

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
AGRÍCOLA**

**RIZOBACTÉRIAS PRODUTORAS DE ÁCIDO INDOLACÉTICO  
COMO PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE MUDAS  
MICROPROPAGADAS DE ABACAXIZEIRO 'BRS IMPERIAL'**

**JOSELIA SANTANA GONÇALVES**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
SETEMBRO – 2016**

**RIZOBACTÉRIAS PRODUTORAS DE ÁCIDO INDOLACÉTICO  
COMO PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE MUDAS  
MICROPROPAGADAS DE ABACAXIZEIRO 'BRS IMPERIAL'**

**JOSELIA SANTANA GONÇALVES**

Licenciada em ciências biológicas, Universidade Estadual de Pernambuco, 2014

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientador: Harllen Sandro Alves Silva

Co-Orientadora: Fernanda Vidigal Duarte Souza

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA**

**SETEMBRO – 2016**

## FICHA CATALOGRÁFICA

G635 Gonçalves, Joselia Santana.

Rizobactérias produtoras de ácido indolacético como promotoras do crescimento de mudas micropropagadas de Abacaxizeiro 'BRS Imperial'/ Joselia Santana Gonçalves . – Cruz das Almas, BA, 2016.

83 f. il.; 30 cm.

Orientador: Dr. Harllen Sandro Alves Silva.

Coorientador: Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)- Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2016.

1. Abacaxi. 2. Micropropagação. 3. Regulador de Crescimento. Silva, Harllen Sandro Alves. II. Souza, Fernanda Vidigal Duarte. III. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia IV. Título.

CDD: 634.774

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
AGRÍCOLA**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE  
JOSELIA SANTANA GONÇALVES**



Dr. Harllen Sandro Silva  
Embrapa Mandioca e Fruticultura

---



Dr. Aldo Vilar Trindade  
Embrapa Mandioca e Fruticultura

---



Dr. Tullio Raphael Pereira Pádua  
Embrapa Mandioca e Fruticultura

---

“Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola em \_\_\_\_\_ conferindo o grau de  
Mestre em Microbiologia Agrícola em  
\_\_\_\_\_”

*Aos meus pais, por sempre acreditarem em meu potencial e não medirem esforços para que eu pudesse chegar até aqui...*

***Dedico.***

## **AGRADECIMENTOS**

Á Deus por ter me dado força, coragem e saúde para chegar até aqui.

Aos meus pais **Marizélia e José** que mesmo em meio as dificuldades sempre fizeram de tudo para que chegasse até aqui.

Á minha irmã, por sempre me apoiar.

Ao meu orientador Dr. Harllen pela orientação, paciência e ensinamentos transmitidos.

Á minha co-orientadora Fernanda Vidigal pela disponibilidade e conhecimentos transmitidos.

Ao Dr. Everton Hilo, por toda ajuda na execução do trabalho, pela paciência e ensinamentos nesses dois anos.

Aos amigos que mesmo na distância se fizeram presentes. Em especial Danielle, Milene, Geiza, Ludmilla, Liana, Jaimara, Iasmine.

Aos queridos amigos que o mestrado me proporcionou em especial Marcelly, Leandro, Grazielle, Lucila, Gabrielle, Valdenia, Noely, Sara, como costume dizer: “você são os meus presentes de mestrado”.

Á Milene por todo o apoio, em especial nessa reta final. Por os inúmeros bons momentos ao longo desses dois anos.

Á Julianna pela boa companhia, principalmente no último mês, por aqueles bons “Convites” que ela adora fazer!

A Nane, Paty e Manas, por as muitas risadas, os muitos momentos juntos, as nossas “quartas”, as horas de conversas, enfim muita coisa boa vivemos nessa fase das nossas vidas, certamente vocês alegraram os meus dias em Cruz.

Á toda equipe do laboratório de cultura de tecidos vegetais, por toda ajuda durante a realização do trabalho.

Á equipe do laboratório de microbiologia do solo.

Á Embrapa Mandioca e Fruticultura por disponibilizar toda a infraestrutura para realização do trabalho.

Á Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, pela oportunidade de cursar o mestrado e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pelos conhecimentos transmitidos.

Á Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

**O meu muito obrigada!**

*“Alguns homens vêem as coisas como são, e dizem ‘Porquê?’ Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo ‘Porque não?’”*

**Geroge Bernard Shaw**

# SUMÁRIO

## RESUMO

## ABSTRACT

## INTRODUÇÃO GERAL..... 12

## CAPÍTULO I..... 14

### Rizobactérias como promotoras do crescimento de mudas micropropagadas de abacaxizeiro.....14

**Uso de microrganismos em processos agrícolas.....15**

**A cultura do abacaxizeiro ..... 16**

**Micropropagação de plantas..... 18**

**Rizobactérias..... 20**

**Rizobactérias promotoras do crescimento de Plantas..... 22**

**Mecanismos de ação das rizobactérias ..... 23**

*Produção de reguladores de crescimento ..... 23*

*Fixação biológica de nitrogênio..... 23*

*Produção de ácido indolacético..... 24*

## BIBLIOGRAFIA..... 27

## CAPÍTULO II..... 36

### Rizobactérias produtoras de ácido indolacético como promotoras do crescimento em mudas micropropagadas de abacaxizeiro cultivadas em pré-aclimatização. .... 36

**RESUMO ..... 37**

**ABSTRACT..... 38**

**INTRODUÇÃO..... 39**

**MATERIAL E MÉTODOS ..... 41**

    Seleção dos isolados..... 41

    Cultivo bacteriano..... 41

    Crescimento de mudas de abacaxizeiro em substrato suplementado com rizobactérias na fase de pré-aclimatização. .... 42

    Aclimatização das plantas..... 43

    Contagem de estômatos ..... 43

**RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 44**

    Seleção dos isolados..... 44

    Pré-aclimatização e teste *in vitro* com a variedade Imperial ..... 44

    Aclimatização de Imperial ..... 51

**CONCLUSÃO ..... 56**

<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	57
<b>CAPÍTULO III</b> .....	61
<b>Crescimento de mudas micropropagadas de abacaxizeiro em substratos suplementados com rizobactérias produtoras de ácido indolacético</b> .....	60
<b>RESUMO</b> .....	62
<b>ABSTRACT</b> .....	63
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	64
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	66
Seleção dos isolados .....	66
Teste de antibiose recíproca .....	66
Ensaio de crescimento de mudas micropropagadas de abacaxizeiro em substratos suplementados com rizobactérias na fase de aclimatização. ....	67
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	69
Seleção dos isolados .....	69
Aclimatização das plantas.....	69
<b>CONCLUSÃO</b> .....	78
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	79
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	83

## RESUMO

GONÇALVES, J. S. **Rizobactérias como promotoras do crescimento de mudas micropropagadas de abacaxizeiro BRS Imperial**. Cruz das Almas, 2016. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Dado o impacto ambiental negativo dos fertilizantes artificiais e seus custos crescentes, a utilização de microrganismos benéficos do solo como as rizobactérias, por sua capacidade de associação com raízes, vem ganhando destaque por ser de baixo custo, bem como de fácil produção em meios artificiais. Essas bactérias colonizam a rizosfera das plantas, e têm sido estudadas para o incremento da produção agrícola tanto para o crescimento das plantas quanto para o biocontrole de fitopatógenos. A produção de mudas micropropagadas de abacaxizeiro é uma técnica que vem ganhando espaço no mercado comercial, no entanto o emprego dessa técnica pode ser limitado em função do custo elevado, que se deve, principalmente, ao longo tempo de aclimatização. Uma das alternativas para a redução dessa etapa pode ser o uso de rizobactérias com capacidade de produção de reguladores do crescimento vegetal. Em vista disso, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito de rizobactérias na promoção do crescimento de plantas micropropagadas de abacaxizeiro. Para isso utilizaram-se plantas oriundas da cultura de tecidos, cultivadas *in vitro* em substrato comercial onde se adicionou uma solução aquosa de células, e as mesmas mantidas sob condições controladas. Após 45 dias foram aclimatizadas e avaliadas a cada 60 dias, até os 180 dias. Os resultados obtidos mostram que na fase de pré-aclimatização a rizobactéria proporcionou efeito positivo no crescimento da planta; já na fase de aclimatização não se verificaram resultados significativos.

**Palavras-chave:** Micropropagação, reguladores de crescimento, abacaxi.

## **ABSTRACT**

**GONÇALVES, J. S. Rhizobacteria as growth promoting of BRS Imperial pineapple plantlets BRS Imperial.** Cruz das Almas, 2016. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

Given the negative environmental impact of artificial fertilizers and their increasing costs, the utilization of soil's beneficial microorganisms such as rhizobacteria, because of its capability of association with roots, has been gaining attention for the low cost as well as for the easy production in artificial environments. These bacteria colonize the rhizosphere of plants and they have been studied to increment agricultural production for both plants growth and the biocontrol of phytopathogens. The production of micropropagated pineapple plantlets is a technique that is becoming more popular in the commercial market, however the use of this technique may be limited due to the high cost, mainly because of the long period of acclimatization. One of the alternatives to reduce this step may be the use of rhizobacteria with the capability of producing vegetal growth regulators. Considering this, the study aims to evaluate the effect of rhizobacteria in promoting the growth of micropropagated plants and pineapple plants. For this purpose, it was used plants derived from tissue culture. The samples were cultivated *in vitro* in commercial substrate, in which a solution containing the microorganism and kept under controlled conditions was added. After 45 days the samples were acclimatized and evaluated every 60 days up to 180 days. The results show that in the pre-acclimatization phase the bacteria had a positive effect on the plant growth, however in the acclimatization phase it was not as efficient.

**Keywords:** micropropagation, growth regulators, pineapple

## INTRODUÇÃO GERAL

O aumento na produção de alimentos, como consequência do crescimento populacional, demanda igualmente maiores áreas de cultivo e, conseqüentemente, maior quantidade de material de plantio. Com isso buscam-se alternativas eficientes para o aumento da produção de mudas, sem, contudo, elevar os custos de produção.

O método de propagação de plantas, conhecido como micropropagação, vem crescendo de modo contínuo nas últimas décadas como forma de atender à grande demanda por material de plantio com qualidade. As mudas advindas dessa técnica têm a vantagem de serem mais vigorosas, produtivas e isentas de pragas e doenças quando estabelecidas da forma correta. Para muitas culturas, o uso deste tipo de muda, para fins comerciais ou de pesquisas, vem sendo bem sucedido (FREITAS et al., 2011).

A micropropagação se constitui de diferentes etapas que incluem o estabelecimento e a multiplicação *in vitro* em laboratório, assim como a aclimatização, que constitui a fase de adaptação da planta na condição *ex vitro* e, normalmente, é realizada em casa de vegetação. Essa fase final, no entanto, é um período crítico na produção de mudas para algumas espécies, onde é comum a redução na taxa de sobrevivência, ou um longo período de adaptação, quando são transplantadas para o campo. A maioria das plantas sofre um estresse devido à grande diferença entre os dois ambientes (ROMERO et al., 2007). Tanto a baixa sobrevivência quanto um longo período na etapa de aclimatização elevam, de forma significativa, o preço da muda no mercado.

A cultura do abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merr.) é uma das que enfrentam problemas com a aclimatização, embora a micropropagação do abacaxizeiro já venha sendo realizada com êxito a partir de diferentes protocolos (TEIXEIRA et al., 2001; SOUZA et al., 2009; MORAES et al., 2010). A fase de aclimatização ainda é um processo lento, despendendo um período considerável de tempo, podendo chegar até cinco meses (SOUZA et al., 2009). Esse longo período de aclimatização é um dos grandes responsáveis pelo aumento no custo de produção das mudas micropropagadas de abacaxi.

