e da indução de calo.

2.4 Isolamento de bactérias endófitas

Neste ensaio foi usado como material vegetal *in vivo*, folhas, medula e córtex de segmentos de caule de três árvores de tamarilho dos três genótipos, e material *in vitro*: plântulas estabelecidas por via seminal e calo obtido a partir da cultura de medula (Fig. 9).

Para garantir que as bactérias isoladas eram exclusivamente endófitas, e não epífitas, a esterilização do material vegetal *in vivo* foi essencial. Por outro lado, não foi necessária a esterilização do material vegetal estabelecido *in vitro* uma vez que já se encontrava em condições de assepsia. Resumidamente, as folhas e os segmentos de caule foram cuidadosamente lavados com água destilada, desinfetados com etanol a 70 % (v/v) por 30 segundos, esterilizados com hipoclorito de cálcio a 5 % (p/v) com 2-3 gotas de detergente Tween20, durante 10 minutos sob agitação e finalmente enxaguados três vezes com água destilada estéril.

Na fase seguinte, cada material vegetal foi macerado num almofariz esterilizado com 10 mL de tampão PBS (10 mM, pH 7,2) e filtrado através de gaze esterilizada para remover os restos vegetais. Foram preparadas várias diluições (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}), adicionando 4,5 mL de tampão PBS e 500 μ L do filtrado. Por fim, 100 μ L de cada diluição foram inoculados em caixas de Petri (9 cm) contendo meio ABM2, R2A e LB com a seguinte composição para 1 L de meio: 5 g de extrato de levedura, 5 g de triptona, 1 g de sal monopotássico do ácido α -cetoglutárico, 15 g de agar, 100 ml de solução de macronutrientes [10 \times], 10 ml de solução de micronutrientes [100 \times] para o meio ABM2 (Tiago *et al.*, 2004); 0,5 g de extrato de levedura, 0,5 g de proteose de peptona, 0,5 g de caseína hidrolisada, 0,5 g de glicose, 0,5 g amido, 0,3 g fosfato dipotássico, 0,024 g sulfato de magnésio, 0,3 g piruvato de sódio, 15 g de agar para o meio R2A (Reasoner and Geldreich, 1985); 10 g de triptona, 5 g de cloreto de sódio, 5 g de extrato de levedura, 15 g de agar para o meio LB (Lennox L agar, Invitrogen). O pH dos três meios de cultura foi ajustado para 5,5, 7,0, e 8,5, com soluções de tampão Citrato, Fosfato de Sódio e Tris, respetivamente. As culturas foram realizadas a duas temperaturas diferentes, 20 e 30 °C durante 15 dias. A última água da lavagem foi inoculada nos meios

MATERIAL E MÉTODOS

usados sob as condições de cultura definidas, para confirmar a eficiência da esterilização.

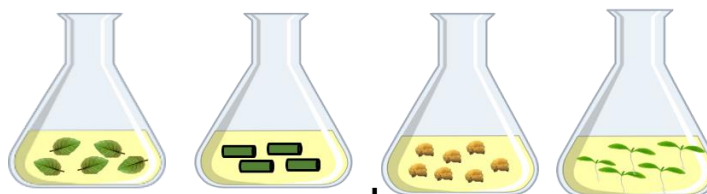
Depois de testar e analisar as melhores condições de crescimento de bactérias de tamarilho em material vegetal *in vivo*, estas foram aplicadas para o material vegetal *in vitro* de modo a economizar recursos e tempo. Deste modo, a cultura de endófitos do material *in vitro*, foi inoculada em meio ABM2 com pH 7,0 e com pH 8,5 incubadas a 20 °C, e em meio LB exatamente nas mesmas condições.

2.4.1 Isolamento e conservação de bactérias

As colónias de bactérias foram selecionadas com base em características morfológicas, e isoladas em meio LB com pH 7 e mantidas a 20 °C. Os isolados bacterianos foram sujeitos a sucessivas repicagens até obter colónias purificadas.

Para armazenamento a longo prazo das culturas bacterianas obtidas, cerca de 10 µL de amostra de bactéria foi homogeneizada em 1 mL de glicerol a 30 % (v/v), em criotubos e armazenadas a - 80 °C.

1. Folhas, medula + córtex, calo e plântulas lavadas e esterilizadas



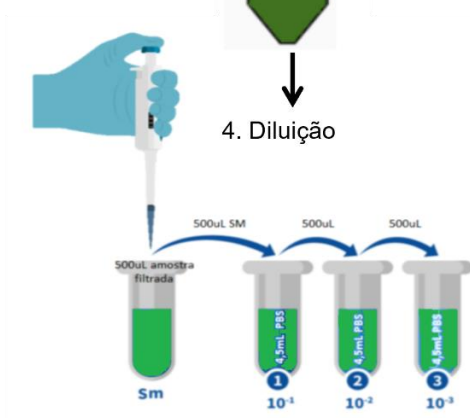
2. Maceração com 10 mL PBS



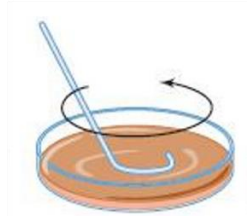
3. Filtração



4. Diluição



5. Espalhar no meio 100 µL de cada diluição



6. Incubar a 20 °C e 30 °C

Figura 9 - Esquema resumo do isolamento de endófitas de tamarilho.

2.5 Identificação de bactérias endófitas

2.5.1 Extração do ADN

Para a extração do ADN das colónias bacterianas, foi inicialmente preparado um lisado bruto de uma colónia de bactérias por ressuspensão de cerca de 1 µL de bactéria em 50 µL de NaOH 0,5 M, aquecido no termobloco a 95 °C por 4 minutos e imediatamente arrefecido em gelo por 10 minutos. De seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g (5 min.), e o sobrenadante foi recolhido e armazenado a -20 °C num procedimento adaptado de Wiedmann-Al-Ahmad *et al.*, 1994.

2.5.2 RAPD-PCR *fingerprint*

Para avaliar a diversidade genética dos isolados bacterianos, realizou-se um RAPD-PCR usando o primer OPA-03 (5'-AGTCAGCCAC-3') (Costa *et al.*, 2005), sintetizado pela StabVida (Oeiras, Portugal). As reações de amplificação continham 1 × NZYtaq II 2 × Green Master Mix (NZYTech, Oeiras, Portugal), 0,2 mM de primer e 50 ng ADN, num volume total de 25 µL por reação. As amostras foram amplificadas num termociclador Arktik™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) nas seguintes condições: 5 minutos a 94 °C para ocorrer a desnaturação inicial das cadeias de DNA, seguido de 45 ciclos a 1 minuto a 94 °C (desnaturação), 1 minuto a 39 °C promovendo o annealing do primer, 2 minutos a 72 °C para a extensão inicial e 7 minutos a 72 °C para a etapa final da extensão.

Os produtos de PCR foram examinados por eletroforese em gel de agarose a 2 % (p/v), corado com GreenSafe Premium (NZYTech).

Os produtos de PCR foram carregados no gel juntamente com o marcador de peso molecular (Ladder VI, NZYTech), e as condições da corrida foram programadas para 70 V por 180 minutos. Os agrupamentos foram formados por inspeção visual com base na similaridade e intensidade da fluorescência de cada banda observada nos perfis RAPD, ou seja, o número e o peso das bandas quando comparadas entre si e com o

marcador de peso molecular. O gel foi depois observado num Gel Doc XR+ (BioRad, EUA) para visualizar a similaridade das bandas entre amostras e agrupá-las de acordo com os perfis RAPD que apresentam, isto é, o número e o peso das bandas quando comparadas entre si e com o marcador de peso molecular. Os isolados com o mesmo perfil RAPD foram consideradas da mesma espécie.

2.5.3 Análise filogenética

As análises filogenéticas foram realizadas nos isolados bacterianos representativos de cada perfil obtido com base na análise por RAPD-PCR. Os isolados foram identificados com base na sequência do gene 16S rRNA (aproximadamente 1500 pb) amplificada por PCR, usando os primers 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1525R (5'-GGTACCTGTTACGACTT-3') (Rainey *et al.*, 1996), sintetizados pela StabVida.

As reações de amplificação continham 1 × NZYtaq II 2 × Colorless Master Mix (NZYTech), 0,2 mM de cada primer e 50 ng ADN, num volume total de 50 µL por reação e sob as seguintes condições: 95 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos a 95 °C por 1 min, hibridização a 55 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 2 min, antes de uma extensão final a 72 °C por 10 min. Os produtos de PCR foram purificados e sequenciados pela StabVida, utilizando o primer 519R (5'-GWATTACCGCGGCKGCTG-3') (Turner *et al.*, 1999) para obter uma sequência parcial.

As sequências foram editadas manualmente usando o SnapGene Viewer (GSL Biotech, San Diego, CA, EUA) e comparadas com os dados disponíveis da base de dados EZBioCloud versão 2021.07.07 (Yoon *et al.*, 2017). As sequências obtidas do EZBioCloud com mais de 97 % de similaridade com as sequências parciais dos nossos isolados foram usadas para análise filogenética e alinhados usando o ClustalW 2.1 (Thompson *et al.*, 1994) no MEGA (versão 11.0 para Windows 11) (Kumar *et al.*, 2018). Esta operação foi feita para cada género bacteriano individualmente. Os modelos de substituição de ADN mais adequados foram avaliados usando a função “find best DNA/Protein Models (ML)” no MEGA, implementando o método estatístico Maximum Likelihood (ML) para testar a qualidade do ajuste a vários modelos de evolução. De acordo com os valores estimados

MATERIAL E MÉTODOS

de todos os parâmetros para cada modelo, o modelo que melhor se ajustou ao conjunto de dados das sequências parciais do gene 16S rRNA foi Jukes-Cantor e gama-distribuído (+G) (=JC+G) para *Microbacterium* e Jukes-Cantor (=JC) para *Arthrobacter* e *Frigoribacterium*. A figura 10, resume os procedimentos experimentais utilizados na identificação de bactérias endófitas.

2.6 Análise estatística

As taxas de germinação de sementes e de indução de calo apresentadas neste trabalho, foram analisadas através de ANOVA de duas vias (GraphPad Prism v. 9.0.0 para Windows, San Diego, CA, EUA), seguido por um teste de comparação múltipla de Tukey ($p < 0,05$), para comparar os três genótipos e os diferentes tratamentos. Os valores são dados como média \pm desvio padrão de três réplicas (N=50) para a germinação de sementes de tamarilho vermelho, amarelo e laranja e nove réplicas (N=6) para a indução de calo de medula de tamarilho vermelho, amarelo e laranja em três diferentes condições de cultura (controle, 2,0 mg L⁻¹ e 5,0 mg L⁻¹).

1. Crescimento e contagem das colónias de bactérias

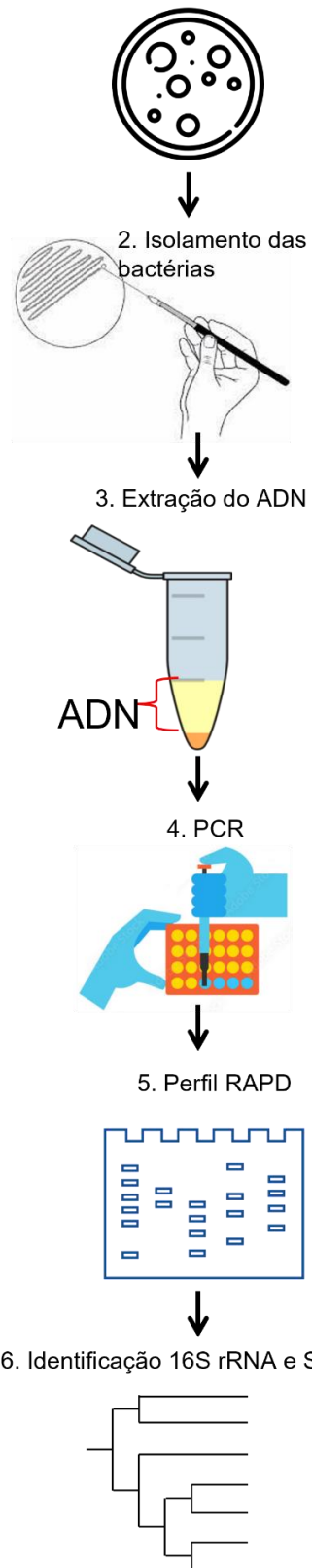
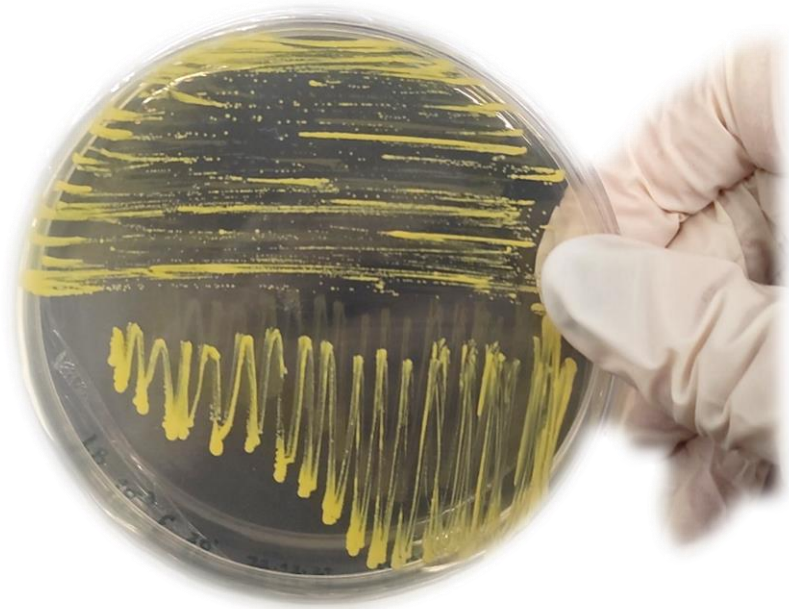


Figura 10 - Esquema resumo da identificação de bactérias endófitas de tamarilho.

