

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

JOÃO VICTOR ARANTES NOBILE

CULTIVO *IN VITRO* DE ZEA MAYS PARA PESQUISA DE INOCULANTES

PONTA GROSSA

2025

versão 11.0 (abr.25)

JOÃO VICTOR ARANTES NOBILE

CULTIVO *IN VITRO* DE *ZEA MAYS* PARA PESQUISA DE INOCULANTES

***In vitro* cultivation of *Zea mays* for inoculants research**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Juliana Vitória Messias Bittencourt.

PONTA GROSSA

2025



Esta licença permite compartilhamento, remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es). Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

JOÃO VICTOR ARANTES NOBILE

CULTIVO *IN VITRO* DE ZEA MAYS PARA PESQUISA DE INOCULANTES

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 29 de outubro de 2025

Juliana Vitória Messias Bittencourt
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Anabel Aparecida Oliaski
Mestrado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Suelen Ávila Berthier
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

PONTA GROSSA
2025

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo de cultivo *in vitro* de *Zea mays* (milho) com inoculação das rizobactérias *Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens*. Para isso, desenvolveu-se e padronizou-se um protocolo de assepsia de sementes, utilizando hipoclorito de sódio a 5% por 15 minutos, que garantiu a eliminação de contaminantes sem prejudicar a viabilidade germinativa. Avaliaram-se diferentes recipientes para o cultivo, constatando-se que frasco de vidro de 500 ml proporcionaram germinação mais rápida e eficiente em comparação com tubos de ensaio. Foi projetado e testado com sucesso um protótipo de baixo custo para aclimatização das plântulas, facilitando a transição do ambiente *in vitro* para condições externas. A validação microbiológica dos inoculantes confirmou a qualidade dos produtos, com crescimento vigoroso e sem contaminação nos meios específicos NFb e King B. Adicionalmente, a recuperação de células demonstrou a eficácia da fixação das bactérias nas sementes. Concluiu-se que o protocolo estabelecido é viável e eficaz, fornecendo uma base sólida para futuras pesquisas sobre os efeitos promotores de crescimento dessas rizobactérias no milho, contribuindo para o avanço de biotecnologias aplicadas a uma agricultura mais sustentável.

Palavras-chave: milho; cultivo *in vitro*; inoculantes.

ABSTRACT

This study aimed to establish an *in vitro* cultivation protocol for *Zea mays* (corn) inoculated with the rhizobacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*. A seed asepsis protocol was developed and standardized, using 5% sodium hypochlorite for 15 minutes, which ensured the elimination of contaminants without compromising germination viability. Different cultivation containers were evaluated, with palm heart pots proving to provide faster and more efficient germination compared to test tubes. A low-cost prototype for seedling acclimatization was successfully designed and tested, facilitating the transition from the *in vitro* environment to external conditions. Microbiological validation of the inoculants confirmed product quality, with vigorous growth and no contamination on the specific NFb and King B media. Additionally, cell recovery demonstrated the effective fixation of the bacteria on the seeds. It was concluded that the established protocol is viable and effective, providing a solid foundation for future research on the growth-promoting effects of these rhizobacteria on corn, contributing to the advancement of biotechnologies applied to more sustainable agriculture.

Keywords: corn; *in vitro* cultivation; inoculants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Composição do meio MS.....	7
Quadro 2 - Composição do meio NFB.....	10
Quadro 3 - Composição do meio king B.....	10
Fotografia 1 – Inoculação em frasco de vidro de 500 ml e tubo de ensaio.....	13
Fotografia 2 – Protótipo rudimentar.....	14
Fotografia 3 – Validação dos produtos.....	14
Fotografia 4 – Recuperação de células.....	15