O estabelecimento de uma microbiota, com condições adequadas para as plantas, pode contribuir para a melhoria no crescimento das mudas, bem como

reduzir o estresse no momento do transplante para o campo. A presença de um microrganismo pode ser um fator positivo para a planta, uma vez que podem viver no interior de seus tecidos sem causar danos podendo, no caso específico do cultivo *in vitro*, favorecer o ajuste osmótico, a produção de reguladores de crescimento e a absorção de nutrientes (ALMEIDA et al., 2009; ABREU-TARAZI et al. 2010)

Uma das alternativas tem sido o uso de microrganismos capazes de produzirem reguladores de crescimento vegetal, ou moléculas análogas. Essa alternativa vem ganhando destaque, em virtude dessas substâncias estarem diretamente relacionada ao crescimento de plantas.

Entre esses microrganismos as rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (plantin growth promoting rhizobacteria – PGPR) têm sido citadas numa série de trabalhos como tendo vários efeitos benéficos sobre diversas espécies vegetais (CHEN et al., 2000). Um fator de ampla importância é a biossíntese de reguladores de crescimento vegetal, dentre os quais se destaca o ácido indolacético (AIA), que é o principal, o mais abundante e o mais responsivo estimulador do crescimento em plantas (VIEIRA JÚNIOR, 2013).

Alguns trabalhos têm sido feitos com o intuito de estudar o potencial da aplicação de rizobactérias como promotoras do crescimento vegetal, mas, em se tratando de micropropagação de mudas, pouco se tem visto.

Diante disso é relevante um estudo mais aprofundado da ação das rizobactérias produtoras de AIA no setor de produção de mudas micropropagadas de abacaxizeiro, a fim de minimizar as dificuldades enfrentadas pela cultura citadas anteriormente. O uso dessas bactérias pode favorecer a redução da etapa de aclimatização, pela indução do crescimento, além de promover aumento na eficiência nutricional das plantas e, conseqüentemente, a redução dos custos de produção e o aumento de produtividade.

# **CAPÍTULO I**

---

**Rizobactérias como promotoras do crescimento de mudas  
micropropagadas de abacaxizeiro.**

## Uso de microrganismos em processos agrícolas

A agricultura mundial enfrenta o desafio de aumentar a produção de alimentos com sustentabilidade, pois, a cada dia, mais se buscam alimentos livres de agroquímicos, bem como formas de diminuir os custos de produção, contudo, que não afetem a produtividade. Em meados da década de 1990, Luz (1996) já citava gastos de mais de 25 bilhões de dólares com defensivos agrícolas para tratamento de doenças em todo o mundo. Dentro desse contexto, a sociedade pressiona a pesquisa a investigar métodos alternativos para o aumento da produtividade e controle de pragas e doenças de plantas, com menor custo de produção e que seja, ao mesmo tempo, eficiente e menos agressivo à saúde humana e também ao equilíbrio dos ecossistemas (MARIANO; ROMEIRO, 2000).

De acordo com estudos recentes é possível afirmar que, dentre os efeitos da domesticação de importantes espécies vegetais cultivadas, está o comprometimento de um microbioma associado a essas plantas em sua zona de origem. Essa ocorrência pode trazer sérias consequências para todos os mecanismos de defesa e adaptação das plantas (JARAMILLO et al., 2015).

A busca de soluções para aumentar a produção e diminuir a utilização de defensivos agrícolas pode estar presente na própria planta, vivendo endofiticamente ou no solo que abriga uma quantidade diversificada de microrganismos. Dentre esses, muitos são bactérias que elegem como nichos ecológicos a rizosfera ou o rizoplane de plantas, onde se multiplicam e sobrevivem ativamente, resistindo à pressão do restante da microbiota nativa do solo (MARIANO; ROMEIRO, 2000).

Dado o impacto ambiental negativo, em consequência da má utilização dos fertilizantes artificiais e seus custos crescentes, a utilização de microrganismos benéficos do solo como as rizobactérias vem mostrando um grande potencial para o aumento do crescimento de plantas e do biocontrole de doenças. As pesquisas com esses microrganismos aumentaram consideravelmente nas duas últimas décadas (SINGH, 2013) e hoje são utilizados em diversos processos agrícolas.

Foi constatado em estudos, realizados por Manjula e Podile (2005), a promoção do crescimento proporcionada por *B. subtilis* aplicado em sementes de feijão guandu (*Cajanus cajan* (L.) Druce) e plantadas em turfa suplementada com

quitina, onde se verificou a rápida germinação de sementes tratadas. O aumento na emergência e no peso seco das mudas foi de 29 a 33%.

Ribeiro et al. (2012), estudando o efeito de 86 isolados de rizobactérias no controle de *Meloidogyne javanica* e mal do Panamá em bananeira, verificaram que todos os isolados proporcionaram mortalidade dos juvenis superiores às testemunhas, sendo que alguns deles obtiveram valores acima de 81% de mortalidade. Já para a redução do mal do Panamá, 13 isolados reduziram significativamente a severidade da doença, quando comparados com os demais isolados e o controle, além de promoverem um maior desenvolvimento das plantas comprovado pelo aumento do peso da matéria seca da parte aérea.

Muniz et al. (2013), avaliando a utilização de rizóbios de *Adesmia latifolia*, produtores de ácido indolacético (AIA), para enraizamento do porta-enxerto micropropagado de macieira cv. Marubakaido em substituição ao AIA sintético, constataram que um dos isolados de rizóbio testado teve capacidade de promover o enraizamento *in vitro* do porta-enxerto de macieira, sendo capaz de substituir o AIA sintético.

Esses estudos comprovam a interação benéfica desses microrganismos com diferentes espécies vegetais e o seu grande potencial de uso na agricultura, podendo ser utilizados em novas pesquisas.

## **A cultura do abacaxizeiro**

O abacaxizeiro [*Ananas comosus* (L.) Merrill] é uma monocotiledônea, herbácea e perene, da família Bromeliaceae, onde todas as cultivares de interesse alimentar pertencem à variedade botânica *Ananas comosus* var. *comosus* (COPPENS d'EECKENBRUGGE; LEAL, 2003). É um fruto produzido em clima tropical e subtropical, muito apreciado e consumido em todo o mundo, tanto *in natura* quanto na forma de produtos industrializados (LEAL, et al., 2009).

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), no ano de 2013 o Brasil foi o segundo maior produtor mundial de abacaxi, com uma produção de cerca de 2,5 milhões de toneladas, ficando atrás somente da Costa Rica (FAO, 2016). A região nordeste foi a segunda maior produtora do fruto, sendo a Bahia o sexto estado com maior produção, atingindo uma produção de cerca de 105 milhões de frutos (IBGE, 2013).

A cultivar 'Pérola' é muito apreciada no mercado interno, graças à sua polpa suculenta e saborosa, principalmente para o consumo *in natura*. (SOUTO et al., 2004). A grande limitação desta cultivar é a sua susceptibilidade à fusariose, principal doença da cultura e que tem como agente etiológico o fungo *Fusarium guttiforme* (Wollenweber & Reinking) Nelson, Toussoun & Marasas f. sp. *ananas* Ventura, Zambolim & Gilbertson. O plantio de variedades resistentes é a medida de controle mais eficiente e econômica (MATOS; CABRAL, 1988; 2006; MATOS et al., 1991).

Em função da susceptibilidade dessa variedade à fusariose o melhoramento genético do abacaxizeiro tem se voltado para o desenvolvimento de genótipos resistentes (CABRAL, et al., 2009).

A parti desses cruzamentos, foi obtido o híbrido BRS Imperial, resultante do cruzamento de 'Perolera' com 'Smooth Cayenne' que são resistentes à fusariose e apresentam frutos de boa qualidade. O imperial foi lançado como cultivar pela Embrapa Mandioca e Fruticultura, em 2003. A planta possui porte médio, folha de cor verde escuro, sem espinhos nas bordas, fruto cilíndrico, casca e polpa de cor amarela, com elevado teor de açúcar (14 a 18 °Brix), acidez titulável moderada (0,6 % de ácido cítrico) e excelente sabor (CABRAL; MATOS, 2005).

Mesmo com essa grande produção, o Brasil enfrenta alguns desafios no tocante à cultura do abacaxizeiro. Dentre esses, a produção de material propagativo de qualidade deve ser considerado como um fator limitante, a dificuldade de multiplicação do material é um dos pontos que dificultam essa produção. A qualidade dessa muda é crucial, não apenas para o êxito do cultivo, como para evitar a disseminação de pragas e doenças.

O modo usual e natural de propagação do abacaxizeiro é o plantio de mudas formadas a partir de brotações originadas de diferentes partes vegetativas da planta. Essa forma de propagação, além de produzir um número baixo de mudas, pode disseminar doenças, comprometendo o futuro plantio.

Dessa forma, a micropropagação do abacaxizeiro é uma alternativa interessante, não apenas pela possibilidade de produzir um elevado número de mudas, mas principalmente pela condição fitossanitária das mesmas.

## Micropropagação de plantas

A produção de mudas micropropagadas de abacaxizeiro é uma alternativa que vem sendo oferecida nos últimos anos a partir de diferentes protocolos já estabelecidos (GUERRA et al., 1999; TEIXEIRA et al., 2001; SOUZA et al., 2009).

No entanto o emprego dessa técnica pode ser limitado em função do elevado custo e da necessidade de mão de obra especializada. Para que a produção de mudas torne-se viável comercialmente e possa competir com os métodos tradicionais de propagação (rebentos, seccionamento do talo, coroa, etc.) é necessário reduzir custos. A contaminação *in vitro*, desordens fisiológicas e morfológicas, baixa percentagem de sobrevivência ou um longo período de adaptação das plantas na etapa de aclimatização às condições *ex vitro* acarretam na elevação dos custos da muda final e em prejuízos econômicos para as biofábricas produtoras.

As principais etapas do processo de micropropagação de plantas são: seleção das plantas matrizes; resgate, isolamento e o estabelecimento das gemas axilares *in vitro*; multiplicação de brotos; alongamento e enraizamento dos brotos e aclimatização das mudas micropropagadas em telado (CORREIA et al., 2011).

A fase de enraizamento *in vitro* é de grande importância na micropropagação, pois ela determina indiretamente a sobrevivência das plantas durante a aclimatização. Raízes mal formadas e pouco funcionais são características de plantas micropropagadas (CUNHA, 2003).

A etapa de aclimatização é um processo gradual de adaptação das plantas à uma condição ambiental diferente da qual foi produzida, visto que as plântulas vem de um ambiente de baixa transpiração podendo sofrer um estresse hídrico; de uma condição heterotrófica para uma autotrófica, de um meio com disponibilidade de sais para outro onde vai precisar absorvê-los e ainda de um ambiente asséptico para um outro sujeito ao ataque de microrganismos saprófitos e eventualmente patogênicos (SILVA et al., 1998).

Essas dificuldades de transição do mecanismo heterotrófico para autotrófico em plantas micropropagadas ocorre em virtude das alterações epigenéticas anatômicas e fisiológicas, induzidas pelas condições *in vitro* (COSTA et al., 2009). A ultraestrutura de uma planta *in vitro* é diferente de uma planta gerada *in vivo*, já que suas raízes são pouco funcionais, o aparato fotossintético

tem um funcionamento inexpressivo e a epiderme não está completamente formada. A ausência de ceras, cutinas e etc propiciam uma elevada perda de água em ambiente *ex vitro*, tornando esse tipo de muda dependente de um ambiente com elevada umidade (CAMPOSTRINI; OTONI, 1996; SOUZA et al., 2009; BERILLI et al., 2011).