MATERIAL E MÉTODOS

3 Resultados



RESULTADOS

3.1 Germinação de sementes

50 sementes de frutos maduros de árvores de tamarilho: C1 (fruto vermelho), C5 (fruto amarelo) e C6 (fruto laranja), foram germinadas a fim de se obter plântulas sob condições *in vitro*. Não se observou a ocorrência de contaminações durante este procedimento, o que indica que o método de esterilização foi eficaz.

Num primeiro ensaio, as culturas de sementes foram colocadas a germinar ao escuro, a 25 °C, durante 60 dias. Não houve germinação das sementes de tamarilho vermelho (C1) nem de tamarilho laranja (C6) no decorrer deste período, porém algumas sementes de tamarilho amarelo começaram a desenvolver radícula, sob condições de ausência de luz (Fig. 11).

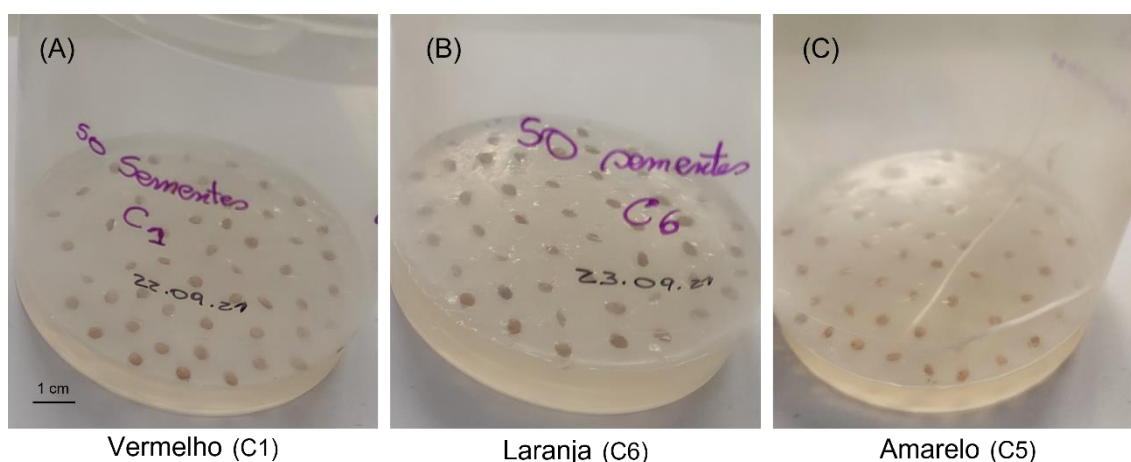


Figura 11 - Sementes inoculadas em caixas de cultura contendo meio MS. A - Tamarilho vermelho (C1), B - tamarilho laranja (C6) e C - tamarilho amarelo (C5). Todas as culturas foram incubadas durante 60 dias no escuro, a 25 °C.

As culturas de sementes que estavam inicialmente no escuro, foram transferidas para a câmara de crescimento a 25 °C, com fotoperíodo de 16 horas de luz ($15\text{-}20 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Após oito dias de exposição à luz, as sementes dos três genótipos iniciaram o processo de germinação (Fig. 12). O procedimento adotado permitiu obter plântulas de tamarilho vermelho, amarelo e laranja após 30 dias de cultura à luz (Fig. 13).

RESULTADOS

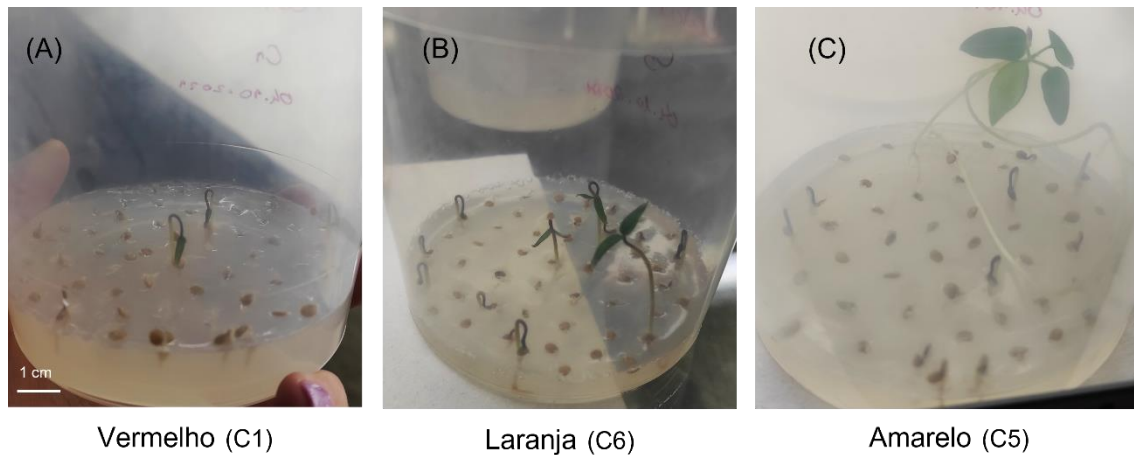


Figura 12 - Sementes inoculadas em caixas de cultura contendo meio MS. A - Tamarilho vermelho (C1), B - tamarilho laranja (C6) e C - tamarilho amarelo (C5). Culturas com oito dias de incubação na câmara de crescimento a 25 °C, com fotoperíodo de 16h de luz.

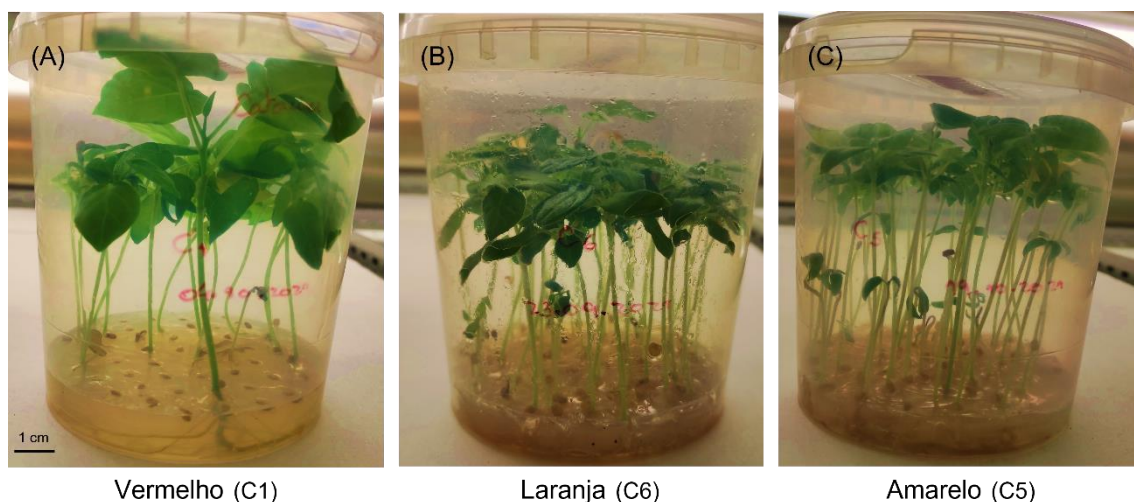


Figura 13 - Sementes inoculadas em caixas de cultura contendo meio MS. A - Tamarilho vermelho (C1), B - tamarilho laranja (C6) e C - tamarilho amarelo (C5). Todas as culturas foram incubadas durante 30 dias na câmara de crescimento a 25 °C, com fotoperíodo de 16h de luz.

Na ausência de luz, apenas as sementes tamarilho amarelo iniciaram o processo de germinação com uma taxa média de germinação de $5 \pm 1,15$ %. No entanto, quando expostas à luz as sementes dos três genótipos de tamarilho apresentam taxas de germinação de $75 \pm 4,62$ % para tamarilho vermelho, $80 \pm 8,00$ % para tamarilho amarelo e $77 \pm 5,03$ % para tamarilho laranja (Fig. 14).

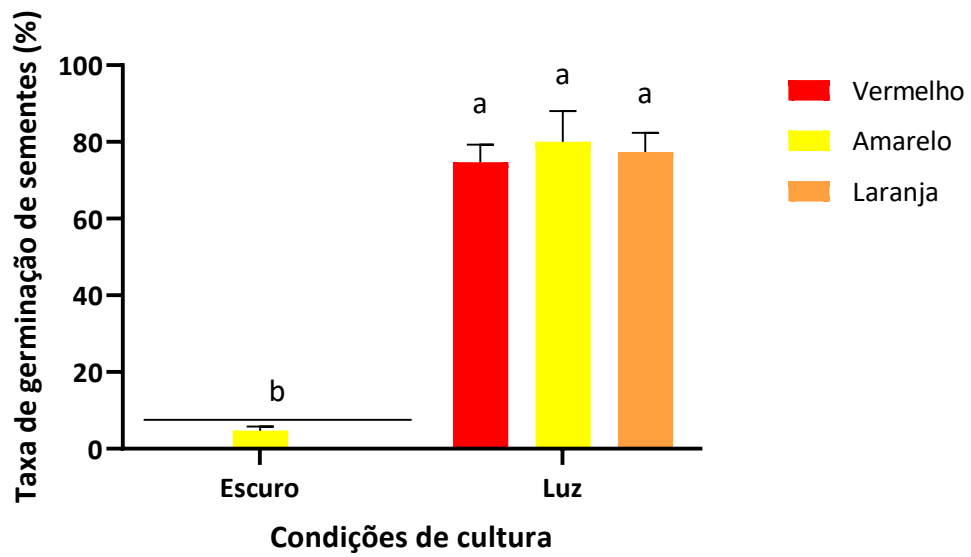


Figura 14 - Taxa de germinação de sementes (%) de tamarilho vermelho, tamarilho amarelo e tamarilho laranja sob condições de cultura com ausência e presença de luz. Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão (N=50). Letras diferentes representam valores estatisticamente distintos pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

3.2 Indução de calo

Após 60 dias de cultura, as condições experimentais para as quais se observou maior evolução da formação de calo foram quando se utilizou o meio MS + 5,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, em todos os genótipos (Fig. 15). Não foi observada indução de calo nas caixas com meio MS controlo nem em MS + 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D nos três genótipos (Fig. 16). Verificou-se ainda que a taxa de indução de calo foi considerável para o tamarilho vermelho, com taxa média de indução de 31 ± 39,48 %. De acordo com o teste paramétrico de Tukey houve uma diferença significativa entre o tamarilho vermelho do meio MS + 5,0 mg L⁻¹ de 2,4-D e os restantes genótipos, nas mesmas condições de cultura e também relativamente às restantes condições testadas (controlo e MS + 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D).

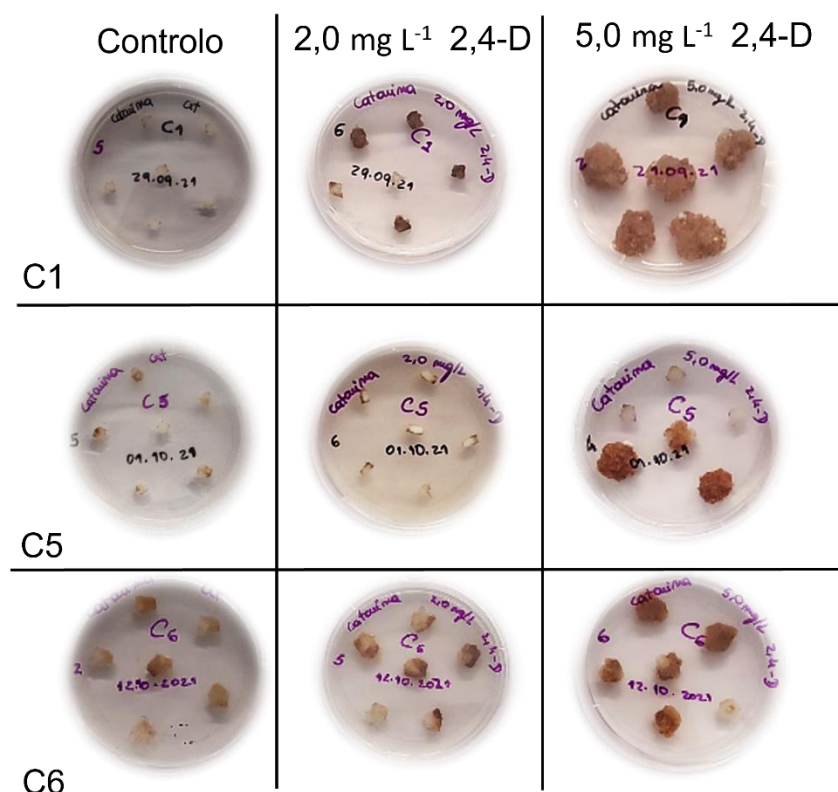


Figura 15 - Indução calo em segmentos de medula de tamarilho vermelho (C1), tamarilho amarelo (C5) e tamarilho laranja (C6) em diferentes condições de cultura. Controlo: meio MS com 3 % sacarose. Meio MS com 3 % sacarose + 2,4-D [2,0 mg L⁻¹]. Meio MS com 3 % sacarose + 2,4-D [5,0 mg L⁻¹].