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVO.....	2
2.1	Objetivos específicos.....	3
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
3.1	<i>Azospirillum brasilense</i> e seus benefícios à agricultura.....	3
3.2	<i>Pseudomonas fluorescens</i> e seus benefícios à agricultura.....	4
3.3	Importância da seleção do meio de cultura.....	5
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	6
4.1	Protocolo para assepsia de sementes e tratamento com <i>Azospirillum brasilense</i> e <i>Pseudomonas fluorescens</i>	6
4.2	Meio de cultura para a germinação de sementes.....	6
4.3	Tratamento <i>in vitro</i>	8
4.4	Meio de cultura para validação de <i>Azospirillum brasilense</i> e <i>Pseudomonas fluorescens</i>	8
4.4.1	Meio NFb.....	8
4.4.2	Meio King B.....	9
4.5	Aclimatização das sementes germinadas <i>Zea mays</i>	10
5	RESULTADOS ESPERADOS.....	10
6	CONCLUSÃO.....	13
	REFERENCIAS.....	17

1 INTRODUÇÃO

Os inoculantes são insumos biológicos que contêm microrganismos benéficos, podendo ser bactérias, fungos e nematóides, auxiliando no melhor desenvolvimento das culturas. Mostram-se essenciais na absorção de nutrientes, indução da resistência sistêmica, produção de fitormônios, fixação de nitrogênio, entre outros. Esses inoculantes podem ser utilizados nas plantas ou diretamente no solo.

A agricultura tradicional enfrenta diversos desafios, como a escassez de recursos naturais, as mudanças climáticas, a alta demanda de produção e a complexa interação entre o solo e o tempo necessário para o desenvolvimento das plantas. Nesse contexto, o cultivo *in vitro* de tecidos vegetais surge como uma ferramenta estratégica, permitindo o controle preciso de variáveis ambientais e possibilitando a análise de seus efeitos diretos no crescimento vegetal. Essa abordagem não apenas acelera o processo de observação e aprimoramento de técnicas, como também oferece dados valiosos que podem ser aplicados para otimizar práticas na agricultura tradicional (Embrapa, 2006).

O *Azospirillum brasilense* e a *Pseudomonas fluorescens* são exemplos de inoculantes e foram testados neste projeto no cultivo *in vitro* de milho. O *Azospirillum brasilense* é uma rizobactéria endofítica gram-negativa, que estimula a síntese de fitohormônios nas plantas, auxilia na fixação de nitrogênio e na solubilização de nutrientes. As *Pseudomonas fluorescens* são rizobactérias gram-negativas que incrementam o teor de fósforo e potássio, além de demonstrar um potencial em favorecer o teor nutritivo dos grãos, reduzindo as necessidades de adubação (Franchi, 2022).

O meio de cultura NFb é um meio semi seletivo, utilizado no isolamento e cultivo de *Azospirillum brasilense*. Este fornece os nutrientes necessários para o favorecimento do crescimento desta bactéria (Embrapa, [s.d.], 1999). Já o meio de cultura King B (KB) é um meio de cultura seletivo, usado para o isolamento e cultivo de *Pseudomonas fluorescens*. Ele fornece nutrientes específicos que favorecem o crescimento dessa espécie, inibindo o crescimento de outras bactérias.

O cultivo *in vitro* possibilita um ambiente controlado, exatamente de acordo com a necessidade de cada planta, ou seja, amplia as possibilidades de testar variáveis e saber diretamente seu impacto e quais as mudanças obtidas. No cultivo *in vitro* temos algumas variáveis que podem ser controladas e que garantem benefícios

a este método, são elas: o meio de cultura ou substrato, pH, temperatura, luz, umidade, ventilação e esterilização. O meio Murashige e Skoog (MS) é amplamente utilizado em laboratórios para o cultivo vegetal in vitro, ele é composto por macronutrientes, micronutrientes e vitaminas, sendo modificado de acordo com a necessidade de cada planta (Pacheco Lombardi-Crestana *et al.*, [s.d.], 2010).

2 OBJETIVO

Estabelecer um protocolo de cultivo *in vitro* de *Zea mays* (milho) com inoculação de *Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens*.