Nessa etapa, as mudas são retiradas da condição *in vitro* e transferidas para casa de vegetação, com o objetivo de minimizar os impactos causados às plantas quando ocorre a mudança de ambiente (MOREIRA et al., 2006).

Em plantas micropropagadas de abacaxizeiro, esse período é longo, podendo variar de 5 a 6 meses, o que torna o valor da muda final, muito elevado (SOUZA et al., 2009), e se caracteriza como a etapa mais limitante na micropropagação do mesmo. Dessa forma, são necessários esforços para se reduzir esse longo tempo de aclimatização das plantas e tornar o processo mais viável economicamente.

Alguns fatores são fundamentais para a otimização desse processo de aclimatização, como a escolha do substrato adequado para cada espécie, associado a um programa eficiente de adubação. A melhor compreensão destes fatores proporcionará a obtenção de mudas de melhor qualidade, em menor tempo e, conseqüentemente, na redução dos custos (FREITAS et al., 2011).

Moreira et al. (2006), estudaram os efeitos de diferentes combinações de substratos para mudas de abacaxi 'Pérola', verificou que os melhores resultados ocorreram na presença de esterco, composto orgânico, solo e o substrato Plantmax<sup>®</sup>. Isso demonstra a necessidade de matéria orgânica no substrato para um melhor desenvolvimento da planta.

Silva et al. (2012) também avaliando o efeito de diferentes substratos (Plantmax<sup>®</sup> + húmus; Plantmax<sup>®</sup> + vermiculita; Plantmax<sup>®</sup>) na aclimatização de mudas de abacaxi 'Smooth Cayenne', verificou que quando as plantas foram cultivadas em Plantmax + húmus, apresentaram um melhor desenvolvimento e também características anatômicas que podem favorecer uma melhor adaptação em campo.

Segundo Souza et al. (2001), o melhor substrato para o transplântio de abacaxi deve apresentar uma boa capacidade de retenção de água, sem comprometer a drenagem e a aeração radicular. Quimicamente ele deve ser de

preferência inerte, para permitir a manipulação dos conteúdos de nutrientes, de acordo com a necessidade da espécie/cultivar.

Outro aspecto que precisa ser considerado neste problema é a chamada condição axênica das plantas *in vitro*. Estudos já demonstraram que esses microrganismos endofíticos, uma vez presentes nas plantas não necessariamente afetam negativamente seu desenvolvimento, tratando-se inclusive de uma associação benéfica e, que também será eliminada juntamente com os microrganismos oportunistas durante o estabelecimento dos explantes (DIAS et al., 2009, ABREU-TARAZI et al., 2010).

Por essa razão, estudos com uma abordagem positiva da presença de endófitos naturais no cultivo *in vitro* são de grande importância, isto porque vários trabalhos já evidenciaram a presença de endófitos em várias espécies cultivadas *in vitro*, sem lhes causar danos (ALMEIDA et al., 2009; DIAZ et al., 2009).

## **Rizobactérias**

As rizobactérias são microrganismos que colonizam a rizosfera das plantas e têm sido estudadas no incremento da produção agrícola, promovendo o crescimento vegetal, e como agentes de biocontrole de fitopatógenos (VIEIRA JÚNIOR et al., 2013). Os mecanismos de ação das rizobactérias são diversos, podendo-se citar a síntese de reguladores de crescimento como o ácido indolacético (AIA) e a produção de substâncias antimicrobianas (POLLI et al., 2012)

Pesquisas com as rizobactérias começaram em 1885 com a utilização de *Azotobacter* e *Bacillus* em diversos cultivos, especialmente em hortaliças (ZAGO et al., 2000). Porém, foi somente nos anos 1950, por meio de formulações ou inoculantes aplicados em mais de 35 milhões de hectares na Rússia e na Índia, que se observou o efeito prático positivo na promoção de crescimento de plantas e na produtividade das culturas beneficiadas (LUZ, 1996).

Os primeiros trabalhos realizados no Brasil com rizobactérias promotoras de crescimento empregaram-se isolados de *Pseudomonas* fluorescentes para aumentar o crescimento de plântulas de tomateiro e cafeeiro, em condições de casa de vegetação (STEIN, 1988; FREITAS, 1989). Desde então, vários estudos têm avaliado o efeito benéfico da utilização dessas bactérias.

Andreani et al. (2012), estudaram o efeito de rizobactérias no desenvolvimento de mudas de salsa (*Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss), e verificaram que todos os isolados promoveram um efeito positivo, sendo alguns tratamentos apresentando 100% de germinação, maior acúmulo da massa fresca da parte aérea e um maior desenvolvimento radicular.

Costa et al. (2013) também obtiveram resultados positivos quando estudaram a capacidade de 25 estirpes bacterianas de formar nódulos fixadores de nitrogênio e de promoverem o crescimento de feijão-caupi ('BR 17 - Gurguéia'). Dessas, quatro foram positivas para a fixação de nitrogênio simbioticamente, havendo formação de nódulos no sistema radicular. Já para aumento no crescimento na planta, os isolados não tiveram efeito significativo, não diferindo do controle.

Em um trabalho feito na Índia, Mehta et al. (2010) testaram a ação de um isolado de *Bacillus circulans* provenientes do sistema radicular de plantas de maçã (*Malus domestica* Borkh.) sob plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) para melhoria no crescimento. Esses autores concluíram que o isolado estimulou o crescimento das plantas e as mudas bacterizadas apresentaram maior raiz e maior parte aérea em relação ao controle não inoculado. Esses microrganismos podem ser de vida livre, associativas ou endofíticas (COSTA et al., 2013). Segundo Mariano et al. (2004), as principais espécies de rizobactérias que promovem o crescimento de plantas são encontradas entre as *Pseudomonas* spp. não fluorescentes e fluorescentes; ainda que existem registros de *Bacillus*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Acetobacter* e *Herbaspirillum*, entre outras.

Rizobactérias também têm se destacado por seu uso no biocontrole de doenças. Bezerra et al., (2013) estudaram a ação de isolados de *Bacillus* para o controle de fungos fitopatogênicos em sementes de soja. Notaram que a microbiolização de sementes de soja, com espécies de *Bacillus licheniformis* e *Bacillus pumilus*, foi de grande eficiência, atingindo um controle de 99,83% e 99,22%, respectivamente, na incidência de fungos nas sementes de soja.

## **Rizobactérias promotoras do crescimento de Plantas**

Bactérias em habitats naturais colonizam o interior e o exterior de órgãos vegetais e podem ser benéficas, neutras ou prejudiciais ao seu crescimento. As bactérias promotoras do crescimento de plantas (“plant growth-promoting rhizobacteria” – PGPR) fazem parte da população residente das plantas como epifíticas ou endofíticas e não são fitopatogênicas (MARIANO et al., 2004).

Em 1987 a China já fazia uso dessas rizobactérias, em larga escala, para o beneficiamento de 48 diferentes culturas, atingindo cerca de 3,3 milhões de hectares, onde se conseguiu aumentos satisfatórios na produtividade de algumas culturas (MARIANO et al., 2004).

As PGPRs representam uma grande variedade de bactérias de solo que, quando associadas às plantas, provocam um aumento substancial da área radicular. Esse aumento na superfície radicular promove uma maior eficiência na absorção de água, macro e micronutrientes pelas plantas (GLICK, 2012).

Esse grupo de organismos colonizam as plantas como endofíticas ou epifíticas não causando doenças. Com isso, podem ser empregadas no tratamento de sementes, explantes, mudas micropropagadas, incorporadas ao substrato de plantio, no tratamento de estacas, tubérculos, raízes, pulverizadas na parte aérea incluindo folhagem e frutos, e em pós-colheita (MARIANO et al., 2004).

As rizobactérias agem no crescimento das plantas (KLOEPPER et al., 1989), indiretamente pela supressão de doenças e, diretamente, pela produção ou alteração da concentração de reguladores de crescimento, fixação de nitrogênio, solubilização de fosfatos minerais ou outros nutrientes do solo, oxidação do enxofre, aumento da permeabilidade das raízes e produção de sideróforos (MARIANO; KLOEPPER, 2000).

## **Mecanismos de ação das rizobactérias**

### ***Produção de reguladores de crescimento***

Reguladores de crescimento vegetal são moléculas que atuam como mensageiros químicos e desempenham um papel fundamental no crescimento e desenvolvimento das plantas (CASTRO; VIEIRA, 2001).

Alguns microrganismos são capazes de secretar ácidos orgânicos e fosfatase que facilitam a conversão das formas insolúveis de fosfato em solúveis, disponibilizando esse nutriente para as plantas (CHEN et al., 2006). As bactérias solubilizadoras de fosfatos dissolvem o fosfato insolúvel pela produção de ácidos orgânicos no meio em que o microrganismo se desenvolve cuja ação tem sido atribuída às suas propriedades quelantes, possibilitando a formação de complexos estáveis com os íons  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$  e  $\text{Al}^{+3}$  (VENIERAKI et al., 2010).

São também capazes de produzir sideróforos, que são moléculas transportadoras capazes de sequestrar  $\text{Fe}^{3+}$  presente no solo e torná-lo disponível para a bactéria e para as plantas na forma do complexo férrico (BENITE; MACHADO, 2002).

Sua concentração está relacionada ao pH do solo que, quando baixo, a disponibilidade de ferro diminui e os sideróforos se tornam mais efetivos (MELO; AZEVEDO, 1998).

Pelzer et al. (2011) constataram a produção de sideróforos em todos os isolados de rizobactérias para o controle de murcha-do-escleródio e promoção de crescimento em tomateiro (*S. lycopersicum*), possivelmente causada pela produção de auxinas. Esses microrganismos são capazes de quelar ferro com uma maior eficiência e promoveram maior crescimento vegetal em condições de casa-de-vegetação.

### ***Fixação biológica de nitrogênio***

Há um grupo de rizobactérias que possuem a capacidade de fixar nitrogênio por meio do complexo enzimático da nitrogenase. As espécies que possuem esse mecanismo são chamadas de diazotróficas, sendo as principais representantes do gênero *Rhizobium*. Esse grupo é caracterizado pela formação

de estruturas hipertróficas nas raízes e, excepcionalmente, no caule, denominados nódulos fixadores de nitrogênio (STROSCHEIN et al., 2010).

Elas convertem o nitrogênio por redução em amônia e o incorporam em suas moléculas orgânicas, que posteriormente será disponibilizado às plantas de forma assimilável quando escasso no solo (PELZER et al., 2011).

A fixação biológica do nitrogênio promove vários benefícios para os cultivos agrícolas, dentre os quais, destacam-se o menor uso de adubos nitrogenados, que resulta em economia para o produtor. O uso de leguminosas como adubos verdes eficientes para a fixação biológica de nitrogênio fornece o elemento para o solo e melhora suas propriedades físicas, químicas e biológicas, concorrendo para o aumento da produtividade, especialmente em solos deficientes.