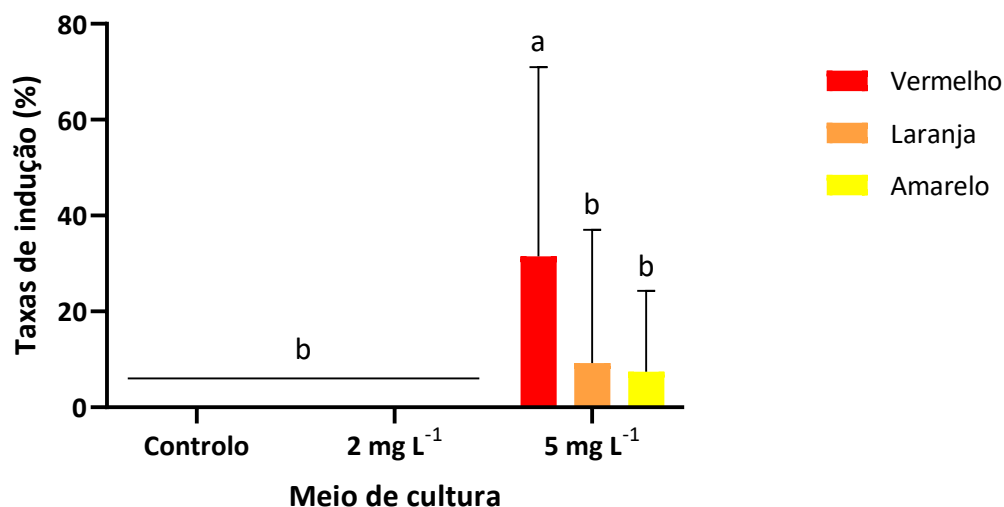


Figura 16 - Taxa de indução de calo (%) de tamarilho vermelho, tamarilho amarelo e tamarilho laranja em diferentes condições de cultura. Meio MS com 3 % sacarose + 2,4-D [2,0 mg L⁻¹]. Meio MS com 3 % sacarose + 2,4-D [5,0 mg L⁻¹]. Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão (N=9). Letras diferentes representa valores estatisticamente distintos pelo teste de Tukey (p < 0.05).

3.3 Isolamento de bactérias endófitas

Um total de 231 isolados de bactérias foram obtidos a partir de material vegetal *in vitro* e *in vivo*, nomeadamente de córtex, medula, folhas e plântulas. De referir que não se obtiveram isolados de bactérias endófitas a partir da indução de calo com origem na medula caulinar.

O número de isolados de bactérias proveniente de material vegetal *in vivo* foi superior quando isoladas a partir do córtex, com um total de 126 isolados (Fig. 17). No que diz respeito aos genótipos amostrados, o tamarilho vermelho que apresentou um valor superior (90 isolados) comparativamente com o amarelo e laranja que apresentaram apenas cinco e 31 isolados respetivamente (Fig. 17).

Quando se usou como material de partida a medula caulinar, verificou-se que o número de isolados foi maior a partir do tamarilho laranja (61), enquanto a partir de tamarilho vermelho se obtiveram apenas 19 isolados. Não se obtiveram isolados de bactérias no tamarilho amarelo a partir de explantes de medula. O mesmo também se

RESULTADOS

verificou com o tamarilho vermelho quando se tratou de isolados a partir de explantes foliares. Neste tipo de órgão registou-se sempre um baixo número de isolados de bactérias nos explantes foliares, com apenas quatro isolados em tamarilho amarelo e laranja (Fig. 17).

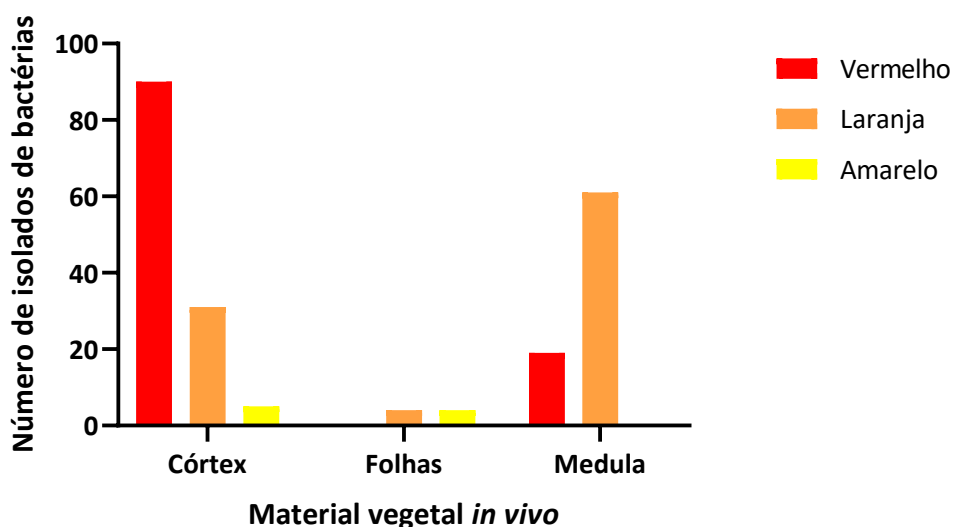


Figura 17 - Número de isolados de bactérias obtidos do córtex, folhas e medula de tamarilho vermelho, tamarilho laranja e tamarilho amarelo.

Um total de 105 isolados foram obtidos no meio ABM2, sendo que 59 foram provenientes de tamarilho vermelho e 42 de tamarilho laranja. O meio LB e o meio R2A obtiveram um número aproximado de isolados, 67 e 42 respetivamente. A partir destes dois meios, para LB foram obtidos 28 isolados provenientes de tamarilho vermelho e 35 de tamarilho laranja. Para o meio R2A, 22 isolados foram obtidos de tamarilho vermelho e 19 de tamarilho laranja. Um número semelhante de isolados de tamarilho amarelo foi obtido nos três meios, com quatro isolados para o meio ABM2 e LB, e apenas um para R2A (Fig. 18).

Quanto ao pH, o número de isolados obtidos foi superior em pH 7, com um total de 136 isolados obtidos, no entanto, foram obtidos 11 e 67 isolados para pH 5,5 e 8,5, respetivamente (Fig. 19). No parâmetro diluição (Fig. 20), o número de isolados obtidos

foi superior para SM, com um total de 172 isolados de bactérias, contudo, na primeira diluição (10^{-1}) foram obtidos 36. Na segunda (10^{-2}) e na terceira (10^{-3}) diluições o crescimento de bactérias foi praticamente nulo. Por fim, quando se compararam as duas temperaturas, os resultados mostraram que não havia diferenças acentuadas entre elas (Fig. 21).

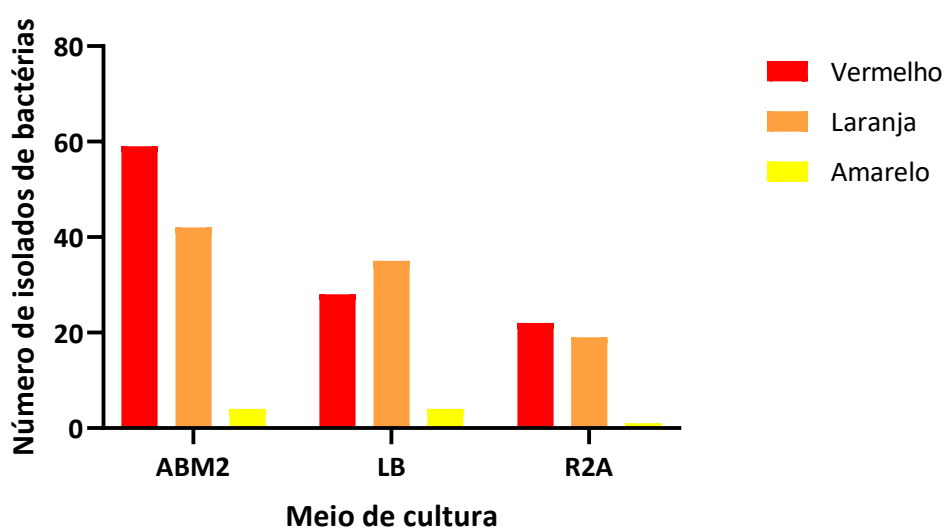


Figura 18 - Número de isolados de bactérias obtidos em cada meio de cultura: ABM2, LB e R2A de tamarilho vermelho, tamarilho laranja e tamarilho amarelo.

RESULTADOS

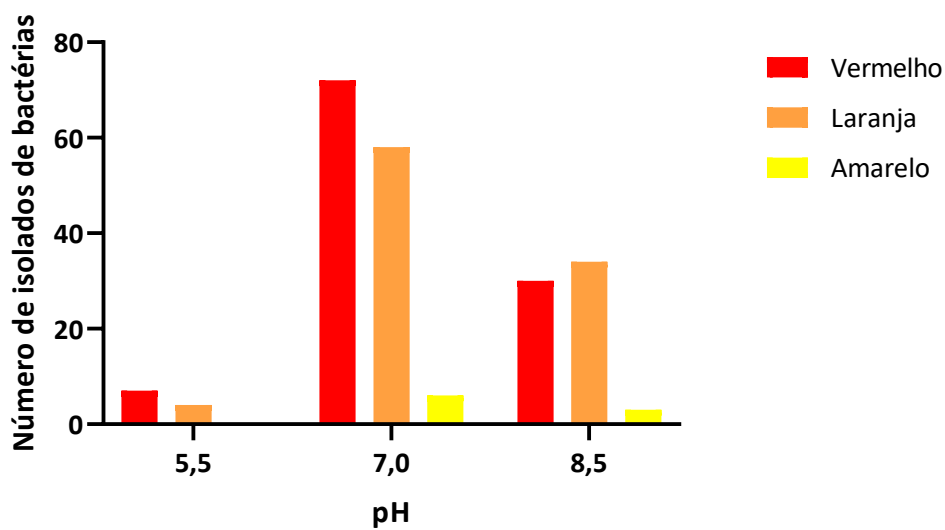


Figura 19 - Número de isolados de bactérias obtidos em diferentes pH: 5,5, 7, 8,5 de tamarilho vermelho, tamarilho laranja e tamarilho amarelo.

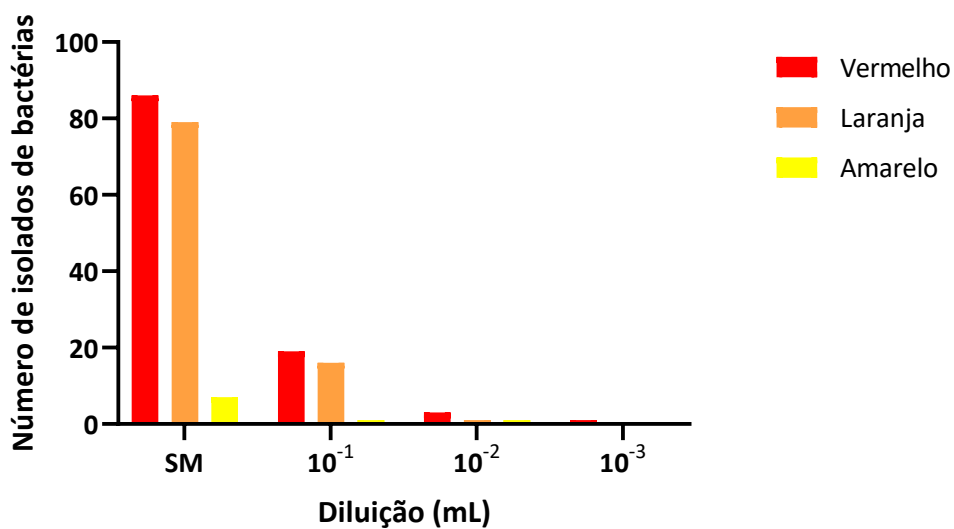


Figura 20 - Número de isolados de bactérias nas diferentes diluições (mL): Solução Mãe, 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³ de tamarilho vermelho, tamarilho laranja e tamarilho amarelo.

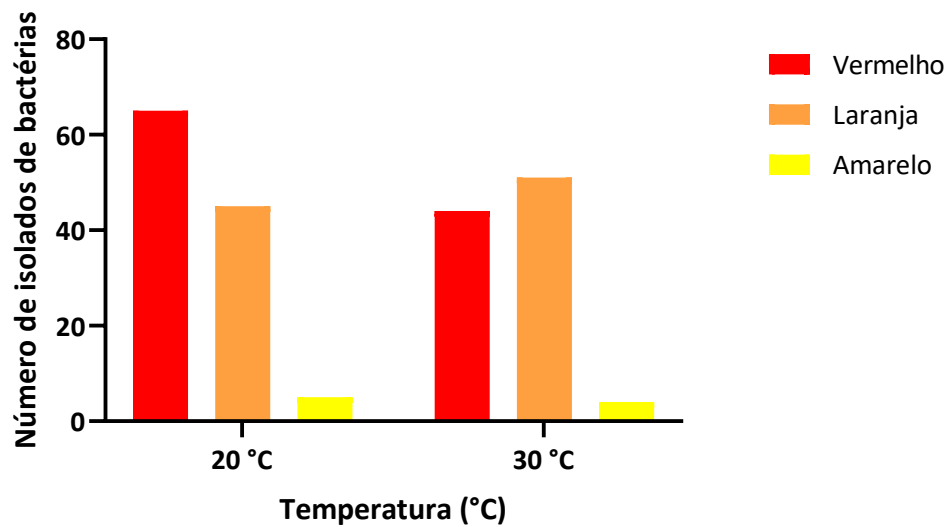


Figura 21 - Número de isolados de bactérias obtidos nas duas temperaturas (°C): 20 °C e 30 °C de tamarilho vermelho, tamarilho laranja e tamarilho amarelo.