2.1 Objetivos específicos

- Estabelecer e adequar um protocolo de assepsia da semente de milho garantindo eliminação completa de contaminantes e mantendo a viabilidade germinativa;
- Escolher do melhor recipiente para o cultivo *in vitro*;
- Desenvolver e testar um protótipo para a aclimatização das plântulas;
- Realizar a validação do produto fornecido pela a empresa, para garantia da qualidade do produto fornecido;
- Aplicar técnicas de recuperação de células visando garantir a fixação do produto na semente.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Azospirillum brasilense* e seus benefícios à agricultura

O gênero *Azospirillum* é composto por rizobactérias endofíticas gram-negativas e de vida livre, reconhecido na década de 1970, que inclui as espécies *Azospirillum lipoferum* e *Azospirillum brasilense*, além de mais de 20 outras já descritas. Essas bactérias colonizam diversas partes das plantas, especialmente raízes de gramíneas como cana-de-açúcar, milho, arroz e trigo. O prefixo “azo” está relacionado à nitrogênio, e a relação entre essas bactérias e o nitrogênio foi descoberta pela Dra. Johanna Döbereiner, que evidenciou a capacidade de fixação biológica do nitrogênio (FBN) como um importante benefício agrícola.

No Brasil, a utilização de *Azospirillum brasilense* leva a redução de custos com nitrogênio, com estimativas de economia de cerca de US\$ 2 bilhões anuais (Velo, [s.d.],2023). Essa espécie converte nitrogênio atmosférico (N_2) em formas assimiláveis pelas plantas (NH_3), promovendo crescimento em diversas culturas. Pesquisas demonstraram que a inoculação com *Azospirillum brasilense*, em associação à adubação nitrogenada, pode aumentar significativamente a produção e o crescimento de culturas como a cana-de-açúcar.

Além da fixação de nitrogênio, o *Azospirillum brasilense* também promove o crescimento das plantas por meio de estímulos para a produção de hormônios vegetais, como ácido indol-acético, giberelinas e citocininas, que aumentam a densidade radicular e melhoram a absorção de água e nutrientes. Isso resulta em maior vigor e tolerância ao estresse, como salinidade e seca (Tien. 1979).

Outro benefício observado é a indução da produção do terpeno, β -cariofileno, um composto que ajuda a melhorar a resistência das plantas ao ataque de pragas, como a larva-alfinete. Essa interação entre microrganismos do solo e plantas tem se tornado essencial no manejo integrado de pragas, destacando a importância dos microrganismos na agricultura moderna (Santos, 2014).

3.2 *Pseudomonas fluorescens* e seus benefícios à agricultura

As bactérias do gênero *Pseudomonas* geralmente estão associadas a doenças infectocontagiosas, mas algumas espécies desempenham um papel importante na promoção do desenvolvimento de plantas cultivadas. Pesquisadores identificaram que espécies de *Pseudomonas* podem ser utilizadas para criar novos

bioprodutos na agricultura, tanto como promotores de crescimento quanto direta ou indiretamente no controle de doenças (Franchi, 2022).

Com uma preocupação ambiental crescente, há uma necessidade urgente de práticas agrícolas mais sustentáveis. A agricultura convencional tem causado impactos negativos no solo e na água, o que torna essencial buscar métodos que promovam a produtividade de forma limpa e sustentável.

As *Pseudomonas* são consideradas rizobactérias que produzem metabólitos como auxinas, giberelinas e citocininas, que estão relacionadas ao crescimento das plantas. Além disso, essas bactérias podem sintetizar antibióticos, sideróforos e ácido hidrocianico, capazes de controlar patógenos e melhorar o desenvolvimento das raízes, alterando as propriedades do solo (Franchi, 2022).

Essas bactérias atuam como simbioses ao se estabelecerem nos tecidos vegetais, onde realizam trocas de substâncias benéficas com a planta hospedeira. Muitas delas são amplamente utilizadas na agricultura por sua capacidade de promover o crescimento vegetal ou auxiliar no controle indireto de doenças, contribuindo assim para o desenvolvimento saudável das culturas (Franchi, 2022).

No cultivo do milho, que é suscetível a fungos como *Fusarium*, estudos demonstraram que a associação com *Pseudomonas sp.* EM85 pode reduzir a ação dos patógenos, além de aumentar a germinação e o vigor das plantas. A inoculação de sementes de milho com *Pseudomonas* levou a um incremento na área foliar e no peso seco da parte aérea. Outro estudo com *Pseudomonas fluorescens* indicou um aumento nos teores de fósforo e potássio nos grãos de milho, indicando seu potencial para melhorar o valor nutritivo dos grãos e reduzir a necessidade de adubação (Franchi, 2022).