Lima et al. (2012) avaliando a capacidade simbiótica de isolados bacterianos e os nódulos de mucuna-cinza (*Mucuna pruriens* (L.) DC.) e mucuna-anã (*Mucuna deeringiana* (Bort) Merr.), verificaram que os isolados de *Rhizobium* obtiveram o melhor desempenho. Observou-se que alguns isolados promoveram o surgimento de até 163 nódulos por planta, com valores de massa de nódulos secos superiores a  $500 \text{ mg planta}^{-1}$ , resultando em massa de parte aérea superior a  $5 \text{ g planta}^{-1}$  para mucuna-cinza. Para mucuna-anã, os valores atingiram 272 nódulos, massa de nódulos secos de  $1.200 \text{ mg planta}^{-1}$  e  $2,8 \text{ g planta}^{-1}$  de massa de parte aérea.

### **Produção de ácido indolacético**

O ácido indolacético (AIA) é o regulador de crescimento mais estudado e o mais produzido pelas bactérias, atuando em baixas concentrações, sendo conhecido por sua atuação no desenvolvimento radicular, divisão e multiplicação celular (RADWAN et al., 2005).

Acredita-se que um microrganismo pode selecionar uma rota em particular para a biossíntese de AIA, dentre as várias que possui, de acordo com o ambiente, sendo a maioria pela via de triptofano (PATTEN; GLICK, 1996).

Joseph et al. (2007), caracterizando rizobactérias promotoras de crescimento associadas a ervilha (*Cicer arietinum* L.), testaram um total de 150 isolados em condições *in vitro* de *Bacillus* ssp., *Pseudomonas* spp., *Azotobacter* ssp., *Rhizobium* ssp. e observaram que todos os isolados foram positivos para a

produção de AIA; excetos os isolados de *Rhizobium* testados, em que apenas 85,7% foram positivos para produção de AIA.

Weber et al. (2003) também estudaram o efeito de bactérias em mudas micropropagadas de abacaxizeiro 'Cayenne Champac' na aclimatização, e constataram que a presença desses microrganismos reduziu a mortalidade e, ao mesmo tempo, promoveu o crescimento das plantas, demonstrando a capacidade dessas bactérias para reduzir o período de aclimatização da cultura.

Baldotto et al. (2010) selecionaram 20 estirpes de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro 'Vitória' com o objetivo de promover uma melhor adaptação da planta na aclimatização. Esses autores observaram que para o crescimento da planta os valores chegaram a 51%, assim como um aumento de 58% das características nutricionais, quando comparadas ao controle, o que demonstra a capacidade desses microrganismos de redução no período de aclimatização de plantas provenientes de cultivo *in vitro*.

Poucos estudos têm sido realizados empregando rizobactérias com o objetivo de substituição dos reguladores de crescimento na fase de enraizamento *in vitro* e do período de aclimatização de mudas micropropagadas.

A inserção dessas bactérias produtoras de ácido indolacético nessas fases da produção de mudas micropropagadas de abacaxizeiros seria bastante facilitada pela ausência de outros microrganismos no substrato de cultivo, podendo ser uma alternativa para reduzir o período de pré-aclimação e aclimatização das mudas.

Na pré-aclimatização pode também ser feito o uso de substratos, juntamente com as rizobactérias, como alternativa de substituição aos meios de cultura utilizados atualmente e um ganho na redução de tempo e na adaptabilidade ao meio *ex vitro*.

Outro benefício do uso desses microrganismos seria o fato de que as mudas já seriam comercializadas com uma carga microbiana benéfica associada, podendo assim favorecer o seu crescimento durante a fase de plantio, como também a facilidade de cultivo desses microrganismos e baixo custo do microrganismo, apresentando assim grande potencial de utilização como bioinoculantes no processo de produção de mudas.

Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de rizobactérias produtoras de ácido indolacético como promotoras de crescimento de mudas micropropagadas de abacaxi nas fases de pré-aclimatização e aclimatização.

## BIBLIOGRAFIA

ABREU-TARAZI, M. F.; NAVARRETE, A. A.; ANDREOTE, F. D.; ALMEIDA, C.V., TSAI, S. M.; ALMEIDA, M. Endophytic bacteria in long-term in vitro cultivated “axenic” pineapple microplants revealed by PCR–DGGE. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 26, p.555-560, 2010.

ALMEIDA, C. V.; ANDREOTE, F. D., YARA, R.; TANAKA, F. A. O.; AZEVEDO, J. L. ALMEIDA, M. Bacteriosomes in axenic plants: endophytes as stable endosymbionts. **Journal of Microbiology Biotechnology**, Seoul, v.25, p.1757-1764, 2009.

ANDREANI, D. I. K.; JUNIOR, R. A.; COELHO, O. M. Efeito de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas no desenvolvimento de mudas de salsa. **Revista Cultivando o Saber**. Cascavel, v.5, n.4, 2012.

BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; OLIVARES, F. L.; VIANA, A. P.; SMITH, R. B. Seleção De Bactérias Promotoras De Crescimento no Abacaxizeiro Cultivar Vitória durante a Aclimatização. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, n.2, p. 349-360, 2010.

BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. P. Sideróforos: “uma resposta dos microorganismos”. **Química Nova**, São Paulo, Vol. 25, No. 6B, 1155-1164, 2002.

BERILLI, S. S.; CARVALHO, A. J. C.; FREITAS, S. J.; FARIA, D. C.; MARINHO, C. S. Avaliação do desenvolvimento de diferentes tamanhos de mudas micropropagadas de abacaxizeiro, após aclimatização. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n 1, 2011.

BEZERRA, G. A.; MACEDO, D. A.; NASCIMENTO, I. O.; SOUSA, T. P.; COSTA, N. B.; SOUSA, L. F. R. A. Uso de bacillus spp. No controle de fitopatógenos em

sementes de soja variedade brs valiosa rr. **Agroecosistemas**, Pará, v.5, n.1, p. 68-73, 2013.

CABRAL, J. R. S.; LEDO, C. A. S.; CALDAS, R. C.; JUNGHANS, D. T. Variação de caracteres em híbridos de abacaxizeiro obtidos de diferentes cruzamentos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n. 4, p.1129-1134, 2009.

CABRAL, J. R. S.; MATOS, A. P. Imperial, nova cultivar de abacaxi. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura. **Comunicado Técnico**, p. 4, 2005.

CAMPOSTRINI, E.; OTONI, W. C. Aclimatização de plantas: abordagens recentes. **Embrapa Hortaliças**, Brasília, 1996.

CASTRO, P. R. C.; VIEIRA, E. L. Aplicações de reguladores vegetais na agricultura tropical. **Guáiba: Agropecuária**, 132p, 2001.

CHEN, C.; BÉLANGER, R. R.; BENHAMOU, N.; PAULITZ, T. C. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum* Physiol. Molec. **Plant Pathology**, 56:13-23, 2000.

CHEN, Y. P.; REKHA, P. D.; ARUN, A. B.; SHEN, F. T.; LAI, W. A.; YOUNG, C. C. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Applied soil ecology**, 34(1), 33-41, 2006.

COPPENS d'EECKENBRUGGE, G.; LEAL, F. Morphology, anatomy and taxonomy. In: BARTHOLOMEW, D. P.; PAULL, R. E.; ROHRBACH, K.G. The pineapple: botany, production, and uses. New York: **CAB International**, p.13-32, 2003.

CORREIA, D.; BORGES, N. S. S.; RIBEIRO, E. M.; MORAIS, J. P. S. Produção de Mudas In Vitro e Indução Floral de Abacaxizeiro Ornamental. Documentos 134, **Embrapa Agroindústria Tropical**, Fortaleza ISSN 2179-8184, 2011.

COSTA, E. M.; NÓBREGA, R. S. A.; CARVALHO, F.; TROCHMANN, A.; FERREIRA, L. V. M.; MOREIRA, F. M. S. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.48, n.9, p.1275-1284 2013.

COSTA, F. H. S.; PEREIRA, J. E. S.; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M.; SANTOS, A. M. Perda de água e modificações anatômicas em folhas de plantas de bananeiras micropropagadas durante a aclimatização. **Revista Ciência Rural**, 39:742-748, 2009.

CUNHA, G. A. P. Nova tecnologia para o controle da fusariose do abacaxizeiro. **Embrapa**, Cruz das Almas, 2003.

DIAS, A. C. F.; COSTA, F. E. C.; ANDREOTE, F. D.; LACAVA, P. T.; TEIXEIRA, M. A.; ASSUMPCÃO, L. C.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; MELO, I.S. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **Journal of Microbiology Biotechnology**, Seoul, v. 25, p. 189-195, 2009.

DÍAZ, K.; VALIENTE, C.; MARTÍNEZ, M.; CASTILLO, M.; SANFUENTES, E. Root-promoting rhizobacteria in Eucalyptus globulus cuttings. **Journal of Microbiology Biotechnology**, Seoul, v.25, p. 867-873, 2009.

FREITAS, S. J.; CARVALHO, A. J. C.; BERILLI, S. S.; SANTOS, P. C.; MARINHO, C. S. Substratos e osmocote na nutrição e desenvolvimento de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Vitória. **Revista Brasileira Fruticultura**. Jaboticabal, Volume Especial, E. 672-679, 2011.

FREITAS, S. S. Desenvolvimento de plântulas de café pela inoculação de *Pseudomonas* sp. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, V. 13, p 31-34. 1989.

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Revista Científica**, Waterloo, ID 963401, 2012.

GUERRA, M. P.; DAL VESCO, L. L.; PESCADOR, R.; SCHUELTER, A. R.; NODARI, R. O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília vol.34 no.9, 1999.

JARAMILLO, C. B.; TORRES, J. J.; RESTREPO, D. E.; COLOMA, G. A.; TORRES, J. L. F. Estudio comparativo de la composición volátil y las actividades biológicas del aceite esencial de *Piper marginatum* Jacq Colombiano. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Caribe 14, 343–354, 2015.

JOSEPH, B.; RANJAN PATRA, R.; LAWRENCE, R. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.) **International Journal of Plant Production**, Gorgan, V. 2, p. 141-152, 2007.

KLOEPPER J. W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R. M. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**, Califórnia, v. 7, p. 39-44.1989.

LEAL, A. J. F.; HORA, R. C.; TONIN, T. A.; BOLIANI, A. C. Viabilidade econômica do cultivo de abacaxi no arenito Caiuá, região noroeste do Estado do Paraná. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá. v. 31, n. 2, p. 353-358, 2009.

LIMA, A. A.; JUNIOR, P. I. F.; PASSOS, S. R.; PAULO, F. S.; NOSOLINE, S. M.; FARIA, S. M.; GUERRA, J. G. M.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Diversidade

e Capacidade Simbiótica de Rizóbios Isolados de Nódulos de Mucuna-Cinza e Mucuna-Anã. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, 36:337-348, 2012.

LUZ, W.C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. In: LUZ, W.C. et al (Ed.). **Revisão anual de patologia de plantas (RAPP)**. Passo Fundo, V.4, p.1-49, 1996.

MANJULA, K.; PODILE, A. R. Increase in seedling emergence and dry weight of pigeon pea in the field with chitin-supplemented formulations of *Bacillus subtilis* AF 1. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v.21, p.1057–1062, 2005.

MARIANO, R. L. R.; KLOEPPER, J. W. Método alternativo de biocontrole: resistência sistêmica induzida por rizobactérias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, n. 8, p. 121-137, 2000.

MARIANO, R. L. R.; ROMEIRO, R. S. Indução de resistência sistêmica mediada por rizobactérias promotoras de crescimento de plantas. **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, p. 305- 324, 2000.

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

MATOS, A. P.; CABRAL, J. R. S. Evaluation of Pineapple Genotypes for Resistance to *Fusarium subglutinans*. **Acta Horticulturae**, v. 702, p. 73-77, 2006.