Numa análise geral ao número de isolados de bactérias obtidos das três árvores de tamarilho presentes no Jardim Botânico da Universidade de Coimbra, do tamarilho vermelho (C1) foram isoladas 109 colónias de bactérias, do tamarilho laranja (C6) 96 e do tamarilho amarelo (C5) apenas nove (Fig. 22). A figura 27 A e B são exemplos de colónias de bactérias endófitas obtidas de material vegetal *in vivo*.

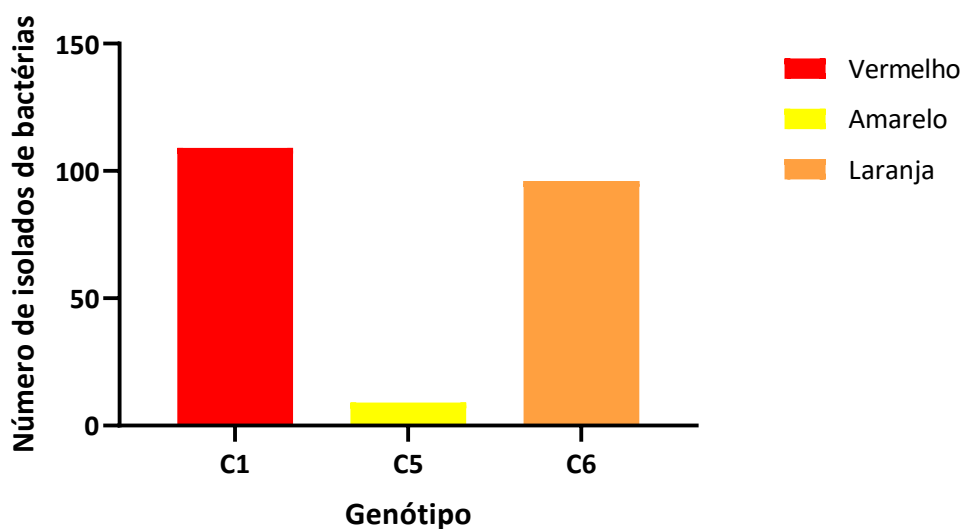


Figura 22 – Número de isolados de bactérias extraídos de cada árvore de tamarilho: (C1) Tamarilho Vermelho, (C5) Tamarilho Amarelo e (C6) Tamarilho Laranja.

RESULTADOS

Depois de testar e analisar as melhores condições de crescimento de bactérias de tamarilho em material vegetal *in vivo*, estas foram aplicadas para o material vegetal *in vitro*. Um total de 17 bactérias endófitas foram isoladas de plântulas estabelecidas *in vitro*, dos três genótipos. Um número semelhante de isolados foi obtido nos dois meios, nos dois pH testados e nas duas diluições (SM, 10^{-1}) (Fig. 23-25). Deve também referir-se que o tempo de incubação das bactérias do referido material vegetal, foi inferior comparativamente com o do procedimento anterior, uma vez que após uma semana de incubação se verificou crescimento bacteriano (Fig. 27 C e D).

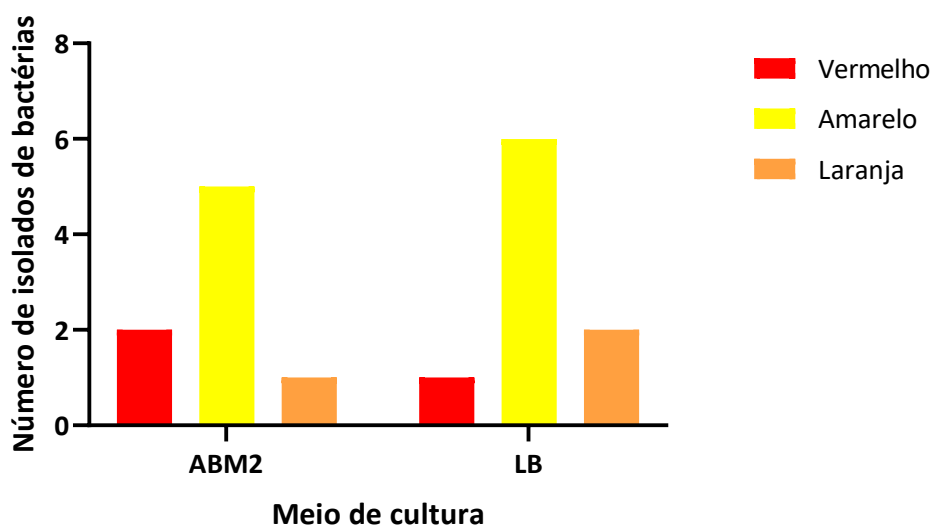


Figura 23 - Número de isolados de bactérias obtidos em cada meio de cultura: ABM2 e LB de plântulas obtidas por germinação de sementes de frutos de tamarilho vermelho, tamarilho laranja e tamarilho amarelo.

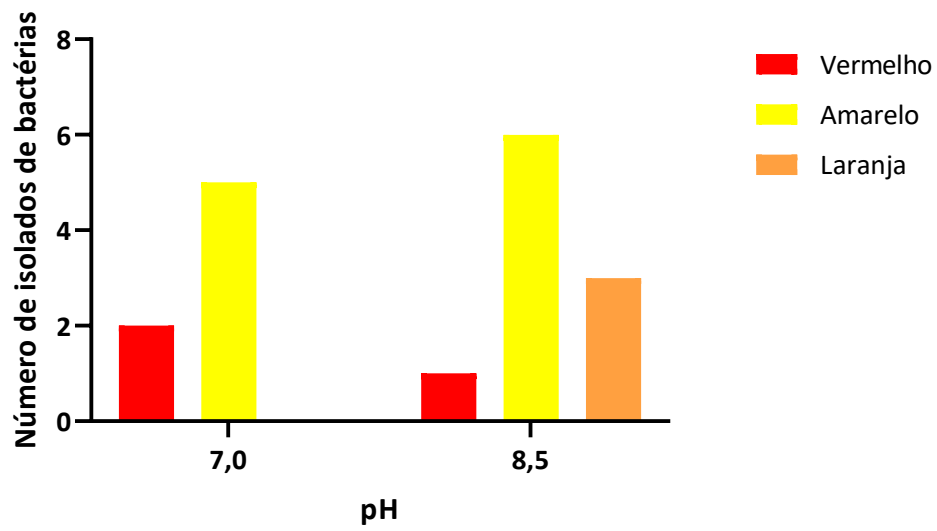


Figura 24 - Número de isolados de bactérias em pH: 7 e 8,5 de plântulas obtidas por germinação de sementes de frutos de tamarilho vermelho, tamarilho laranja e tamarilho amarelo.

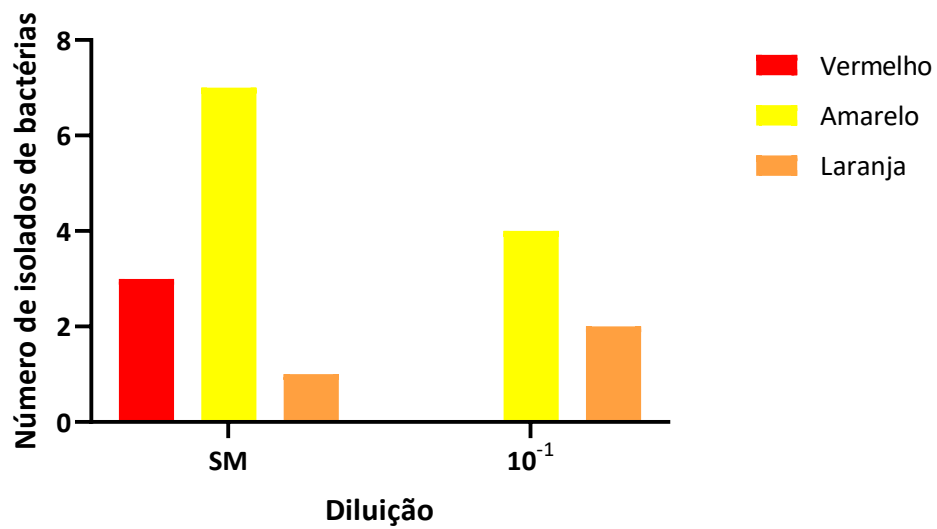


Figura 25 - Número de isolados de bactérias nas diferentes diluições (mL): Solução Mãe, 10⁻¹, de plântulas obtidas por germinação de sementes de frutos de tamarilho vermelho, tamarilho laranja e tamarilho amarelo.

RESULTADOS

Em geral, estes resultados indicam, que o genótipo que apresentou maior número de isolados de bactérias a partir de plântulas de sementes de tamarilho germinadas, foi o tamarilho amarelo (C5) com 11 isolados. Tanto o tamarilho vermelho (C1) como o tamarilho laranja (C6) obtiveram três isolados cada (Fig. 26).

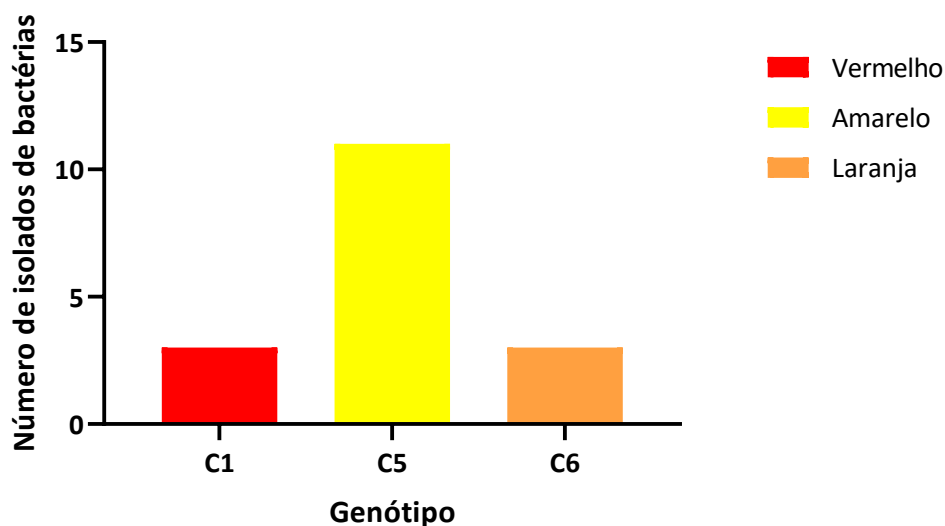


Figura 26 - Número de isolados de bactérias extraídos de cada árvore de tamarilho: (C1) Tamarilho Vermelho, (C6) Tamarilho Laranja e (C5) Tamarilho Amarelo.

Um total de 231 colônias de bactérias foram isoladas com base nas características morfológicas (Fig. 27), contudo, devido a contaminações e a não se replicarem após repicagens sucessivas, foi apenas possível purificar 151 para extração do ADN (Fig. 28).

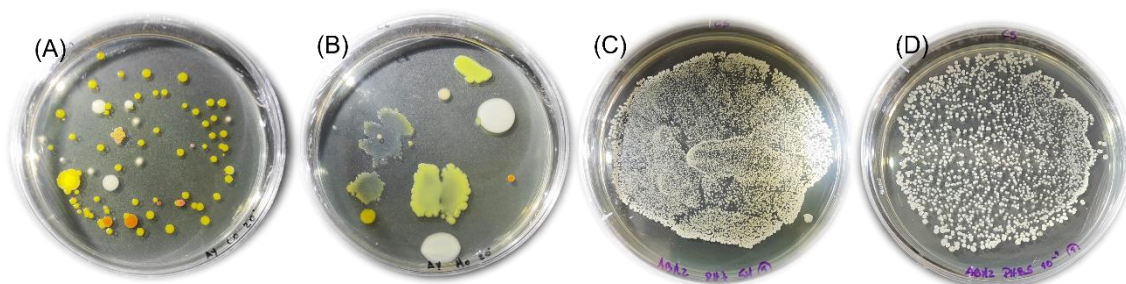


Figura 27 - Colônias bacterianas obtidas a partir de material de tamarilho. A e B a partir de material vegetal *in vivo*; C e D a partir de material vegetal *in vitro*.

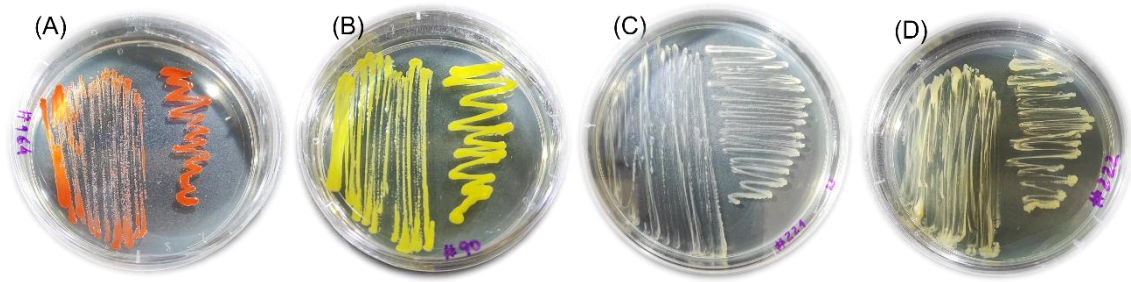


Figura 28 - Colônias bacterianas obtidas a partir de material de tamarilho. A e B a partir de material vegetal *in vivo*; C e D a partir de material vegetal *in vitro*.