3.3 Importância do meio de cultura para o cultivo *in vitro*

Os meios de cultura têm como objetivo fornecer os nutrientes necessários para o crescimento *in vitro* das plantas, atendendo às exigências dos explantes. É fundamental que as substâncias químicas utilizadas sejam de alto grau de pureza, preferencialmente com qualidade analítica. O pH dos meios deve ser ajustado com ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (NaOH), geralmente corrigido para pH 5,7 \pm 0,1, embora essa exigência possa variar conforme o cultivo e a espécie.

O preparo do meio de cultura é uma etapa que exige bastante tempo, por isso é prático armazenar os componentes em soluções de estoque técnicas, seguindo

rigorosamente as concentrações indicadas nos meios de cultura MS, NFb e King B. Cada laboratório pode adotar um sistema específico para as concentrações, mas é importante ter cuidado com a mistura de sais, pois alguns não podem ser combinados e outros devem ser armazenados em solução pura para evitar reações ou precipitações. As soluções de estoque de sais devem ser armazenadas em frascos bem fechados em refrigeradores a 4-5°C, enquanto as soluções de estoque de vitaminas devem ser mantidas em pequenos frascos em temperaturas abaixo de zero (Pacheco Lombardi-Crestana *et al.*, [s.d.], 2010).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Protocolo para assepsia de sementes e tratamento com *Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens*

O protocolo adotado para a assepsia das sementes seguiu uma sequência padronizada de etapas. Inicialmente, as sementes foram imersas em álcool 95% por um período de um minuto. Em seguida, foram submetidas à imersão em solução de hipoclorito de sódio a 5% durante dois minutos. Após esses processos, as sementes foram enxaguadas cuidadosamente com água autoclavada, garantindo a remoção dos resíduos dos agentes desinfetantes. Diante desse protocolo inicial foi realizado testes em 20 frascos de vidro de 250 ml. A partir desse protocolo foi sendo adaptado o tempo de imersão e concentração, repetindo o experimento nos 20 frascos de 250 ml, até alcançar um padrão que garantia a eliminação dos contaminantes sem prejudicar a viabilidade da germinação das sementes.

4.2 Meio de cultura para germinação de sementes

Para a produção do meio Murashige e Skoog (MS), foram utilizadas as concentrações da tabela a seguir:

Quadro 1 – Composição do meio MS

MACRONUTRIENTES		MICRONUTRIENTES	
Composto	Concentração (g/L)	Composto	Concentração (g/L)
NH ₄ NO ₃	1,65	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,00025
KH ₂ PO ₄	0,17	H ₃ BO ₃	0,0062
KNO ₃	1,9	MnSO ₄ ·H ₂ O	0,0223
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,37	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,0086
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,44	NiSO ₄ ·6H ₂ O	0,000052
VITAMINAS		CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,000025
Ácido nicotínico	0,0005	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,000025
Glicina	0,002	KI	0,00083
Mio-inositol	0,1	Fe.EDTA	
Piridoxina HCl	0,0005	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,0278
Tiamina HCl	0,0001	Na ₂ EDTA	0,0372

Fonte: Criado a partir de dados do (Lei Huang, Chunhua Zhang, em Métodos em Biologia Celular, 2020)

Primeiramente foram pesadas, com auxílio de uma balança analítica, os componentes nas concentrações calculadas para produção de 1L de meio, em seguida todos os componentes foram colocados em um erlenmeyer de 1L e dissolvidos em 800 mL de água destilada.

Após a dissolução, com o auxílio da balança analítica, foram pesados 15 g de sacarose e 9 g de ágar, que foram adicionados no béquer e completados para 1L de meio.

Ao fim dessas etapas, foi realizado o ajuste do pH do meio para 5,7, com um pHmetro calibrado, o ajuste foi feito com as soluções de ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (NaOH).

Após a calibração do pH, foi realizado o processo de homogeneização do ágar até que o líquido ficasse translúcido com agitação e aquecimento contínuo na chapa de aquecimento. Quando o meio ficou translúcido, ele foi vertido em 6 frascos de vidro de 500 ml e tubos de ensaios e foi fechado.