MATOS, A. P.; CABRAL, J. R. S. Interação entre variedades de abacaxi e isolados de *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 10, n. 3, p. 55-61. 1988.

MATOS, A.P.; MOURICHON, X.; LAPEYRE, F. Reaction of pineapple accessions to inoculation with *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. **Fruits**, 46:647-652. 1991.

MEHTA, P.; CHAUHAN, A.; MAHAJAN, R.; MAHAJAN, P. K.; SHIRKOT, C. K. Strain of *Bacillus circulans* isolated from apple rhizosphere showing plant growth promoting potential. **Current Science**, 2010.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Ecologia microbiana. Jaguariúna, **Embrapa-CNPMA**, 488 p, 1998.

MORAES, A. M.; ALMEIDA, F. A. C.; BRUNO, R. L. A.; FILHO, J. C.; NUNES, S. T.; GOMES, J. P. Micropropagação de abacaxizeiro cv. Emepa 11. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.14, n.9, p.932–936, 2010.

MOREIRA, M. A.; CARVALHO, J. G.; PASQUAL, M.; FRÁGUAS, C. B.; SILVA, A. B. Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 5, p.87-89, 2006.

MUNIZ, A. W.; SÁ, E. L.; DALAGNOL, G. L.; FILHO, J. A. Rooting and acclimatization of micropropagated marubakaido apple rootstock using *Adesmia latifolia* rhizobia. **Journal Springer Plus**. Vol. 2, n. 437, 2013.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal Microbiology**, Toronto, v.42, p.207-220, 1996.

PELZER, G, Q.; VIEIRA, B, A, H.; NECHET, K, L.; SOUZA, G, R; ZILLI, J, E; PERIN, L. Mecanismos de controle da murcha-de-esclerócio e promoção de crescimento em tomateiro mediados por rizobactérias. **Tropical Plant Pathology**, Viçosa. vol. 36, 2, 095-103 2011.

PERON, F. N.; FERNANDES, P. M. B.; VENTURA, J. A. Detecção de PMWAV-1 e PMWaV-2 em abacaxizeiros no Estado do Espírito Santo. **Tropical Plant Pathology**. Lavras-MG, v.34 (suplemento), p.268, 2009.

POLLI, A.; NEVES, A. F.; GALO, F. R.; GAZARINI, J.; RHODEN, S. A.; PAMPHILE, J. A. Aspectos da interação dos microrganismos endofíticos com plantas hospedeiras e sua aplicação no controle biológico de pragas na agricultura. **Revista de Saúde e Biologia**, Campo Morão, v.7, n.2, p.82-89, 2012.

RADWAN, T. S. D.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Aeração e adição de sais na produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, vol. 40, p. 997-1004, 2005.

RIBEIRO, R. C. F.; CAMPOS, V. P.; XAVIER, A. A.; ROCHA, L. S.; RIBEIRO, H. B.; AGUIAR, F. M.; SOUZA, R. M.; MIZOBUTSI, E. H.; DIAS ARIEIRA, C. R. rizobactérias no controle de meloidogyne javanica e Mal do Panamá em bananeira. **Jornal Nematropica**, Flórida. Vol. 42, No. 2, 2012.

ROMEIRO, A. S. R.; BADOSA, E.; MONTESINOS, C. M.; VEGA, J. Growth promotion and biological control of root-knot nematodes in micropropagated banana during the nursery stage by treatment with specific bacterial strains. **Annals of Applied Biology**. Malden, v 152, p. 41-48, 2007.

SILVA, A. B.; PASQUAL, M.; MOREIRA, M. A.; MACIEL, A. L. R.; ALVES, J. M. C.; PEREIRA, A. B. Aclimação de brotações de abacaxi (ananas comosus L.) Produzidas in vitro: ação de agromix®, húmus e kelpak®. **Revista da Universidade de Alfenas**, Alfenas, v.4, p.07-110, 1998.

SILVA, A. D.; PASCOAL, M.; ARAÚJO, A. G.; BRAGA, F. T.; CASTRO, E. M.; ALBERT, L. H. B. Morfofisiologia e anatomia foliar de mudas micropropagadas e aclimatizadas de abacaxizeiro cv. Smooth Cayenne em diferentes substratos. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, n.5, p. 580-586, 2012.

SINGH, J. S. Plant Growth Promoting Rhizobacteria Potential Microbes for Sustainable Agriculture. **Journal of Magnetic Resonance**, Amsterdam, 2013.

SOUTO, R. F.; DURIGAN, J. F.; SOUZA, B. S.; DONADON J.; MENEGUCCI J. L. P. Conservação pós-colheita de abacaxi 'Pérola' colhido no estádio de maturação "pintado" associando-se refrigeração e atmosfera modificada. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.26, p.24-28, 2004.

SOUZA JÚNIOR, E.E.; BARBOZA, S. B. S. C.; SOUZA, L. A. C. Efeitos de substratos e recipientes na aclimatização de plântulas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr) cv. Pérola. **Revista Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiás, v. 31, n. 2, p. 147-151, 2001.

SOUZA, F. V. D.; SOUZA, A. S.; SANTOS-SEREJO, J. A. S.; SOUZA, E. H.; JUNGHANS, T. G.; SILVA, M. J. Micropropagação de abacaxizeiro e outras bromélias. In: JUNGHANS, T. G; SOUZA, A. S. (Eds.). Aspectos práticos da micropropagação de plantas. **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**, Cruz das Almas, p. 177-205. 2009.

STEIN, R. L. B. Efeito de *Pseudomonas* spp. fluorescentes no controle in vitro de fungos do solo e no desenvolvimento do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (**Dissertação de Mestrado**). Recife. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 1988.

STROSCHEIN, M. R. D.; ELTZ, F. L. F.; ANTONIOLLI, Z. I.; LUPATINI, M.; VARGAS, L. K.; GIONGO, A.; PONTELLI, M. P. Symbiotic efficiency and genetic characteristics of *Bradyrhizobium* sp. strain UFSM LA 1.3 isolated from *Lupinus albescens* (H. et Arn). **Scientia agrícola**, Piracicaba, vol.67 n 6, 2010.

TEIXEIRA, J. B.; CRUZ, A. R. R.; FERREIRA, F. R.; CABRAL, J. R. Biotecnologia aplicada à produção de mudas: Produção de mudas micropropagadas de abacaxi. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v 3, N 19, p.42-47, 2001.

VENIERAKI, A.; DIMOU, M.; PERGALIS, P.; KEFALOGIANNI, I.; CHATZIPAVLIDIS, I.; KATINAKIS, P. The genetic diversity of culturable nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of wheat. **Microbial Ecology**, v.61, n.2, p.277-285, 2010.

VIEIRA JÚNIOR, J. R.; FERNANDES, C. F.; JÚNIOR, H. A.; SILVA, M. S.; SILVA, D. S. G.; SILVA, U.O. Rizobactérias como agentes de controle biológico e promotores de crescimento de plantas. **Documento 155**, Embrapa Rondônia, 2013.

WEBER, O. B.; CORREIA, D.; SILVEIRA, M. R. S.; CRISÓSTOMO, L. A.; OLIVEIRA, E. M.; SÁ, E. G. Efeito da bactéria diazotrófica em mudas micropropagadas de abacaxizeiros Cayenne Champac em diferentes substratos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 6, p. 689-696, 2003.

ZAGO, V. C. P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N. G. Pseudonomas spp. 44 Fluorescentes - Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, **Documentos**, 127, p. 4, 2000.

## **CAPÍTULO II**

---

**Rizobactérias produtoras de ácido indolacético como promotoras do crescimento em mudas micropropagadas de abacaxizeiro cultivadas em pré-aclimatização.**

## RESUMO

GONÇALVES, J. S. **Uso de rizobactérias na promoção do crescimento de plantas de abacaxi cultivadas *in vitro***. Cruz das Almas, 2016. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

A disponibilidade de mudas de qualidade tem sido um dos entraves para elevar a produção e ampliar áreas cultivadas do abacaxizeiro. A micropropagação tem sido uma estratégia utilizada para produzir um elevado número de mudas saudáveis, aumentando ou garantindo a produtividade de diversas culturas. Entretanto a etapa de pré-aclimatização, resulta em plantas com uma baixa adaptação às condições *ex vitro*. Necessitando assim de uma etapa de aclimatização que por ainda ser longa e eleva o custo da muda. Uma alternativa que vem ganhando destaque é o uso de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, por serem capazes de produzir reguladores de crescimento vegetal. Nesse contexto o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de rizobactérias na promoção de crescimento de uma variedade de abacaxi, tanto em pré-aclimatização, como na fase *ex vitro*. Para isso foram selecionadas bactérias produtoras de ácido indolacético que foram adicionadas, em tubos de ensaio, contendo o substrato para o cultivo das plantas *in vitro*, produzidas de acordo com protocolo já estabelecido. Após 60 dias foram avaliadas e as demais plantas transplantadas para casa de vegetação onde foram avaliadas a cada 60 dias por seis meses. Analisaram-se as seguintes variáveis: altura, comprimento da folha D, número de folhas, massa fresca e seca da parte aérea e sistema radicular, comprimento de raiz, número de estômatos, taxa fotossintética, transpiração e condutância estomática. De acordo com os resultados obtidos, verificaram-se que isolados de rizobactérias podem promover o crescimento de plantas *in vitro* na fase de pré-aclimatização. Entretanto seu efeito na etapa *ex vitro*, em casa de vegetação não foi significativo ao longo do tempo.

**Palavras-chave:** *Ananas comosus*, micropropagação, rizobactérias.

## ABSTRACT

GONÇALVES, J. S. **Use of rhizobacteria promoting the growth of cultivating pineapple plants *in vitro***. Cruz das Almas, 2016. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

The availability of quality plantlets has been one of the barriers to improve production and expand cultivated areas of pineapple. Thus, the micropropagation has been a strategy used to produce a large number of healthy plantlets, increasing or guaranteeing productivity of various crops. However, the pre-acclimatization step results in plants with low adaptation rates to the *ex vitro* conditions. Therefore, is required an acclimation step that for being long raises the plantlets cost. An alternative that has gained prominence is the use of plants growth promoting rhizobacteria, because they are capable of producing plant growth regulators. In this context, the objective of this study was to evaluate the effect of rhizobacteria in promoting growth of a pineapple variety, both in the pre-acclimatization and in the *ex vitro* stage. In this regard, indoleacetic acid producing bacteria were selected after they had been added in test tubes containing the substrate for plants cultivation *in vitro*. The plants were produced in accordance with protocols that had been already established. After 60 days these plants were evaluated and the other plants were transplanted to a greenhouse where they were evaluated every 60 days for six months. The following variables were analyzed: height, D leaf length, number of leaves, fresh and dry weights of shoot and root, root length, number of stomata, photosynthetic rate, transpiration and stomatal conductance. According to the results, it was possible to verify that rhizobacteria isolates can promote plant growth *in vitro* in the pre-acclimatization phase. However, its effect on the *ex vitro* stage in greenhouses was not significant over time.

**Keywords:** Ananas comosus, micropropagation, rhizobacteria.

## INTRODUÇÃO

O abacaxizeiro [(*Ananas comosus* (L.) Merr.) é uma das fruteiras tropicais mais produzidas no mundo, perdendo somente para a banana e citros. O Brasil foi o segundo maior produtor mundial de abacaxi no ano de 2013, com uma produção de cerca de 2,5 milhões de toneladas, sendo superado apenas pela Costa Rica (FAO, 2016).