Dos 151 isolados, 139 foram obtidos de material *in vivo*, enquanto os outros 12 de material *in vitro*. Tendo em conta as condições em que cada isolado foi obtido (explante, meio, pH, temperatura e diluição) foram selecionados 91 isolados, 83 de material *in vivo*, e oito de material *in vitro* para análise por RAPD-PCR. Perfis RAPD foram obtidos para todos os 91 isolados e agrupados em 71 clusters. A maioria dos perfis RAPD (64) eram únicos. Um perfil foi formado por seis isolados e outro por três (Fig. 29), enquanto os restantes cinco por dois isolados.

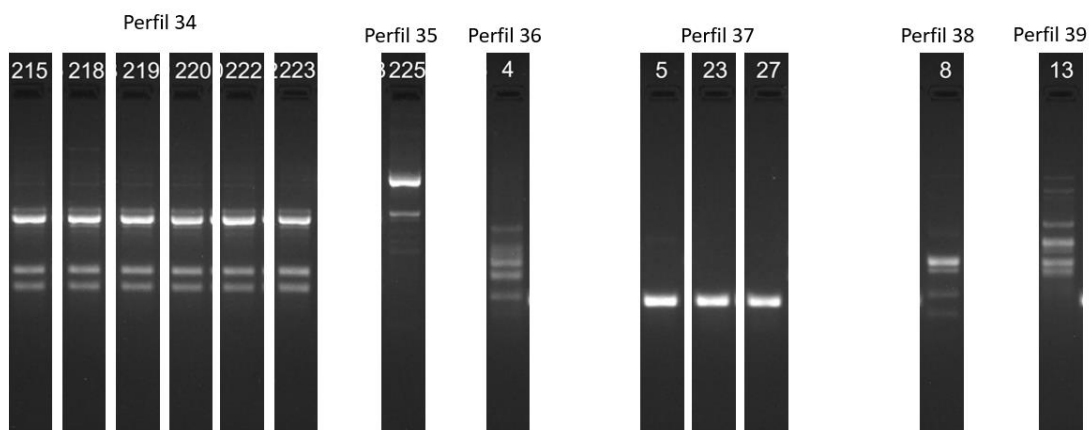


Figura 29 - Exemplos de Perfis RAPD, agrupados (Perfil 34 e 37) e únicos (Perfil 35, 36, 38 e 39).

RESULTADOS

Foram obtidos um total de 69 perfis RAPD para os isolados bacterianos de material vegetal *in vivo* e apenas dois de material *in vitro* (Fig. 30).

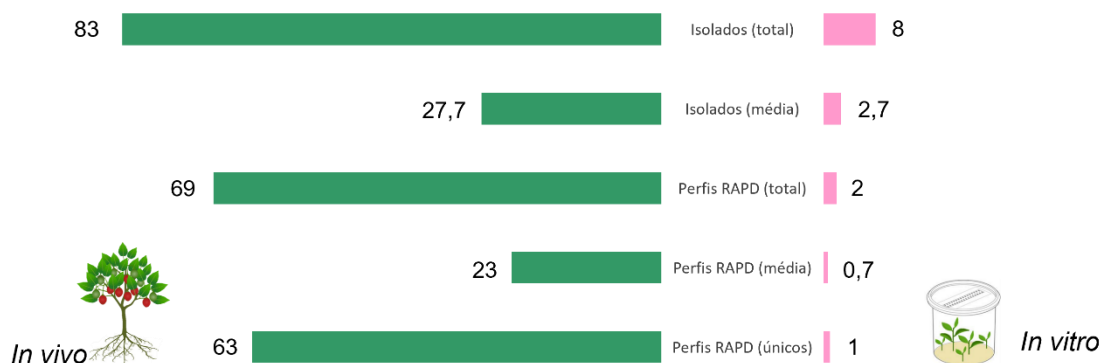


Figura 30 - Número de isolados, perfis RAPD dos isolados bacterianos endofítos de material vegetal de tamarilho *in vivo* e *in vitro*.

Após purificação e sequenciação dos produtos de PCR, a sequência parcial obtida e tratada foi comparada com os dados disponíveis da base de dados EzBioCloud, que indicou valores de similaridade acima dos 97 % praticamente em todos os isolados, permitindo ter uma identificação prévia das bactérias endófitas isoladas de tamarilho (Tabela 1). Os isolados selecionados para amplificação e sequenciação do gene 16S rRNA pertencem a 22 géneros (*Acerihabitans*, *Aquimarina*, *Arenivirga*, *Arthrobacter*, *Aureimonas*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Brevundimonas*, *Cellulomonas*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Frigoribacterium*, *Kineococcus*, *Kocuria*, *Marmoricola*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Paracoccus*, *Rhizobium*, *Staphylococcus*, *Sphingobacterium*, *Serinibacter*). Comparando as duas bases de dados (NCBI e EzBioCloud) houve correspondência na maior parte dos géneros das bactérias, por outro lado, a espécie não foi totalmente similar, mas ainda assim houve casos correspondentes.

Tabela 1 – Identificação preliminar dos gêneros dos isolados de bactérias endófitas, obtida por similaridade com as sequências das bases de dados NCBI e EzBioCloud.

Perfil RAPD	Isolados	Espécies (NCBI número de acesso)	EzBioCloud (sequência parcial 16S)	Similaridade da base de dados EzBioCloud
1	Sb132	<i>Arenivirga flava</i> (MZ338816.1)	<i>Arenivirga flava</i> (LC203064)	97,78
2	Sb135	<i>Microbacterium oxydans</i> (EU373321.1)	<i>Microbacterium liquefaciens</i> (X77444)	98,68
3	Sb137	<i>Microbacterium oxydans</i> (EU373321.1)	<i>Microbacterium liquefaciens</i> (X77444)	98,89
4	Sb139	<i>Serinibacter arcticus</i> (KR080299.1)	<i>Serinibacter arcticus</i> (KR080299)	96,02
5	Sb141	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> (JQ684246.1)	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> (AJ277840)	99,78
6	Sb144	<i>Frigoribacterium sp.</i> (CP043650.1)	<i>Frigoribacterium endophyticum</i> (KM114212)	97,57
7	Sb146	<i>Arenivirga flava</i> (MZ338816.1)	<i>Arenivirga flava</i> (LC203064)	98,24
8	Sb150	<i>Microbacterium foliorum</i> (CP041040.1)	<i>Microbacterium foliorum</i> (JYIU01000006)	98,9
9	Sb151	<i>Microbacterium terricola</i> (KR476445.1)	<i>Microbacterium horti</i> (KM576855)	96,41
10	Sb155	<i>Microbacterium sp.</i> (MN179798.1)	<i>Microbacterium radiodurans</i> (GQ329713)	99,3
11	Sb156	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> (LT223598.1)	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> (AJ277840)	98,9
12	Sb159	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> (LT223598.1)	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> (AJ277840)	99,56
13	Sb160	<i>Microbacterium foliorum</i> (CP041040.1)	<i>Aquimarina agarilytica</i> (JH621312)	60,13
14	Sb163	<i>Microbacterium pumilum</i> (KC213957.1)	<i>Microbacterium saccharophilum</i> (AB736273)	98,67
15	Sb164	<i>Arthrobacter sp.</i> (JX164053.1)	<i>Arthrobacter ruber</i> (JX949648)	98,02
16	Sb167	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> (CP041259.1)	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> (AJ312209)	99,12
17	Sb168	<i>Microbacterium oxydans</i> (EU373321.1)	<i>Microbacterium liquefaciens</i> (X77444)	98,46
18	Sb173	<i>Frigoribacterium sp.</i> (ON255756.1)	<i>Frigoribacterium faeni</i> (BJUV01000064)	98,23
19	Sb177	<i>Frigoribacterium endophyticum</i> (MK809369.1)	<i>Frigoribacterium endophyticum</i> (KM114212)	97,57
20	Sb178	<i>Kocuria rhizophila</i> (MH665978.1)	<i>Kocuria arsenatis</i> (KM874399)	99,32
21	Sb179	<i>Serinibacter arcticus</i> (KR080299.1)	<i>Serinibacter arcticus</i> (KR080299)	99,56
22	Sb183	<i>Arthrobacter sp.</i> (AY336532.1)	<i>Arthrobacter oryzae</i> (AB279889)	98,65
23	Sb186	<i>Microbacterium terricola</i> (KR476445.1)	<i>Microbacterium horti</i> (KM576855)	95,93
24	Sb187	<i>Cellulomonas hominis</i> (KP762562.1)	<i>Cellulomonas pakistanensis</i> (BBHV01000063)	98,23

RESULTADOS

Tabela 1 – Identificação preliminar dos gêneros dos isolados de bactérias endófitas, obtida por similaridade com as sequências das bases de dados NCBI e EzBioCloud.

25	Sb188	<i>Arthrobacter</i> sp. (AY336532.1)	<i>Arthrobacter oryzae</i> (AB279889)	98,88
26	Sb191	<i>Microbacterium</i> sp. (AB921258.1)	<i>Microbacterium murale</i> (HE585693)	98,75
27	Sb194	<i>Microbacterium</i> <i>phyllosphaerae</i> (LT223598.1)	<i>Microbacterium</i> <i>phyllosphaerae</i> (AJ277840)	99,12
28	Sb198	<i>Microbacterium</i> <i>phyllosphaerae</i> (LT223598.1)	<i>Microbacterium</i> <i>phyllosphaerae</i> (AJ277840)	99,11
29	Sb200	<i>Frigoribacterium</i> sp. (EU584512.1)	<i>Frigoribacterium faeni</i> (BJUV01000064)	98,23
30	Sb204	<i>Microbacterium</i> sp. (AB921258.1)	<i>Microbacterium murale</i> (HE585693)	98,75
31	Sb206	<i>Aureimonas glaciistagni</i> (NR_137357.1)	<i>Aureimonas glaciistagni</i> (KM273177)	98,33
32	Sb211	<i>Arthrobacter</i> sp. (HQ327111.1)	<i>Arthrobacter pascens</i> (X80740)	98,66
33	Sb214	<i>Bacillus</i> sp. (JF683265.1)	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i> (AM747813)	98,96
34	Sb219	<i>Bacillus pumilus</i> (CP054310.1)	<i>Bacillus zhangzhouensis</i> (JOTP01000061)	99,59
35	Sb225	<i>Micrococcus</i> sp. (MH707205.1)	<i>Micrococcus terreus</i> (jgi.1058018)	99,56
36	Sb004	<i>Microbacterium</i> sp. (KM273963.1)	<i>Microbacterium rhizomatis</i> (KP161851)	97,54
37	Sb023	<i>Rhizobium</i> sp. (MN989130.1)	<i>Rhizobium soli</i> (EF363715)	81,49
38	Sb008	<i>Kineococcus rubinsiae</i> (MN493040.1)	<i>Kineococcus aurantiacus</i> (X77958)	90,6
39	Sb013	<i>Brevundimonas</i> sp. (EF486315.1)	<i>Brevundimonas vesicularis</i> (BCWM01000033)	100
40	Sb030	<i>Microbacterium testaceum</i> (KP642087.1)	<i>Microbacterium testaceum</i> (BJML01000022)	99,33
41	Sb032	<i>Microbacterium</i> sp. (MH127587.1)	<i>Microbacterium</i> <i>hydrothermale</i> (HM222660)	98,21
42	Sb039	<i>Microbacterium</i> sp. (MH127587.1)	<i>Microbacterium</i> <i>hydrothermale</i> (HM222660)	97,97
43	Sb045	<i>Staphylococcus</i> sp. (AJ704792.1)	<i>Staphylococcus warneri</i> (L37603)	99,58
44	Sb050	<i>Microbacterium</i> sp. (KM273963.1)	<i>Microbacterium testaceum</i> (BJML01000022)	99,33
45	Sb053	<i>Brevibacterium</i> sp. (CP073089.1)	<i>Brevibacterium celere</i> (AY228463)	99,1
46	Sb056	<i>Frigoribacterium</i> sp. (GQ342561.1)	<i>Frigoribacterium faeni</i> (BJUV01000064)	98,44
47	Sb058	<i>Frigoribacterium</i> sp. (EU584512.1)	<i>Frigoribacterium faeni</i> (BJUV01000064)	97,96
48	Sb063	<i>Clavibacter michiganensis</i> (CP033723.2)	<i>Clavibacter capsici</i> (CP012573)	99,33
49	Sb064	<i>Microbacterium</i> sp. (KM273963.1)	<i>Microbacterium ginsengisoli</i> (JYIY01000074)	96,88
50	Sb049	<i>Microbacterium</i> sp. (JN196543.1)	<i>Microbacterium rhizomatis</i> (KP161851)	97,55

Tabela 1 – Identificação preliminar dos gêneros dos isolados de bactérias endófitas, obtida por similaridade com as sequências das bases de dados NCBI e EzBioCloud.