Em seguida, todos os recipientes foram autoclavados a 120 °C por 20 minutos. Ao final desse processo, com o meio já em temperatura ambiente, foi armazenado todos os recipientes em geladeiras entre 2°C e 8°C, até o momento do seu devido uso.

4.3 Tratamento *in vitro*

Após o tratamento de assepsia das sementes, com a câmara de fluxo laminar ligada, foram realizadas as inoculações das sementes em 6 frascos de vidro de 500 ml e 6 tubos de ensaio contendo meio Murashige e Skoog (MS), em seguida os frascos foram fechados com papel alumínio e papel Craft, para criar uma micro ambiente estéril dentro dos frascos e tubos, e armazenados em estufas entre 24°C e 30°C, com iluminação apropriada (LEDs).

Os recipientes passaram por análises diárias e após a germinação das sementes, elas passaram para a etapa de aclimatização.

4.4 Meio de cultura para validação de *Azospirillum brasilense* e *Pseudomona fluorescen*

As amostras de inoculantes *Azospirillum brasilense* e *Pseudomona fluorescen*, foram fornecidas pela Agrocete Industria de Fertilizantes e testadas de acordo com as instruções do fabricante.

As rizobactérias *Azospirillum brasilense* e *Pseudomona fluorescen*, foram testadas em placas de petri com o meio NFb e king B, respectivamente, e em placas contendo o meio Murashige e Skoog (MS), utilizado para micropropagação de *Zea mays*, para validação do seu crescimento, foram utilizadas 3 placas para NFb, 3 para KingB e 6 para MS, sendo 3 para *Azospirillum brasilense* e 3 para *Pseudomona fluorescen*.

A amostra de inoculante *Azospirillum brasilense* e *Pseudomona fluorescen* foi testada utilizando uma alça estéril que foi submersa no produto e esfregada na placa de petri com o meio.

Após a inoculação, as placas foram para a incubadora a 30°C de 48h a 72h, no final desse período foi realizado a análise do crescimento da colônia e se era compatível com as colônias de seus respectivos microorganismos.

Esses processos foram realizados em triplicata buscando garantir um padrão ao experimento.

4.4.1 Meio NFb

O meio NFB foi feito utilizando os reagentes nas concentrações indicadas no Quadro 2.

Quadro 2 – Composição do meio NFb

Meio NFB (1 litro)	
Ácido Málico	5 g
Solução de Fosfato de Potássio Dibásico 10%	5 mL
Solução de Sulfato de Magnésio Heptahidratado 10%	2 mL
Solução de Cloreto de Sódio 10%	1 mL
Solução de Cloreto de Cálcio Dihidratado 1%	2 mL
Azul de Bromotimol 0,5% em 0,2N de KOH	2 mL
Solução de Micronutrientes para Meio de Cultura	2 mL
Solução de EDTA de Ferro 1,64%	4 mL
Solução de Vitamina para Meio de Cultura	1 mL
4,5 g de Hidróxido de Potássio 10%	4,5 g
Ágar	15 g
Extrato de levedura	50 mg

Fonte: Criado a partir de dados da Embrapa (2006)

Após a adição de todos os componentes o erlenmeyer foi completado com água destilada e foi feito o ajuste do pH para 6,5 com solução de KOH a 10% ou solução de H₂SO₄ a 5 %.

Após o ajuste do pH, foi realizado o processo de homogeneização do ágar até que o líquido ficasse translúcido com agitação e aquecimento contínuo na chapa de aquecimento. Quando o meio ficou translúcido, ele foi autoclavado a 120 °C por 20 minutos.

Em seguida, dentro de uma câmara de fluxo laminar, foi vertido 20 mL de meio em cada placa de petri, foram utilizadas 18 placas.

4.4.2 Meio King B

O meio NFB foi feito utilizando os reagentes nas concentrações indicadas no Quadro 2.