Apesar de toda essa produção a cultura ainda enfrenta vários desafios para melhoria das condições de cultivo. Um dos problemas tem sido a escassez de mudas de qualidade, que tenham vigor e sanidade adequada para garantir um bom desenvolvimento inicial das plantas e diminuir os riscos de ocorrência de doenças fitossanitárias (FREITAS et al., 2011).

A micropropagação tem sido uma alternativa para produção em larga escala de mudas sadias em várias espécies e para o abacaxizeiro já existem protocolos bem estabelecidos (TEIXEIRA et al., 2001; SOUZA et al., 2009; MORAES et al., 2010). A muda oriunda da cultura de tecidos tem uma qualidade e uma uniformidade que impactam na produtividade da cultura (ERIG; SCHUCH 2005).

Entretanto, na micropropagação do abacaxizeiro, os longos períodos exigidos de aclimatização elevam o preço da muda no mercado, o que constituiu uma dificuldade a mais para a comercialização deste material de plantio. Diversos estudos têm sido realizados no intuito de diminuir o período de aclimatização e acelerar o crescimento da planta. Dentre estes, podem ser destacados o emprego de luz natural na fase de enraizamento, o uso de substratos comerciais e ácidos húmicos ainda na fase *in vitro* (FREITAS et al., 2011; BALDOTTO et al., 2009), assim como a aplicação de rizobactérias promotoras de crescimento (WEBER et al., 2003; MUNIZ et al., 2013).

Reguladores de crescimento vegetal são moléculas que agem como mensageiros químicos e exercem um papel fundamental no crescimento e desenvolvimento das plantas. Esses compostos orgânicos são sintetizados no próprio vegetal, os quais, em baixas concentrações, promovem, inibem ou modificam processos morfológicos e fisiológicos do mesmo (CASTRO; VIEIRA, 2001).

Alguns microrganismos têm a capacidade de produção de ácido indolacético, que é o regulador de crescimento mais estudado e o mais produzido pelas bactérias, agindo em baixas concentrações, sendo conhecido por sua ação no desenvolvimento radicular, divisão e multiplicação celular (RADWAN et al., 2005).

Weber et al. (2003) estudaram o efeito de rizobactérias produtoras de ácido indolacético em plantas de abacaxizeiro em aclimatização, e obtiveram uma redução na mortalidade e um aumento no crescimento.

Baldotto et al. (2010) utilizando isolados de rizobactérias para promoção de crescimento de plantas de abacaxizeiro *in vitro*, verificaram que houve melhorias na adaptação das plantas durante a aclimatização e diminuição desse período.

Dessa forma, o uso de rizobactérias produtoras de ácido indolacético, pode ser uma alternativa para a redução do longo período de produção das mudas micropropagadas de abacaxizeiro incidindo diretamente sobre o custo final da muda.

A utilização de substrato na fase *in vitro* também pode vir a contribuir na redução desses custos, em função do valor de compra ser bem inferior ao do meio de cultura comumente utilizado. Podendo também favorecer as plantas uma melhor adaptação a condições *ex vitro*.

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi reduzir o período de pré-aclimatização *in vitro* e aclimatização, em função da aplicação de rizobactéria produtora de ácido indolacético, bem como a substituição do meio de cultivo utilizado por substrato comercial.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Seleção dos isolados**

Foram utilizadas mudas micropropagadas de abacaxizeiro do híbrido BRS 'Imperial', oriundas do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Utilizaram-se 200 isolados de bactérias da rizosfera ou do rizoplano de abacaxizeiros saudáveis, pertencentes à coleção microbiológica de trabalho do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Resíduos Orgânicos da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Os isolados foram submetidos a ensaios para detecção *in vitro* da capacidade de síntese de ácido indolacético (AIA). Para isso, foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura TSA (*trypticase soy agar*) diluído dez vezes e enriquecido com 5 mM de L-Triptofano ( $1,021 \text{ g L}^{-1}$ ).

Em seguida, o meio de cultura foi coberto com membrana de nitrocelulose e as placas de Petri incubadas a 28 °C por 24 horas. Após este período, as membranas foram removidas e saturadas com solução de Salkowski. Os isolados que proporcionaram o aparecimento de halo avermelhado na membrana, no período entre 30 minutos e 2 horas, foram considerados produtores de AIA (CATTELLAN, 1999). Para o teste utilizaram-se três repetições para cada isolado. Os isolados avaliados como positivos para a produção de AIA, foram aqueles capazes de cobrir uma placa de Petri de 9 cm de diâmetro em menor tempo, sendo selecionado para o ensaio posterior.

### **Cultivo bacteriano**

A rizobactéria selecionada, isolado 46, foi cultivada em meio caldo nutriente por 24 horas, a 28 °C. Em seguida foi semeada em placas de petri contendo o meio nutriente agar (NA), onde permaneceram por mais 24 horas à mesma temperatura. A aplicação da bactéria se deu via 2,0 mL de uma suspensão aquosa de células, ajustada para  $10^8 \text{ UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ .

## **Crescimento de mudas de abacaxizeiro em substrato suplementado com rizobactérias na fase de pré-aclimatização.**

Brotos de abacaxizeiro BRS 'Imperial' oriundos da etapa de multiplicação *in vitro* de acordo com Souza et al. (2009), foram postos a enraizar em substrato Vivatto®, autoclavado, suplementados ou não com a rizobactéria produtora de ácido indolacético selecionada.

Para isso, os brotos passaram por lavagem, para a retirada do excesso de meio de cultura antes de serem transplantados para o substrato. Após transplante e inoculação, os brotos foram mantidos em sala de crescimento com intensidade luminosa ( $22 \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ), fotoperíodo de 16 horas e temperatura de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  sob condições controladas. Os tratamentos consistiram de: a) Substrato + água; b) Substrato + água + rizobactéria; c) Substrato + sacarose a 30%; d) Substrato + sacarose a 30% + rizobactéria; e) Meio MS (MURASHIGE; SKOONG 1962) como controle. Para cada tratamento foram utilizadas sessenta repetições, sendo que cada repetição se constituiu de uma planta.

A aplicação da rizobactéria ocorreu por meio da aplicação de 2,0 mL de solução aquosa de células, ajustada em espectrofotômetro para uma concentração de  $10^8 \text{ UFC}$  por  $\text{mL}^{-1}$ .

A primeira avaliação foi realizada após 60 dias de cultivo *in vitro*, onde foram mensuradas 10 plantas de cada tratamento e avaliadas as seguintes variáveis de crescimento: altura da planta (mm), comprimento da folha D (mm), largura da folha D (mm), número de folhas verdes e senescentes, número de raízes, comprimento da maior raiz (cm), massa da matéria fresca (mg) e massa da matéria seca (mg), assim como medidas relacionadas à fotossíntese: número de estômatos, taxa fotossintética e respiratória ( $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{min}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ). As medidas foram feitas com auxílio de um paquímetro, e as taxas fotossintéticas e respiratórias foram medidas no IRGA (Infrared Gas Analyzer) da Tecnal®.

## **Aclimatização das plantas**

As plantas restantes foram aclimatizadas em casa de vegetação em tubetes contendo substrato de fibra de coco. Não houve aplicação de rizobactérias nesta etapa. Foram realizadas avaliações após 60, 120 e 180 dias da aclimatização, para os seguintes parâmetros: altura da planta (mm), comprimento da folha D (mm), largura da folha D (mm), número de folhas verdes e senescentes, número de raízes, comprimento da raiz (cm), número de estômatos, massa seca da parte aérea e do sistema radicular (mg). As medidas foram feitas com auxílio de um paquímetro.

Ambos os ensaios foram montados em delineamento inteiramente casualizado, e os dados submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

## **Contagem de estômatos**

Para a contagem de estômatos, foram preparadas impressões em cola Super Bonder®, amostrando a superfície abaxial das folhas, para contagem dos estômatos e posterior cálculo do índice estomático.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Seleção dos isolados

Dos 200 isolados de rizobactérias testados quanto à produção de ácido indolacético, 26 apresentaram-se positivos. Sendo, a partir destes, escolhido o isolado 46, por apresentar rápido crescimento em meio de cultura.

### Pré-aclimatização e teste *in vitro* com a variedade BRS Imperial

A pré-aclimatização é a etapa que precede a aclimatização da planta e ocorre ainda na condição da planta *in vitro*, quando se recorre a algum tratamento para diminuir os impactos que serão causados pela condição *ex vitro*.

Os resultados obtidos com a variedade BRS Imperial encontram-se na Tabela 1, com os maiores valores registrados para o tratamento com sacarose e bactéria (SAC + BAC), ainda que também apresente os maiores valores para número de folhas senescentes, que indica um rápido crescimento e o consequente envelhecimento. No entanto, o tratamento de água com adição de bactéria (H<sub>2</sub>O + BAC), também observaram-se resultados semelhantes para as variáveis altura de planta, comprimento da folha D, número de folhas verdes e número de raízes, não diferindo significativamente de sacarose e bactéria (SAC + BAC), e deixando evidente a influência da rizobactéria no crescimento das plantas nesta etapa.

Por outro lado, os baixos valores para o comprimento de raiz neste 5tratamento podem estar relacionados com a ausência de sacarose. A presença da fonte de carbono para o microrganismo pode favorecer seu crescimento, o que possivelmente levaria a uma ação sobre a quantidade de ácido indolacético (AIA) produzido, e consequentemente auxiliaria no crescimento do sistema radicular. De acordo com os resultados sugere-se uma interação entre a sacarose e a bactéria com efeitos positivos sobre desenvolvimento das plantas (TORTORA et al., 2012).

Na Figura 1c é possível ver as plantas de cada tratamento e as semelhanças e diferenças entre os tratamentos discutidos acima. O tratamento com apenas sacarose (SAC) promoveu resultados semelhantes ao tratamento só com água (H<sub>2</sub>O), considerando as variáveis de crescimento, exceto para o número de raízes, confirmando a importância da sacarose para o desenvolvimento radicular. Isso muito provavelmente ocorreu em função da sacarose ser fonte de carbono para a planta, o que pode ter favorecido o fornecimento de energia para as suas atividades vitais (MADIGAN et al., 2016).

**Tabela 1.** Avaliações quantitativas de plantas de abacaxizeiro BRS ‘Imperial’ em pré-aclimatização, cultivadas em substrato com adição de água, sacarose e rizobactéria.

	<b>ALT</b>	<b>COD</b>	<b>NFV</b>	<b>NFS</b>	<b>MFA</b>	<b>MAS</b>	<b>NRZ</b>	<b>COR</b>	<b>NES</b>	<b>FOT</b>	<b>TRA</b>	<b>CES</b>
<b>MS</b>	64,38 b	72,68 b	15,00 a	0,10 b	1,08 ab	0,09 a	0,00 b	0,00 d	36,61 ab	-1,55 ab	0,29 c	0,01 c
<b>H2O</b>	54,03 b	67,85 b	10,00 c	0,20 b	0,50 c	0,04 b	0,80 b	0,19 d	38,54 a	0,59 a	0,72 a	0,04 a
<b>H2O+BAC</b>	86,04 a	92,06 a	13,60 ab	0,20 b	0,78 bc	0,06 b	3,00 a	2,90 b	39,17 a	0,19 a	0,43 bc	0,02 bc
<b>SAC</b>	56,94 b	64,89 b	10,90 bc	0,60 b	0,64 c	0,05 b	3,20 a	1,82 c	31,00 b	-3,61 b	0,63 ab	0,04 ab
<b>SAC+BAC</b>	83,61 a	90,36 a	14,80 a	2,20 a	1,19 a	0,10 a	4,80 a	4,09 a	31,31 b	-0,71 a	0,63 ab	0,03 ab
CV (%)	12,48	11,28	9,30	27,10	8,76	1,65	25,88	16,15	12,56	-143,80	21,46	26,35
<i>Fc</i>	30,15 **	21,30 **	9,23 **	17,95 **	15,07 **	17,18 **	26,21 **	75,62 **	7,80 **	4,39 **	19,21 **	28,21 **

ALT = altura da planta (mm); COD = comprimento da folha “D”; NFV = número de folhas verdes; NFS = número de folhas senescentes; MFA = massa fresca da parte aérea (g); MSA = massa seca da parte aérea (g); NRZ = número de raízes; COR = comprimento das raízes (mm); NES = número de estômatos (mm<sup>2</sup>); FOT = fotossíntese (μmol (CO<sub>2</sub>) m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>); TRA = transpiração (μmol (CO<sub>2</sub>) m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>); CES = condutância estomática mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

O tratamento considerado controle neste trabalho foi o cultivo dos brotos feito em meio Murashige e Skoong (MS), adicionado de fitagel para gelificação do meio de cultivo e de 30 g de sacarose. Essa etapa antecede a etapa de aclimatização no sistema convencional da micropropagação.