51	Sb067	<i>Microbacterium</i> sp. (MH127587.1)	<i>Microbacterium hydrothermale</i> (HM222660)	97,52
52	Sb069	<i>Microbacterium</i> sp. (KM273963.1)	<i>Microbacterium ginsengisoli</i> (JYIY01000074)	97,11
53	Sb072	<i>Rhizobium</i> sp. (HE652094.1)	<i>Rhizobium soli</i> (EF363715)	97,82
54	Sb076	<i>Microbacterium</i> sp. (MN179798.1)	<i>Microbacterium radiodurans</i> (GQ329713)	99,76
55	Sb078	<i>Brevundimonas vesicularis</i> (MK248082.1)	<i>Brevundimonas vesicularis</i> (BCWM01000033)	99,04
56	Sb079	<i>Frigoribacterium</i> sp. (ON255756.1)	<i>Frigoribacterium faeni</i> (BJUV01000064)	98,23
57	Sb085	<i>Sphingobacterium chungjuense</i> (KY053202.1)	<i>Sphingobacterium chungjuense</i> (KY053202)	100
58	Sb086	<i>Microbacterium terricola</i> (KR476445.1)	<i>Microbacterium horti</i> (KM576855)	95,93
59	Sb088	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> (CP041259.1)	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> (AJ312209)	99,12
60	Sb093	<i>Microbacterium terricola</i> (KR476445.1)	<i>Microbacterium horti</i> (KM576855)	95,93
61	Sb095	<i>Yersinia</i> sp. (FM161638.1)	<i>Acerihabitans arboris</i> (MN737198)	96,61
62	Sb098	<i>Microbacterium</i> sp. (AY864634.1)	<i>Microbacterium liquefaciens</i> (X77444)	97,77
63	Sb103	<i>Microbacterium testaceum</i> (KP642087.1)	<i>Microbacterium testaceum</i> (BJML01000022)	99,11
64	Sb105	<i>Nocardioideae bacterium</i> (AB461094.1)	<i>Marmoricola solisilvae</i> (RJSG01000002)	95,77
65	Sb116	<i>Microbacterium oleivorans</i> (MW433868.1)	<i>Microbacterium oleivorans</i> (BCRG01000019)	99,56
66	Sb117	<i>Falsirhodobacter halotolerans</i> (LN774250.1)	<i>Paracoccus laeviglucosivorans</i> (AB727354)	97,61
67	Sb119	<i>Arthrobacter</i> sp. (AY336532.1)	<i>Arthrobacter oryzae</i> (AB279889)	98,89
68	Sb120	<i>Microbacterium terricola</i> (KR476445.1)	<i>Microbacterium horti</i> (KM576855)	96,41
69	Sb123	<i>Microbacterium</i> sp. (AB042081.1)	<i>Microbacterium murale</i> (HE585693)	98,75
70	Sb126	<i>Arthrobacter</i> sp. (AY336532.1)	<i>Arthrobacter oryzae</i> (AB279889)	98,66
71	Sb131	<i>Microbacterium pumilum</i> (KC213957.1)	<i>Microbacterium saccharophilum</i> (AB736273)	98,88

Arthrobacter, *Frigoribacterium* e *Microbacterium* foram os gêneros mais representados compreendendo seis, sete e 33 isolados com igual número de Perfis RAPD, respectivamente (Fig. 31-33). Dos gêneros *Arenivirga*, *Brevibacterium*, *Brevundimonas*, *Curtobacterium*, *Rhizobium* e *Serinibacter*, foram obtidos dois isolados.

RESULTADOS

Finalmente, um isolado foi obtido de cada um dos seguintes géneros: *Acerihabitans*, *Aquimarina*, *Aureimonas*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Clavibacter*, *Kineococcus*, *Kocuria*, *Marmoricola*, *Micrococcus*, *Paracoccus*, *Staphylococcus* e *Sphingobacterium*.

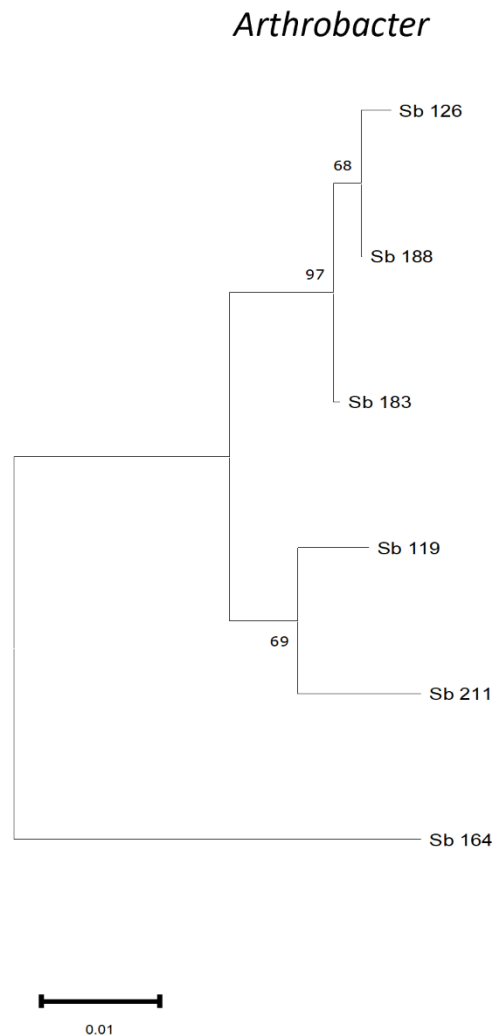


Figura 31 - Árvore filogenética obtida do género *Arthrobacter*, baseada na sequência parcial tratada e alinhada do gene 16S rRNA usando o modelo Jukes-Cantor (=JC).

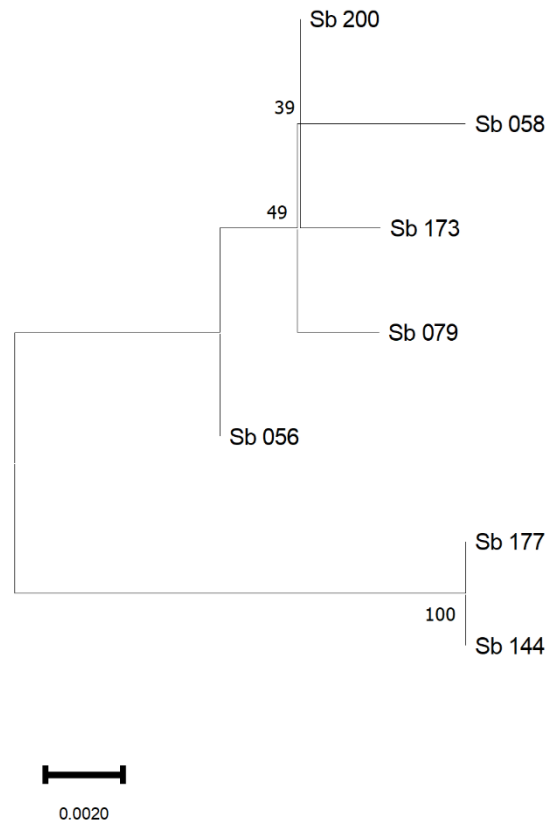
Frigoribacterium

Figura 32 - Árvore filogenética obtida do género *Frigoribacterium*, baseada na sequência parcial tratada e alinhada do gene 16S rRNA usando o modelo Jukes-Cantor (=JC).

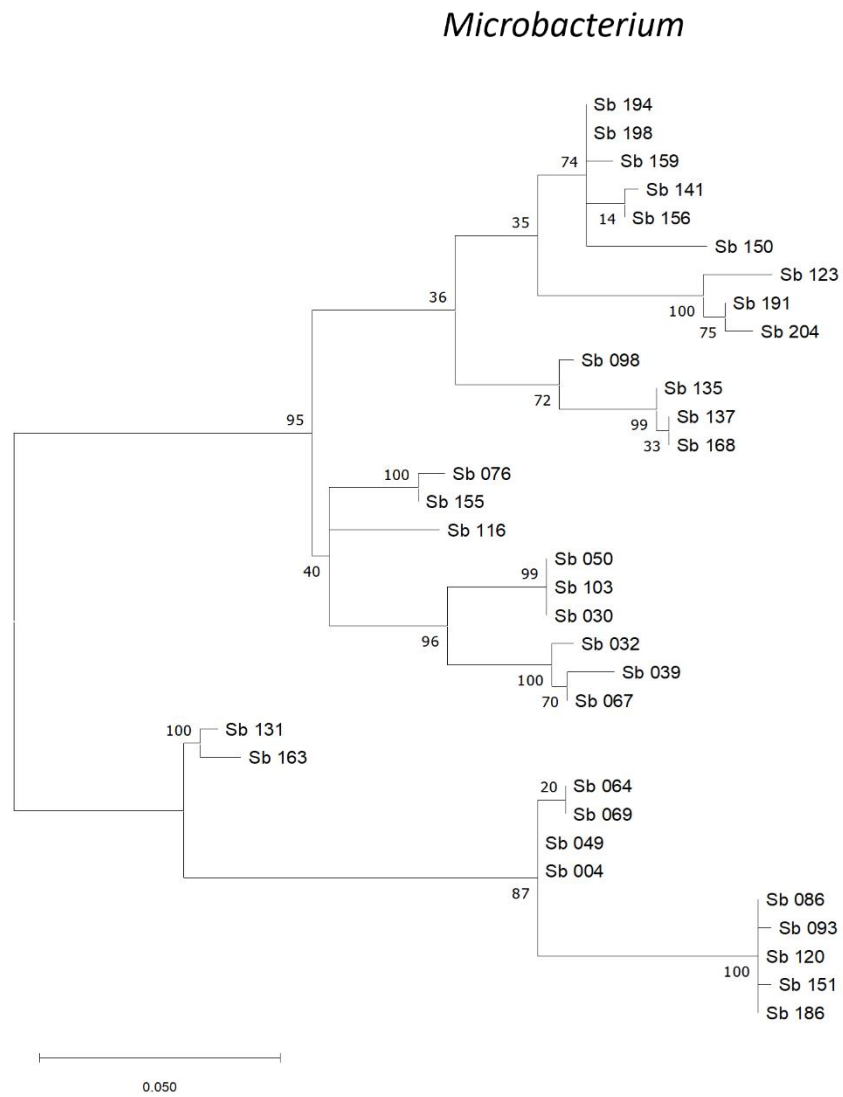


Figura 33 - Árvore filogenética obtida do género *Microbacterium*, baseada na sequência parcial tratada e alinhada do gene 16S rRNA usando o modelo Jukes-Cantor e gama-distribuído (+G) (=JC + G).

4 Discussão



DISCUSSÃO

4.1 Germinação de sementes

A germinação de sementes de tamarilho é um método fácil de se realizar, obtendo-se, em regra, elevadas taxas germinativas (Correia e Canhoto, 2012). Contudo, é comum em solanáceas, família a que pertence o tamarilho, ocorrer uma germinação lenta e irregular das sementes. Esta característica deve-se ao facto de não existir uniformidade na germinação, causada pela dormência (Kosera Neto *et al.*, 2015). A dormência presente nas sementes é uma resposta evolutiva para impedir a germinação até as condições ambientais serem apropriadas (Torres-González, 2019).

No ensaio realizado não foi usada qualquer técnica de quebra de dormência das sementes, uma vez que estas foram retiradas de frutos frescos, previamente colhidos de árvores selecionadas, e imediatamente estabelecidos no meio de cultura, após lavagem e esterilização. Porém, num primeiro ensaio, foram incubadas na estufa ao escuro, a 25 °C, durante 60 dias, e a taxa de germinação foi de 0 %. Este resultado foi constatado por Salgado-Pirata (2020), que mostrou que nenhuma semente de tamarilho germinou na ausência de luz. Uma das causas para não ter ocorrido a germinação nestas condições, deve-se ao facto de não terem sido aplicadas técnicas para quebrar a dormência das sementes, pois de acordo com Morton (1987), um método para acelerar o processo de germinação das sementes de tamarilho passa por, após lavagem e esterilização, estas serem armazenadas no frio 24h antes de serem estabelecidas no meio.

No entanto, após as culturas de sementes passarem para a câmara de crescimento a 25 °C, com fotoperíodo de 16 horas de luz (15-20 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), as sementes iniciaram o processo de germinação ao fim de uma semana expostas a estas condições, o que reforça a ideia de que a presença de luz é essencial para a germinação das sementes de tamarilho. Este comportamento diverge dos resultados apresentados por Maciel *et al.* (2018) que mostraram que o tempo de germinação das sementes de tamarilho é semelhante na ausência e na presença de luz. Diferenças. Os genótipos utilizados podem explicar estas discrepâncias. Todavia, os resultados deste ensaio apresentaram taxas de germinação superiores a 72 % em todos os genótipos quando expostas à luz num período de 30 dias de incubação. Estes resultados são corroborados

DISCUSSÃO

por (Neto *et al.*, 2015), que verificaram que sementes obtidas de frutas frescas apresentam maior taxa de germinação quando expostas à luz. Além disso, (Neto *et al.*, 2015) e (Torres-González, 2019), afirmam que as sementes de tamarilho apresentam dormência fisiológica, isto é, na presença de fatores inibidores ou ausência de promotores, impedem que ocorra a germinação, o que pode ser quebrado com sucesso expondo as sementes à luz.

4.2 Indução de calo

Vários fatores condicionam e afetam a indução de calo: o meio de cultura; o tipo de explante; o genótipo da planta dadora e as condições de cultura são parâmetros a ter em consideração (Thorpe and Stasolla, 2001). A composição do meio de cultura é considerada um dos fatores mais importantes. A composição varia de espécie para espécie e, mesmo dentro de uma espécie, de acordo com o explante (parte da planta) em que a indução irá ser feita. São vários os elementos constituintes do meio que se podem fazer variar quer qualitativa quer quantitativamente. A composição hormonal e os hidratos de carbono são dos parâmetros mais relevantes. A auxina mais utilizada para obtenção de calo no tamarilho é o 2,4-D, daí que se tenha selecionado para os nossos ensaios. Os hidratos de carbono principalmente a sacarose, têm-se revelado, em algumas espécies, como potenciadora da resposta embriogénica (Canhoto, 2010).