Quadro 3 – Composição do meio King B

meio King B	
Peptona proteose	20 g
Fosfato dipotássico hidrogênio	1,5 g
Sulfato de magnésio	1,5 g
glicerol	15 mL
Ágar	12 g

Fonte: Criado a partir dos dados de (M1544-500G)

Após a adição de todos os componentes, foi realizado o processo de homogeneização do ágar até que o líquido ficasse translúcido com agitação e aquecimento contínuo na chapa de aquecimento. Quando o meio ficou translúcido, ele foi autoclavado a 120 °C por 20 minutos.

Em seguida, dentro de uma câmara de fluxo laminar, foi vertido 20 mL de meio em cada placa de petri, foram utilizadas 18 placas.

4.5 Aclimatização das sementes germinadas de *Zea mays*

Após a germinação *in vitro*, foi realizado o processo de aclimatização. O ambiente foi executado em protótipo elaborado para melhorar a rustificação das plântulas obtidas.

O protótipo foi montado a partir de uma garrafa plástica transparente de 5 ou 10 litros, fita crepe, gaze e substrato isento de fertilizantes e adubo, esses materiais permitiram a troca gasosa e irrigação diária para a planta a qual tem contato direto com o substrato, encontrado na base do protótipo. A iluminação foi indireta para propiciar a rustificação das plântulas até a finalização da etapa.

Foi incubado uma planta por protótipo, elas permaneceram neste ambiente por mais ou menos 2 semanas para estarem aptas a serem transferidas para o meio externo.

5 RESULTADOS

Como resultado inicial que alcançamos foi o estabelecimento do protocolo de assepsia:

Onde foi alterado a concentrações somente do álcool 95% para 75% e alterado os tempos de permanência da semente em contato com os mesmos, os tempos adotados para o álcool 75% foi de dois minutos e para a solução de hipoclorito de sódio a 5% foi de quinze minutos.

Após o estabelecimento da primeira etapa, a pesquisa prosseguiu com a escolha do recipiente, na qual foram obtidos por dois resultados principais.

As sementes inoculadas nos frascos de vidro de 500 ml levam em média uma semana para germinar, enquanto as sementes inoculadas no tubo de ensaio levam em média 1 semana e meia, porém sendo possível uma melhor observação. As plântulas necessitavam de pelo menos 3 semana em cultivo in vitro para alcançarem um tamanho e uma boa estrutura para que pudessem passar para a etapa de aclimatização.

Verificou-se que o tubo de ensaio foi adequado para a observação das diferentes regiões da planta, permitindo maior clareza e nitidez. Por outro lado, o frasco de vidro de 500ml favoreceu o milho, promovendo uma germinação mais rápida e eficiente.

A germinação acelerada no frasco de vidro de 500 ml pode ser resultado da criação de um microclima ideal. O frasco, com seu maior volume de substrato, atua como um reservatório, garantindo:

Uniformidade de umidade, mantendo as sementes constantemente hidratadas.

E uma estabilidade térmica maior, reduzindo variações bruscas de temperatura.

Além disso, quando coberto, o pote funciona como uma miniestufa, elevando a umidade relativa do ar e conservando o calor, que são fatores cruciais para desencadear e sustentar o metabolismo germinativo. O frasco de vidro de 500 ml se configurou como a opção mais eficiente para a germinação, priorizando a velocidade de crescimento da planta.

Já a melhor visualização no tubo de ensaio é uma consequência direta de sua geometria cilíndrica e transparente oferecendo uma vista panorâmica e sem

obstruções do desenvolvimento, por mais que o tubo de ensaio acabe sacrificando um pouco a velocidade de crescimento, ele enriquece os detalhes na observação.

Esta configuração permitiu a observação do sistema radicular, incluindo o crescimento da raiz principal, o surgimento de raízes secundárias e os pelos absorventes, o que é fundamental para análises morfológicas.

Podemos observar os dois resultados na fotografia 1 logo a baixo.

Fotografia 1 – Inoculação em frascos de vidro de 500 ml e tubo de ensaio



Fonte: Autoria Própria (2024)

As sementes inoculadas nos frascos de vidro de 500 ml levam em média uma semana para germinar, enquanto as sementes inoculadas no tubo de ensaio levam em média 1 semana e meia. As plântulas necessitavam de pelo menos 3 semana em cultivo in vitro para alcançarem um tamanho e uma boa estrutura para que pudessem passar para a etapa de aclimatização.