No controle observaram-se bons resultados para o número de folhas verdes e variáveis relacionadas, tais como massa fresca e seca da parte aérea. Um resultado que chama atenção é a ausência total de raízes neste tratamento, deixando evidente que pode haver uma influência do substrato para o desenvolvimento deste órgão, independente dos componentes adicionais, seja a sacarose ou a bactéria.

Considerando que o substrato vivatto® utilizado foi autoclavado e, portanto, perdeu toda a microbiota, a condição física pode ter influenciado no aparecimento do sistema radicular, visto que a porosidade é muito relevante para o enraizamento de plantas na aclimatização (VAN LIER, 2001).

O uso de substrato, neste trabalho, deveu-se principalmente para garantir a aplicação da bactéria, sem provocar contaminações no meio de cultura, e facilitar o crescimento de raízes, simulando a mesma condição da aclimatização.

Outro fator que poderia ser considerado para a não formação de raiz no controle é a ausência de qualquer auxina, como o AIA sintetizado pela bactéria em outros tratamentos ou o ácido naftalenoacético, uma auxina sintética muito utilizada na cultura de tecidos. Entretanto, uma boa formação de raízes foi observada no tratamento SAC + BAC, sacarose (SAC) e H<sub>2</sub>O + BAC, não havendo diferenças entre si.

Hoffmann et al. (2001) testaram diferentes substratos misturados a ágar para o desenvolvimento *in vitro* de raízes de porta-enxertos de macieira, e verificaram que essa indução é mais eficiente no ágar, resultado diferente do encontrado no nosso trabalho, onde a formação de raízes foi mais eficiente na presença de substratos. No entanto, eles constataram que a maior sobrevivência foi obtida com plantas enraizadas em meio com ágar com adição do substrato Plantmax®. Demonstrando que o uso do substrato em fase de pré-aclimatização pode favorecer a melhor adaptação da planta a um suporte físico mais poroso e dar início a um sistema radicular mais funcional do que normalmente se observa nos cultivos *in vitro*.

De acordo com os resultados relacionados com o aparato fotossintético foi possível verificar o efeito da sacarose, como fonte de carbono, em todos os tratamentos. A presença da sacarose inibe o processo fotossintético (Tabela 1) influenciando em todas as variáveis relacionadas. Segundo Kozai (1991) plantas micropropagadas na presença de açúcar não desenvolvem capacidade fotoautótrofica, e isso pode levar a um crescimento mais lento, durante a aclimatização, já que demandará toda a adaptação do aparato fotossintético.

Mudanças de condições ambientais e de substrato podem causar mudanças específicas na distribuição de fotoassimilados em plantas cultivadas *in vitro* e afetar os processos metabólicos como a eficiência fotossintética, transporte de água e transpiração, afetando diretamente o crescimento e desenvolvimento das plantas (EPSTEIN; BLOOM, 2005; ARAÚJO; DEMINICIS, 2009).

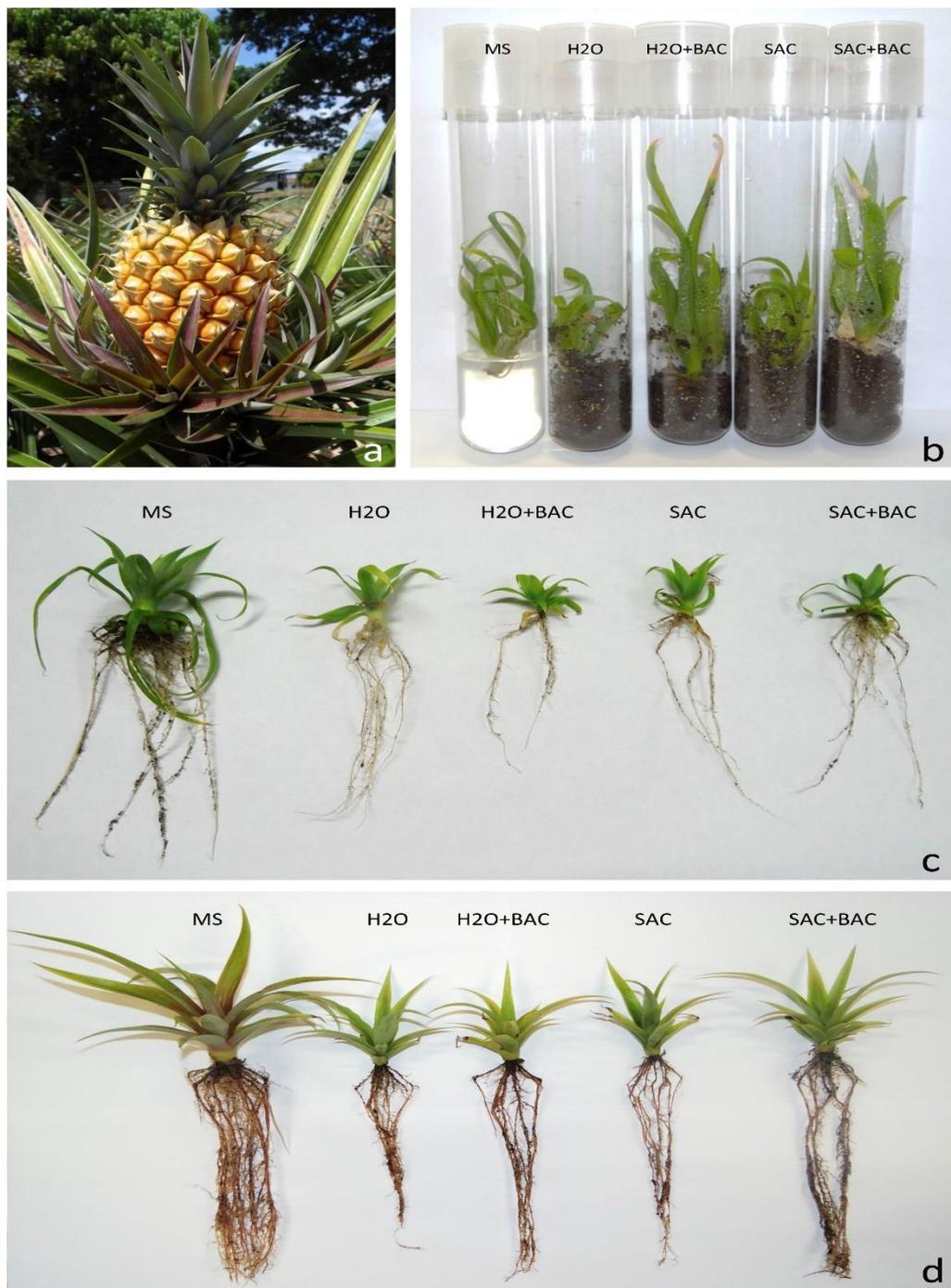
Neste trabalho só se registrou fotossíntese nos tratamentos sem a sacarose. De acordo com Fuentes et al. (2005), trabalhando com coco, a sacarose exógena diminui a atividade carboxilase de ribulose 1,5-bisfosfato (Rubisco), reduzindo a fotossíntese e limitando o crescimento das plantas *ex vitro*. Processo semelhante pode ter ocorrido neste trabalho. Os resultados relacionados com o aparato fotossintético demonstram o efeito da sacarose, como fonte de carbono, em todos os tratamentos e a inibição do processo fotossintético (Tabela 1).

Não são muito conhecidos os efeitos que as bactérias promotoras de crescimento vegetal impõem sobre a fisiologia das plantas em condições *ex vitro*, havendo hipóteses que se referem à melhoria na fotossíntese e aumento no conteúdo relativo de água (CREUS et al., 2004; ZHANG et al., 2009).

Entretanto, como na condição *in vitro* o processo fotossintético não acontece, nas condições estabelecidas, o benefício se dá pela síntese de AIA, regulador fundamental para o crescimento das plantas. Por isso a importância de se escolher uma bactéria promotora de crescimento pela síntese de AIA.

Quanto aos estômatos, os tratamentos com água (H<sub>2</sub>O) e H<sub>2</sub>O + BAC foram os que apresentaram número mais elevado. Isso pode estar relacionado com o fato desses tratamentos terem sido os que permitiram as plantas realizarem

fotossíntese, necessitando assim de mais estômatos para a realização das trocas gasosas.



**Figura 1.** Plantas de abacaxizeiro BRS 'Imperial' em diferentes estágios de cultivo desde *in vitro* até *ex vitro*. a) Abacaxi (*Ananas comosus* var. *comosus*) BRS Imperial; b) Plantas BRS 'Imperial' em diferentes tratamentos na fase de pré-aclimatização *in vitro*; água em substrato; água com rizobactéria em substrato; água + sacarose em substrato; água + sacarose + rizobactéria em substrato; c) Plantas aclimatizadas de BRS Imperial aos 60 dias; d) Plantas aclimatizadas de BRS Imperial aos 180 dias mesmos tratamentos descritos anteriormente.

## **Aclimatização de BRS Imperial**

Para o processo de aclimatização não foram feitas reaplicações da bactéria no substrato e as avaliações consideraram a influência da bactéria na etapa de pré-aclimatização. A escolha de um substrato com baixa concentração de nutrientes, como a fibra de coco deu-se principalmente para evitar a que houvesse uma grande influência de fatores como, os nutrientes sobre o desenvolvimento das plantas. Na Tabela 2 podemos observar os resultados referentes aos três períodos de avaliação da aclimatização das plantas micropropagadas do abacaxi BRS imperial.

Com 60 dias após a aclimatização, o melhor desempenho de crescimento foi registrado nas plantas oriundas do tratamento controle (MS) para todas as variáveis analisadas, com exceção do número de estômatos (NES) que não foi significativo. No entanto, também foram obtidos resultados satisfatórios, tanto para o tratamento SAC+BAC, quanto para o tratamento com apenas H<sub>2</sub>O em algumas variáveis importantes para o crescimento da planta.

Aos 120 dias, algumas variáveis não apresentaram mais diferenças significativas, com uma resposta bastante nivelada entre os tratamentos tais como, LAD, NRZ, COR e NES. Por outro lado o maior crescimento se manteve nas plantas oriundas do tratamento MS, ainda que os tratamentos H<sub>2</sub>O, SAC e SAC+BAC mostraram resultados similares para algumas variáveis como ALT e COD.