Neste estudo não foi possível determinar se o calo induzido era embriogénico, uma vez que requeria mais ensaios teste, e não fazia parte dos objetivos do projeto. Poder-se-ia ter também testado uma combinação de auxina e citocinina, embora esta última, por norma, afetem a capacidade embriogénica (Corredoira *et al.*, 2019).

Os resultados obtidos mostraram que a medula de tamarilho é um tecido com potencial para obtenção de calo e futuros ensaios de morfogénese. No entanto, as condições necessitam de ser otimizadas, para que possa ser possível manipular este tecido como se faz noutras solanáceas, como por exemplo, na medula da planta do tabaco (Canhoto, 2010).

4.3 Identificação de bactérias endófitas

Os microrganismos podem colonizar diferentes partes das plantas e prosperar nas superfícies externas, bem como no interior dos órgãos vegetais. Neste estudo, explorámos o microbioma *in vivo* e *in vitro* de explantes de tamarilho de três árvores diferentes. Os três diferentes meios utilizados mostraram-se eficientes para o isolamento das bactérias endófitas de tamarilho. Todavia, o meio ABM2 mostrou ser o mais eficaz quanto ao número de isolados à semelhança do verificado por, Tiago *et al.* (2004). O maior número de isolados foi obtido com pH 7, o que indica que a maioria das bactérias endófitas isoladas neste estudo são neutrófilas, o que seria esperado tendo em conta que a maioria das bactérias cresce melhor num pH entre 6,5 e 7,0, isto é, em condições neutras. Este é também um valor de pH que se assemelha ao valor do pH intercelular nos tecidos vegetais (Taiz, 2017).

A diferença de géneros bacterianos entre perfis RAPD de material vegetal *in vivo* apresenta uma maior heterogeneidade do que em material *in vitro*, como seria de esperar. Além disso, o número de perfis RAPD únicos também é superior em explantes *in vivo*. Estes resultados eram esperados, uma vez, que o ambiente circundante a que este material vegetal *in vivo* esteve exposto, contribuiu para uma diversidade de géneros bacterianos serem transmitidos às plantas. De certo modo, estes resultados obtidos, vão ao encontro dos resultados apresentados por Martins *et al.* (2021), em medronheiro. As diferenças de géneros bacterianos entre o material vegetal *in vitro* e *in vivo* é apresentada por, Wassermann *et al.* (2019), ao explicar que um ambiente circundante é uma importante fonte de microrganismos que podem ser transmitidos horizontalmente às plantas, por diferentes vias de entrada, e desta forma fazerem parte do microbioma interno da planta. Além disso, o microbioma vegetal também pode ser transmitido verticalmente por sementes ou pela propagação de outro tipo de material vegetal. Estes microrganismos transmitidos por sementes são de grande interesse para investigadores porque podem ser transmitidos verticalmente à geração seguinte, conferindo vantagens no crescimento das plântulas.

No processo de micropropagação de plantas, espera-se a ausência de microrganismos, pois são garantidas todas as condições de assepsia durante o processo.

DISCUSSÃO

No entanto, os resultados mostraram que mesmo em condições controladas, os microrganismos podem estar presentes. Porém, como o estabelecimento do material vegetal *in vitro* foi realizado em condições controladas, não houve interação com uma comunidade microbiana complexa como ocorre em condições naturais numa planta em contacto com o solo (Nadal *et al.*, 2022). Esta situação pode explicar baixa diversidade de géneros encontrados nos genótipos estudados no ensaio de cultura de bactérias a partir de material vegetal *in vitro*.

Neste trabalho foram identificados 22 géneros bacterianos (*Acerihabitans*, *Aquimarina*, *Arenivirga*, *Arthrobacter*, *Aureimonas*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Brevundimonas*, *Cellulomonas*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Frigoribacterium*, *Kineococcus*, *Kocuria*, *Marmoricola*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Paracoccus*, *Rhizobium*, *Staphylococcus*, *Sphingobacterium*, *Serinibacter*), contudo, *Arthrobacter*, *Frigoribacterium* e *Microbacterium* foram os géneros mais obtidos.

(Costa *et al.*, 2012) após isolar e identificar bactérias endófitas de folhas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), usando uma metodologia semelhante à realizada neste trabalho, mostrou que os géneros *Bacillus*, *Brevundimonas*, *Frigoribacterium*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Rhizobium*, *Sphingobacterium* e *Staphylococcus* foram encontrados em sementes e raízes de feijoeiro, mostrou também que estes géneros normalmente provém de isolados presentes na rizosfera ou de bactérias endófitas de plantas usadas na agricultura. Por fim, mostrou também que bactérias geralmente associadas a doenças foliares do feijoeiro pertencem ao género *Curtobacterium*. Este estudo pode ser corroborado por (Chase *et al.*, 2016) que analisou o género *Curtobacterium* em diferentes ecossistemas para perceber se este género é de facto um agente patogénico, concluiu que apesar de a literatura se focar em *Curtobacterium* como um patógeno, o estudo que realizou mostrou que este género é na verdade, um decompositor do material orgânico presente no solo, também desempenha a função de promotor de crescimento das plantas.

Arthrobacter é outro género bacteriano isolado neste trabalho, que segundo (Shimasaki *et al.*, 2021), mostrou que é um género bacteriano predominante na endosfera da planta do tabaco, isolado a partir das raízes. Melhora o crescimento de plantas sujeitas a condições de stress, sendo benéfico para um agroecossistema e pode

ser explorado como uma boa ferramenta para uma agricultura sustentável (Roy and Kumar, 2020).

DISCUSSÃO

5 Conclusões e perspectivas futuras



CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

O tamarilho é uma espécie com potencial para se tornar um sucesso comercial no nosso país e economicamente muito interessante, desta forma, torna-se importante otimizar a produção desta espécie fruteira, tanto em termos quantitativos como qualitativos. Vários estudos têm sido realizados do ponto de vista taxonómico e sistemático, no entanto, poucos foram realizados quando se trata da diversidade microbiológica. Este estudo é o primeiro passo para perceber o microbioma envolvente no tamarilho, nomeadamente as bactérias endófitas que contém e o papel que estas desempenham em prol da planta, isto é, se são benéficas, patogénicas ou indiferentes.

O conjunto de resultados obtidos permitiu estabelecer o paralelismo entre isolados de bactérias de material vegetal das três árvores de tamarilho (vermelho, amarelo e laranja) presentes no Jardim Botânico da Universidade de Coimbra, quer seja *in vitro* ou *in vivo*.

Este projeto tinha como principal objetivo isolar e identificar bactérias endófitas de material vegetal *in vivo* e *in vitro* de três árvores de tamarilho, porém, foi parcialmente alcançado. Os endófitos de tamarilho foram extraídos e isolados com sucesso, através da técnica RAPD-PCR *fingerprint* foi avaliada a diversidade genética dos isolados bacterianos. Foram comparados com sequências de nucleótidos de outras espécies de bactérias por similaridade, através da base de dados EzBioCloud, o que permitiu ter uma identificação preliminar dos géneros bacterianos isolados. No entanto, não foi possível extrair endófitos a partir de calo induzido de medula de tamarilho, uma vez que não ocorreu crescimento de colónias de bactérias após estabelecimento deste material.

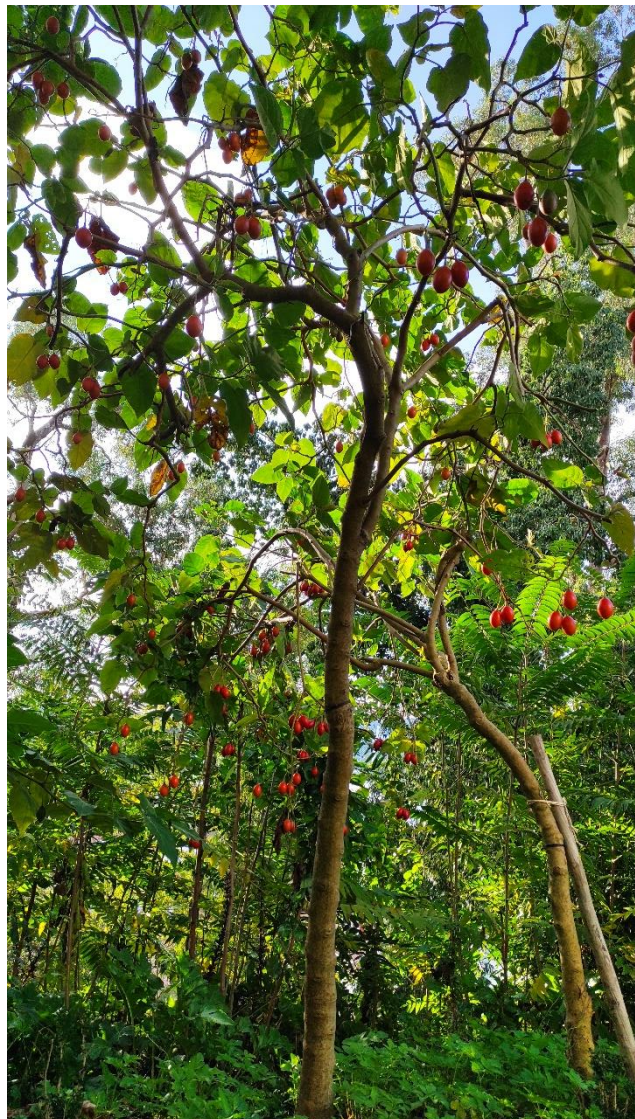
Numa perspetiva futura, o passo seguinte seria confirmar a identificação dos isolados obtidos, recorrendo ao gene 16S rRNA para obter a sequência completa usando os primers 357F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') (Turner *et al.*, 1999) e 803F (5'-ATTAGATACCCTGGTAGTC-3') (Muyzer *et al.*, 1993). As sequências completas teriam de ser novamente comparadas com os dados disponíveis na base de dados EzBioCloud e ser feita a reconstrução filogenética com as sequências de rRNA 16S obtidas dos isolados representativos, juntamente com as sequências mais semelhantes da base de dados EzBioCloud.

CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Também realizar testes bioquímicos para perceber as interações destas bactérias endófitas com o metabolismo da planta, através de ensaios de antagonismo. Como exemplos desses ensaios: testar a produção de sideróforos, solubilização de fosfatos, produção de amónia e de ácido indol-3-acético (IAA).

A comparação com material vegetal de tamarilho provenientes de outros solos e climas também seria interessante, de modo a perspetivar se em diferentes condições os géneros das bactérias endófitas variam muito mediante os obtidos neste projeto, assim como perceber se as diferentes estações do ano têm impacto na estrutura populacional bacteriana.

6 Referências



REFERÊNCIAS

- Acosta-Quezada, P.G., Raigón, M.D., Riofrío-Cuenca, T., García-Martínez, M.D., Plazas, M., Burneo, J.I., Figueroa, J.G., Vilanova, S., Prohens, J. (2015) Diversity for chemical composition in a collection of different varietal types of tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.), Andean exotic fruit. *Food Chemistry*, 169:327–335. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2014.07.152.
- Acosta-Quezada, P.G., Martínez-Laborde, J.B., Prohens, J. (2011) Variation among tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.) accessions from different cultivar groups: Implications for conservation of genetic resources and breeding. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 58:943–960. doi:10.1007/s10722-010-9634-9.
- Afzal, I., Shinwari, Z.K., Sikandar, S., Shahzad, S. (2019) Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological Research*, 221:36–49. doi:10.1016/j.micres.2019.02.001.
- Al, B. (2014) The source-synthesis - History and use of atropine. *Journal of Academic Emergency Medicine*, 13:2–3. doi:10.5152/jaem.2014.1120141.
- Andreote, F.D., Gumiére, T., Durrer, A. (2014) Exploring interactions of plant microbiomes. *Scientia Agricola*, 71:528–539. doi:10.1590/0103-9016-2014-0195.
- Arora, N.K. (2019) Impact of climate change on agriculture production and its sustainable solutions. *Environmental Sustainability*, 2:95–96. doi:10.1007/s42398-019-00078-w.
- Basumatary, B., Das, D., Choudhury, B.N., Dutta, P., Bhattacharyya, A. (2021) Isolation and characterization of endophytic bacteria from tomato foliage and their in vitro efficacy against root-knot nematodes. *Journal of nematology*, 53:2021–104. doi:10.21307/jofnem-2021-104.
- Bazenga, A. (2021) O conhecimento do solo em evolução : microbioma, novo paradigma. *AgroB Business School EV*. Retrieved from www.espaco-visual.pt/agrob
- Benton, T.G., Bieg, C., Harwatt, H., Pudasaini, R., Wellesley, L. (2021) Food system impacts on biodiversity loss Three levers for food system transformation in support of nature. Chatham house. Retrieved from <https://www.chathamhouse.org/2021/02/food-system-impacts-biodiversity-loss>
- Bohs, L. (1989) Ethnobotany of the Genus *Cyphomandra* (Solanaceae). *Economic Botany* 43: 143–163.