Durante as pesquisas e testes, foi possível desenvolver um protótipo inicial com características funcionais. Esse protótipo foi confeccionado a partir de uma garrafa plástica de água (5 ou 10 litros), preferencialmente transparente, fita crepe, gaze e um substrato isento de adubo e fertilizante. A garrafa recebeu uma abertura para que a inserção do substrato e a plântula, sendo posteriormente vedada com fita crepe, de modo a evitar que o meio interno fosse exposto e na boca da garrafa foi acoplado a gaze de modo que as trocas gasosas com o meio externo seja controlada., como pode ser observado na fotografia 2. Foi constatado também nessa etapa que a abertura do protótipo tem que ser gradativa, para minimizar o estresse que pode ser

causado na planta, evitando que suas folhas queimem e até mesmo, dependendo do estresse, acabe matando a planta.

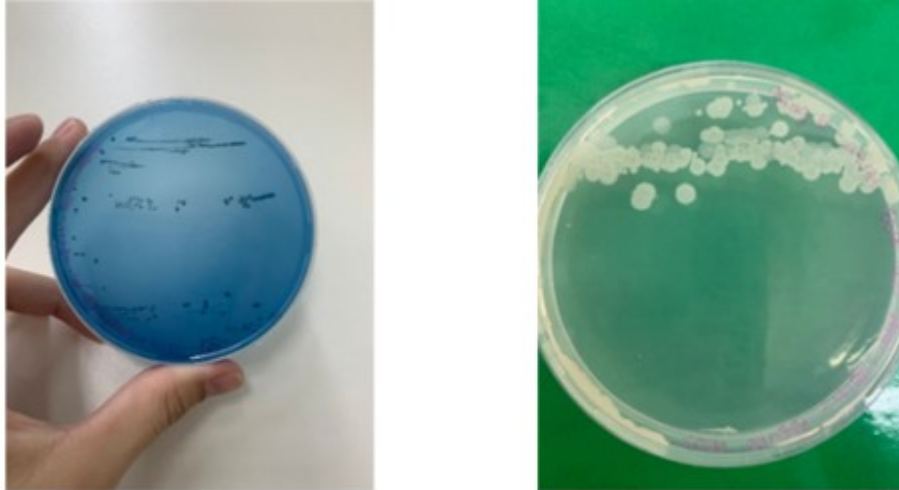
Fotografia 2 - Protótipo rudimentar



Fonte: Autoria própria (2024)

Ao final das pesquisas foi realizado a validação do produto fornecido pela empresa e obtendo um resultado positivo, pois tanto *Azospirillum brasilense* quanto a *Pseudomonas fluorescens* tiveram um bom crescimento nas placas de petri e não tiveram contaminação, observado na fotografia 3. Por fim foi definido o protocolo de recuperação de células, sendo o método de Recuperação de célula e quantificação de rizóbios em semente inoculadas para recuperação de rizobactérias (Penne et al., 2004), que trazia o resultado desejado ao nosso experimento, na fotografia 4 podemos observar o resultado.

Fotografia 3 - Validação dos produtos



Fonte: Aatoria Própria (2024)

A esquerda é a validação do produto contendo *Azospirillum brasilense* e *Pseudomona fluorescen*, e a direita do produto contendo apenas *Azospirillum brasilense*.

Fotografia 4 - Recuperação de células



Fonte: Aatoria Própria (2024)

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho atingiu seu objetivo principal de estabelecer um protocolo viável para o cultivo *in vitro* de *Zea mays*. Através da execução metodológica, foi possível definir um protocolo de assepsia eficaz, utilizando álcool 75% por 2 minutos e hipoclorito de sódio a 5% por 15 minutos, que garantiu a eliminação de contaminantes sem comprometer a viabilidade germinativa das sementes.