REFERÊNCIAS

- Canhoto, J.M. (2010) Biotecnologia Vegetal da Clonagem de Plantas à Transformação Genética. Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra Available at: https://digitalis.uc.pt/files/previews/83606_preview.pdf.
- Canhoto, J.M., Lopes, M.L. and Cruz, G.S. (2005) Protocol for somatic embryogenesis: tamarillo (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.). In: S.M. Jain, P.K. Gupta (Eds.) Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody plants, Dordrecht, Springer, pp. 379–389.
- Chase, A.B., Arevalo, P., Polz, M.F., Berlemont, R., Martiny, J.B.H (2016) Evidence for Ecological Flexibility in the Cosmopolitan Genus *Curtobacterium*. *Frontiers in Microbiology* / 7: 1874. doi:10.3389/fmicb.2016.01874.
- Chen, X., Fedrizzi, B., Kilmartin, P., Quek, S. (2021) Development of volatile organic compounds and their glycosylated precursors in tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) during fruit ripening: A prediction of biochemical pathway. *Food Chemistry*, 339:128046. doi:10.1016/j.foodchem.2020.128046.
- Chen, X., Kilmartin, P., Fedrizzi, B., Quek, S. (2021) Elucidation of endogenous aroma compounds in Tamarillo (*Solanum betaceum*) using a molecular sensory approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69:362–9375. doi:10.1021/ACS.JAFC.1C03027.
- Corredoira, E., Merkle, S.A., Martínez, M.T., Toribio, M., Canhoto, J.M., Correia, S.I., Ballester, A., Vieitez, A.M. (2019) Non-Zygotic embryogenesis in hardwood species. *Critical reviews in plant sciences*, 38:29-97 doi:10.1080/07352689.2018.1551122.
- Correia, S. (2011) Somatic embryogenesis in *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt (tamarillo): optimization and molecular analysis. Tese de doutoramento, Universidade de Coimbra.
- Correia, S., Lopes, M.L. and Canhoto, J.M. (2011) Somatic embryogenesis induction system for cloning an adult *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (tamarillo). *Trees - Structure and Function*, 25:1009–1020. doi:10.1007/S00468-011-0575-5.
- Correia, S.I. and Canhoto, J.M. (2012) Biotechnology of tamarillo (*Cyphomandra betacea*): From in vitro cloning to genetic transformation. *Scientia Horticulturae*, 148:161–168. doi:10.1016/J.SCIENTA.2012.09.037.
- Correia, S.I., Lopes, M.L. and Canhoto, J.M. (2009) Somatic embryogenesis in tamarillo (*Cyphomandra betacea*): Recent advances. *Acta Horticulturae*, 839:157–164. doi:10.17660/ActaHortic.2009.839.18.

- Costa, L.E.D.O., Queiroz, M.V, Borges, A.C., Moraes, C.A., Araújo, E.F. (2012) Isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from the leaves of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). Brazilian Journal of Microbiology, 43:1562–1575.
- Costa, J.; Tiago, I.; Da Costa, MS; Veríssimo, A. (2005) Presença e persistência de *Legionella* spp. em águas subterrâneas. Aplic. Ambiente. Microbiol, 71:663-671.
- Diep, T.T., Rush, E.C. and Yoo, M.J.Y. (2020) Tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.): A Review of Physicochemical and Bioactive Properties and Potential Applications. Food Reviews International, 38:1343–1367. doi:10.1080/87559129.2020.1804931.
- Feicán, C., Encalada, C. and Becerril, A. (2016) Descripción agronómica del cultivo de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.). Agroproductividad, 9:78–86.
- Ferreira, A., Quecine, A.F., Lacava, P.T., Oda, S., Azevedo, J.L., Araújo, W.L. (2008) Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. FEMS Microbiol Lett, 287:8–14. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01258.x.
- Guimarães, M.L., Tomé, M.C. and Cruz, G.S. (1996) *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn. (tamarillo). In: Y.P.S. Bajaj (Ed.). Trees IV. Biotechnology in agriculture and forestry. Springer - Trees IV, pp. 120–137. doi:10.1007/978-3-662-10617-4_7.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. (2018) MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution, 35:1547–1549. doi:10.1093/molbev/msy096.
- Lewis, D.H., Considine, J.A. (1999) Pollination and fruit set in the tamarillo (*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt.). New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 27:101–112. doi:10.1080/01140671.1999.9514086.
- Liu, H., Carvalhais, L.C., Crawford, M., Singh, E., Dennis, P.G., Pieterse, C.M.J., Schenk, P.M. (2017) Inner plant values: Diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria. Frontiers in Microbiology, 8:1–17. doi:10.3389/fmicb.2017.02552.
- Liu, H., Brettell, L.E., Qui, Z., Singh, B.K. (2020). Microbiome mediated stress resistance in plants. Trends in plant science, 28:733-743. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.03.014>
- Maciel, K.S., Lima, P.A.M., Madalon, F.Z., Moraes, S.P.C.B., Cabanez, P.A., Fávaris, N.A.B., Freitas, A.R., Carvajal, N.V., Alexandre, R.S., Lopes, J.C. (2018) Characterization of Fruits in Contrasting Environments and Germination of Tamarillo Seeds at Different

REFERÊNCIAS

- Temperatures. American Journal of Plant Sciences, 09:23–33. doi:10.4236/ajps.2018.91003.
- Martins, J., Ares, A., Casais, V., Costa, J., Canhoto, J. (2021) Identification and Characterization of *Arbutus unedo* L. Endophytic Bacteria Isolated from Wild and Cultivated Trees for the Biological Control of *Phytophthora cinnamomi*. Plants, 10:1569 doi:10.3390/plants10081569.
- Mavi, K., Uzunoğlu, F. (2020) Effects of pre-sowing treatments with allelopathic plant extracts on tree tomato (*Solanum betaceum* cav.) seedling emergence and performance. Agronomia Colombiana, 38:190–196. doi:10.15446/agron.colomb.v38n2.84373.
- Morton, J.F. (1987). Tree tomato. In: JF Morton (Ed.), Fruits of Warm Climates, Miami, FL, pp. 437–440.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology, 15:473–497.
- Murillo-Gómez, P.A., Hoyos S., R., Chavarriaga, P. (2017) Organogénesis *in vitro* using three tissues types of tree tomato (*Solanum betaceum* (Cav.)). Agronomía Colombiana, 35:5–11. doi:10.15446/AGRON.COLOMB.V35N1.61330.
- Muyzer, G.; De Waal, EC; Uitterlinden, AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl Environ Microbiol, 59: 695–700.
- Nadal, M.C., Ferreira, G.M.R., Andrade, G.V.S., Buttrós, V.H., Rodrigues, F.A., Silva, C.M., Martins, A.D., Rufato, L., Luz, J.M.Q., Dória, J., Pasqual, M.(2022) Endophytic Bacteria Can Replace the Need for Synthetic Auxin during In Vitro Rooting of *Pyrus communis*. Agronomy, 12:1226. doi:10.3390/agronomy12051226.
- Nawangsih, A.A., Damayanti, I., Wiyono, S., Kartika, J.G. (2011) Selection and Characterization of Endophytic Bacteria as Biocontrol Agents of Tomato Bacterial Wilt Disease. HAYATI Journal of Biosciences, 18:66–70. doi:10.4308/hjb.18.2.66.
- Neto, C.K., Fabiane, K.C., Radaelli, J.C., Júnior, A.W., Moura, G.C. (2015) Métodos para superação de dormência em sementes de tomateiro arbóreo (*Solanum betaceum*). Pesquisa Agropecuária Tropical, 45:420–425. doi:10.1590/1983-40632015v4537332.
- Patel, J. (2001) 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. Molecular Diagnosis, 6:313–321. doi:10.1054/modi.2001.29158.

- Pinski, A., Betekhtin, A., Hupert-Kocurel, K., Mur, L.A.J., Hasterok, R. (2019) Defining the genetic basis of plant–endophytic bacteria interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, 20:1947. doi:10.3390/ijms20081947.
- Portugal Foods (2019) Estratégia de Internacionalização do Setor Agroalimentar 2019-2021. Retrieved from: http://www.gpp.pt/images/gam/estrategias/EstrategiaIntAA_FIPA.pdf.
- Pringle, G.J., Murray, B.G. (1991) Reproductive biology of the tamarillo, *Cyphomandra betacea* (Cav.) sendt. (solanaceae), and some wild relatives. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 19:263–273. doi:10.1080/01140671.1991.10421810.
- Rainey, F.A., Ward-Rainey, N., Kroppenstedt, R.M., Stackebrandt, E. (1996) The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: Proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46:1088–1092. doi:10.1099/00207713-46-4-1088.
- Ramírez, F. and Kallarackal, J. (2019) Tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.) reproductive physiology: A review. *Scientia Horticulturae*, 248:206–215. doi:10.1016/J.SCIENTA.2019.01.019.
- Reasoner, D.J., Geldreich, E.E. (1985) A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology*, 49:1-7.
- Rodríguez, P.A., Rothballer, M., Chowdhury, S.P., Nussbaumer, T., Gutjahr, C., Falter-Braun, P. (2019) Systems Biology of Plant-Microbiome Interactions. *Molecular Plant*, 12:804–821. doi:10.1016/j.molp.2019.05.006.
- Roy, P. and Kumar, A. (2020) *Arthrobacter*. *Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi*. Academic press, pp. 3–11. doi:10.1016/B978-0-12-823414-3.00001-0.
- Salgado-Pirata, M. (2020) Germinative characteristics of tamarillo seeds (*Solanum betaceum* Cav.) from red and orange fruits. *Revista de ciências agrárias*, 43:276–282. <https://doi.org/10.19084/rca.20591>
- Schotsmans, W.C., East, A. and Woolf, A. (2011) Tamarillo (*Solanum betaceum* (Cav.)). In: Yahia, E. (Ed.), *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical fruits*. Woodhead Publishing, Oxford, pp. 427-441. doi:10.1533/9780857092618.427.
- Shimasaki, T., Masuda, S., Garrido-Oter, R., Kawasaki, T., Aoki, Y., Shibata, A., Suda, W., Shirasu, K., Yazaki, K., Nakano, R.T., Sugiyama, A. (2021) Tobacco root endophytic *arthrobacter* harbors genomic features enabling the catabolism of host-specific plant specialized

REFERÊNCIAS

- metabolites. *mBio*, 12. doi:10.1128/MBIO.00846-21/SUPPL_FILE/MBIO.00846-21-SF006.PDF.
- Sinaga, M.D., Riza, B.S., Lazuly, I., Daifiria, Victor H., E. (2018) A Forward Chaining Trace Analysis In Diagnosing Tamarillo Disease. The 6th International Conference on Cyber and IT Service Management (CITSM), pp. 1–4. doi:10.1109/CITSM.2018.8674292.
- Singh, M., Kumar, A., Singh, R., Pandey, K.D. (2017) Endophytic bacteria: a new source of bioactive compounds. *3 Biotech*, 7:315. doi:10.1007/s13205-017-0942-z.
- Srinivasan, R., Karaoz, U., Volegova, M., MacKichan, J., Kato-Maeda, M., Miller, S., Nadarajan, R., Brodie, E.L., Lynch, S.V. (2015) Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens. *PLoS ONE*, 10. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0117617.
- Taiz L., Zeiger E., Møller I. M., Murphy A. (2015) *Plant physiology and development*. 6 th Edition, Sunderland, MA: Sinauer Associates, pp. 67-86.
- Thompson, J.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. Clustal W. (1994) Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673–4680.
- Tiago, I., Chung, A.P. and Veríssimo, A. (2004) Bacterial Diversity in a Nonsaline Alkaline Environment: Heterotrophic Aerobic Populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:7378. doi:10.1128/AEM.70.12.7378-7387.2004.
- Toju, H., Okayasu, K. and Notaguchi, M. (2019) Leaf-associated microbiomes of grafted tomato plants. *Scientific Reports*, 9:1787. doi:10.1038/s41598-018-38344-2.
- Torres-González, A.M. (2019) Seed dormancy and germination in tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.) and lulo (*Solanum quitoense* Lam.). *Revista Colombiana de Ciências Hortícolas*, 13:336–347. doi:10.17584/rcch.2019v13i3.10130.
- Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P.W., Palmer, J.D. (1999) Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J. Eukaryot. Microbiol*, 46:327–338.
- UNICEF (2021). The State of Food Security and Nutrition in the World (SOFI). Retrieved from <https://data.unicef.org/resources/sofi-2021/>

- Vargas, B.D., Basso, A., Rodrigues, T.V., Silva, L.B., Gatzke, M., Frizzo, M.N. (2018) Biotecnologia E Alimentos Geneticamente Modificados: Uma Revisão. *Revista Contexto & Saúde*, 18:19–26. doi:10.21527/2176-7114.2018.35.19-26.
- Wang, S., Zhu, F. (2020) Tamarillo (*Solanum betaceum*): Chemical composition, biological properties, and product innovation. *Trends in Food Science and Technology*, 95:45–58. doi:10.1016/j.tifs.2019.11.004.
- Wassermann, B., Müller, H., Berg, G. (2019) An Apple a Day: Which Bacteria Do We Eat With Organic and Conventional Apples?. *Frontiers in Microbiology*, 10:1629. doi:10.3389/fmicb.2019.01629.
- Wiedmann-Al-Ahmad, M., Tichy, H. V., Schon, G. (1994) Characterization of *Acinetobacter* type strains and isolates obtained from wastewater treatment plants by PCR *fingerprinting*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60:4066–4071. doi:10.1128/aem.60.11.4066-4071.1994.
- De Wrachien, D., Schultz, B., Goli, M.B. (2021) Impacts of population growth and climate change on food production and irrigation and drainage needs: A world-wide view. *Irrigation and Drainage*, 70:981–995. doi:10.1002/ird.2597.
- Yang, R., Liu, P., Ye, W. (2017) Environmental Microbiology Illumina-based analysis of endophytic bacterial diversity of tree peony (*Paeonia* Sect. Moutan) roots and leaves. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48:695–705. doi:10.1016/j.bjm.2017.02.009.
- Yoon, S.H., Ha, S.M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., Chun, J. (2017) Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67:1613–1617. doi:10.1099/ijsem.0.001755.