A avaliação dos recipientes indicou uma vantagem dos frascos de vidro de 500 ml sobre os tubos de ensaio, proporcionando uma germinação mais rápida e robusta, provavelmente em função do maior espaço para desenvolvimento radicular e aéreo, porém o tubo de ensaio trouxe vantagem sobre o frasco de vidro de 500 ml em relação a melhor visualização morfológica. O protótipo de aclimatização desenvolvido, de baixo custo e funcional, mostrou-se adequado para a transição das plântulas do ambiente *in vitro* para condições externas, permitindo trocas gasosas controladas e irrigação, além de minimizar o estresse causado na planta favorecendo ainda mais a adaptação e transição do cultivo *in vitro* para o meio externo.

A validação microbiológica dos inoculantes fornecidos confirmou a qualidade do produto, com crescimento vigoroso e isento de contaminação nos meios de cultura específicos NFb e King B. Adicionalmente, o protocolo de recuperação de células demonstrou ser eficaz para verificar a fixação das bactérias nas sementes, comprovando a eficiência do tratamento.

Em conclusão, o estudo não apenas desenvolveu e testou com sucesso um protocolo completo da assepsia, mas também validou a qualidade do insumo biológico utilizado. Os resultados obtidos fornecem uma base sólida para futuras pesquisas que possam quantificar os efeitos promotores de crescimento dessas rizobactérias no milho em condições *in vitro* e *ex vitro*, contribuindo para o avanço de biotecnologias aplicadas a uma agricultura mais sustentável.

REFERÊNCIAS

- EMBRAPA. **Cultura de tecidos**. 2006. Disponível em: https://www.embrapa.br/documents/1355163/1994475/2006_culturadetecidos.%20pdf/d7a0cde8-622b-487d-b415-a24a87ebae52. Acesso em: 06 dez. 2025.
- EMBRAPA. **Produção de Sideróforos por Leveduras Antagônicas**. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/982048/1/COT13010.pdf>. Acesso em: 5 jul. 2023.
- EMBRAPA. Protocolos para preparo de meios de cultura da Embrapa Agrobiologia. **EMBRAPA**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/624371/protocolos-para-preparo-de-meios-de-cultura-da-embrapa-agrobiologia>. Acesso em: 5 jul. 2023.
- FRANCHI, L. **Pseudomonas: conheça os microrganismos que promovem o crescimento das plantas**. Disponível em: <https://agro.genica.com.br/2022/04/06/pseudomonas/>. Acesso em: 17 jun. 2023.
- LAMEIRA, O. A.; LEMOS, O. F.; MENEZES, I. C. de; PINTO, J. E. B. P. Cultura de tecidos (manual). Belém: **Embrapa Amazônia Oriental**, 2000. 41p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 66).
- LAZAROPP. **MMT-Cap1Greenhouse**. Universidade de São Paulo (ESALQ). Disponível em: <https://www.esalq.usp.br/docentes/lazaropp/MMTCap1Greenhouse.pdf>. Acesso em: 5 jul. 2023.
- OLIM. Inoculante GRAP-NOD A L 15LT (15 doses *Azospirillum brasilense*). **OLIM**. Disponível em: https://www.olim.com.br/defensivos-inoculantes-e-tratamento-de-sementes/inoculante-grap-nod-a-l-15lt-15-doses-azospirillum-brasilense?srsId=AfmBOooucOEKTZhM2ggI4UHJNsV_x1Nkg02x7G9f_2KooCkXlhIbcOg3. Acesso em: 15 jun. 2023.
- PIONEER. P3282VYH. [S.l.]: **Pioneer Sementes**, [s.d.]. 1 folheto. Disponível em: https://www.pioneer.com/content/dam/dpagco/pioneer/la/br/pt/files/Milho_Safrinha-P3282VYH-03.pdf. Acesso em: 15 jul. 2023.
- RIBEIRO, C. **Isolamento, seleção e caracterização de rizobactérias com potencial para promoção do crescimento em Araucaria angustifolia**. 2010. Tese (Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11138/tde-20102010-105528/publico/Carlos_Ribeiro.pdf). Acesso em: 10 jul. 2023.
- VELOSO, C. Conheça o microrganismo *Azospirillum brasilense* e seus benefícios na agricultura. **VerdeAg**. Disponível em: <https://blog.verde.ag/pt/nutricao-de-plantas/conheca-o-microrganismo-azospirillum-brasilense-e-seus-beneficios-na-agricultura/>. Acesso em: 15 jun. 2023.