Dentre as variáveis avaliadas é preciso destacar que algumas são mais determinantes que outras para a sobrevivência e o crescimento das plantas micropropagadas durante a aclimatização. O número de folhas verdes (NFV) e a massa seca da parte aérea (MSA) estão, sem dúvida, entre as variáveis mais importantes para subsidiar inferências sobre as taxas de crescimento. Assim, o que chama atenção aos 120 dias é que as plantas oriundas do tratamento com apenas H<sub>2</sub>O tenham apresentado o mesmo desempenho que o tratamento MS para a variável NFV, ainda que a MSA tenha sido inferior.

Por outro lado, o número de folhas senescentes (NFS) é um indicador do envelhecimento da planta, que por sua vez é consequência do seu crescimento e é uma variável que deve ser avaliada considerando sempre sua relação com o número de folhas verdes (NFV). Na primeira etapa de avaliação, aos 60 dias, o tratamento MS, além de apresentar um elevado número de folhas verdes, não registrou folhas senescentes, evidenciando bom crescimento e vigor das plantas, visto que a presença de folhas senescentes indica o envelhecimento da planta. No entanto, aos 120 e 180 dias é o tratamento que apresentou os maiores valores para essa variável, mas que é compatível com o crescimento apresentado.

Por outro lado as plantas que vieram do tratamento com H<sub>2</sub>O apresentaram os valores mais baixos para NFS nos dados de 120 e 180 dias. Esse tratamento demanda uma avaliação não apenas acerca dos resultados referentes à essa variável, mas a seu comportamento de forma geral e considerando as variáveis de crescimento. Como visto na fase de pré- aclimatização, a ausência de sacarose estimulou o funcionamento do aparato fotossintético, o que não foi registrado em outros tratamentos, com exceção do tratamento H<sub>2</sub>O + BAC onde também não havia fonte de carbono. Isso pode ter tido um papel determinante para que plantas que não tiveram nenhum tipo de aporte de carbono (sacarose) ou nutricional (sais e vitaminas do MS) ou algum auxílio da bactéria pudessem, não apenas sobreviver na aclimatização, mas apresentar resultados satisfatórios em relação ao crescimento aos 60 e 120 dias de avaliação.

**Tabela 2.** Avaliações quantitativas de plantas da variedade BRS Imperial na aclimatização advindas da pré-aclimatização in vitro com adição de água, sacarose e rizobactéria.

1ª Avaliação com 60 dias após aclimatização												
	ALT	COD	LAD	NFV	NFS	NRZ	COR	NES	MFA	MSA	MFR	MSR
<b>MS</b>	49,38 a	53,70 a	13,04 a	15,00 a	0,00 b	9,60 a	17,31 a	37,15	3,02 a	0,25 a	0,31 a	0,09 a
<b>H2O</b>	34,46 b	30,05 b	8,77 ab	9,40 ab	2,00 ab	6,60 ab	12,39 ab	44,68	0,89 b	0,08 b	0,06 b	0,03 b
<b>H2O + BAC</b>	28,17 b	24,80 b	7,50 b	7,00 b	1,20 ab	4,80 b	11,09 b	42,71	0,71 b	0,06 b	0,05 b	0,02 b
<b>SAC</b>	27,12 b	31,70 b	8,21 b	7,00 b	2,60 a	5,00 b	13,38 ab	36,25	0,78 b	0,07 b	0,08 b	0,03 b
<b>SAC + BAC</b>	28,66 b	37,83 ab	8,57 ab	5,80 b	1,80 ab	6,00 ab	12,71 ab	37,51	0,70 b	0,06 b	0,07 b	0,03 b
CV (%)	22,60	24,95	26,50	28,39	23,97	13,93	23,35	19,73	15,11	4,01	4,83	2,24
<i>F<sub>c</sub></i>	7,51 **	7,84 **	4,01 **	10,77 **	2,38 **	4,71 **	1,69 **	1,17 <sup>ns</sup>	15,45 **	13,01 **	15,52 **	7,42 **
2ª Avaliação com 120 dias após aclimatização												
<b>MS</b>	70,04 a	80,36 a	13,10	13,60 a	6,60 a	12,40	18,71	38,31	6,93 a	0,69 a	0,87 a	0,24 a
<b>H2O</b>	52,74 ab	58,30 ab	11,78	13,40 a	2,20 c	9,40	19,95	38,49	4,38 ab	0,45 b	0,25 b	0,12 b
<b>H2O + BAC</b>	44,38 b	52,70 b	12,96	11,40 b	3,80 bc	11,00	19,35	42,26	3,88 b	0,34 b	0,41 b	0,12 b
<b>SAC</b>	52,78 ab	58,18 ab	11,96	10,00 b	6,20 ab	11,20	19,34	37,60	3,85 b	0,34 b	0,28 b	0,12 b
<b>SAC + BAC</b>	52,02 ab	69,90 ab	11,28	10,40 b	5,20 ab	9,80	18,34	37,69	4,22 ab	0,51 b	0,46 b	0,15 b
CV (%)	18,11	19,92	12,62	16,44	28,87	16,88	5,87	20,72	15,00	9,88	6,66	4,08
<i>F<sub>c</sub></i>	4,59 **	3,83 **	1,29 <sup>ns</sup>	3,73 *	8,54 **	2,16 <sup>ns</sup>	1,55 <sup>ns</sup>	0,17 <sup>ns</sup>	2,91 **	2,69 **	17,34 **	4,83 **
3ª Avaliação com 180 dias após aclimatização												
<b>MS</b>	88,12 a	81,08 a	14,26	14,80 a	3,60 a	15,40 a	20,81	43,34	10,65 a	1,13 a	1,93 a	0,29 a
<b>H2O</b>	55,72 b	50,02 b	13,46	12,60 b	0,20 d	9,40 b	15,43	44,15	3,95 b	0,37 b	0,75 b	0,08 c
<b>H2O + BAC</b>	64,80 b	54,38 b	12,46	13,80 b	1,00 c	11,20 b	18,62	38,04	5,12 b	0,47 b	0,64 b	0,14 b
<b>SAC</b>	53,66 b	47,46 b	11,36	11,20 c	0,80 c	10,00 b	18,74	39,21	3,71 b	0,34 b	0,96 b	0,10 c
<b>SAC + BAC</b>	59,04 b	59,26 b	11,66	11,00 c	2,40 b	12,00 ab	17,83	42,89	4,89 b	0,48 b	1,19 ab	0,16 b
CV (%)	13,42	13,16	17,39	12,91	26,05	18,00	14,27	12,06	10,90	6,53	9,89	3,21
<i>F<sub>c</sub></i>	13,15 **	15,23 **	1,53 <sup>ns</sup>	5,02 **	8,57 **	6,35 **	1,20 <sup>ns</sup>	1,47 <sup>ns</sup>	19,20 **	23,84 **	12,97 **	18,65 **

ALT = altura da planta (mm); COD = comprimento da folha "D"; LAD = largura da folha "D" (mm); NFV = número de folhas verdes; NFS = número de folhas senescentes; NRZ = número de raízes; COR = comprimento das raízes (mm); NES = número de estômatos (mm<sup>2</sup>); MFA = massa fresca da parte aérea (g); MSA = massa da matéria seca da parte aérea (g); MFR = massa da matéria fresca da raiz (g); MSR = massa seca da raiz (g).

Aos 180 dias os resultados superiores do controle (MS) se consolidam, inclusive para o número de raízes (NRZ), variável que volta a ser significativa entre os tratamentos e deixa evidente que os efeitos positivos obtidos pela inoculação da bactéria na etapa de pré-aclimatização não se mantêm ao longo da acclimatização. O meio MS, rico em macro e micronutrientes parece ter influenciado em maior grau os resultados da acclimatização, e proporcionado um melhor desempenho das plantas nessa etapa, ainda que as plantas vindas desse tratamento tenham chegado ao final do ensaio *in vitro* com desempenho inferior, quando comparadas às demais. O fato de ter melhor se adaptado à fase de acclimatização, pode ser atribuída a uma reserva nutricional maior, e assim conseguem resistir melhor ao impacto causado pela mudança brusca de ambiente. Resultado similar foi obtido por Fuentes et al. (2005) com coco.

O uso do substrato inerte e a ausência de novas inoculações durante a acclimatização podem ter desfavorecido as plantas vindas dos tratamentos, quando comparadas ao controle MS, que tinham uma reserva nutricional bem mais elevada. Tal fato evidencia que novas aplicações de rizobactérias poderiam garantir a síntese de AIA e auxiliar o crescimento esperado nesta etapa.

Outra hipótese, mais relacionada com a aplicação da bactéria na pré-acclimatização, é a de que a bactéria inoculada nesta fase, não tenha sido capaz de sobreviver no ambiente da acclimatização, em função de competição com outros microrganismos ali presentes. A consequência seria uma redução na sua população e perda da eficácia de sua ação. Isso faz com que sejam necessários estudos posteriores, com reaplicação da bactéria em casa de vegetação para que se possa avaliar melhor a ação do microrganismo.

Os resultados obtidos neste trabalho podem subsidiar novos ensaios para a melhoria dessa importante etapa da micropropagação, tais como realizar aplicações na etapa de acclimatização, aprofundar os estudos sobre a retirada da sacarose ainda na pré-acclimatização e considerar, nesses novos estudos, a

interação desses tratamentos com as adubações regulares feitas pelas biofábricas.

## CONCLUSÃO

A presença de rizobactérias produtoras de ácido indolacético estimula o crescimento de mudas de abacaxizeiro em pré-aclimatização;

A combinação de sacarose com bactéria (SAC+BAC) em substrato incrementa o desenvolvimento das plantas na fase de pré-aclimatização desde a parte aérea até o sistema radicular;

A ausência de fonte de sacarose na fase de pré-aclimatização induz o funcionamento do aparelho fotossintético das plantas *in vitro* resultando em benefícios na fase de aclimatização;

A utilização de substrato comercial na fase de pré-aclimatização não se apresentou como alternativa viável em substituição do meio MS, em virtude de afetar negativamente o crescimento das plantas na etapa de aclimatização.

Plantas de abacaxizeiro BRS Imperial provenientes de uma pré-aclimatização em meio MS, apresentam um maior desempenho de crescimento, quando comparadas com as plantas vindas de pré-aclimatização em substrato comercial Vivatto®;

A aplicação de rizobactérias na etapa *in vitro* não causa efeito sobre o comportamento das plantas na etapa de aclimatização;

## BIBLIOGRAFIA

ARAÚJO, S. A. C.; DEMINICIS, B. B. Fotoinibição da Fotossíntese. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 7, n. 4, p. 463-472, 2009.

BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; GIRO, V. B.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; SMITH, R. B. Desempenho do abacaxizeiro 'vitória' em resposta à aplicação de ácidos húmicos durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33:979-990, 2009.

BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; OLIVARES, F. L.; VIANA, A. P.; SMITH, R. B. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar vitória durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, p.349-360, 2010.

BRAGA, F. T.; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M.; RAFAEL, G. C. Características morfofisiológicas de abacaxizeiro 'gomo de mel' enraizado in vitro sob luz natural e substrato vermiculita. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 2, p. 551-557, 2011.

CASTRO, P. R. C.; VIEIRA, E. L. Aplicações de reguladores vegetais na agricultura tropical. **Guaíba: Agropecuária**, 132p, 2001.

CATTELLAN, A. J. Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com rizobactérias promotoras de crescimento vegetal. **Embrapa Soja**, Londrina, 36p 1999.

CREUS, C. M.; SUELDO, R. J.; BARASSI, C. A. Water relations and yield in Azospirillum-inoculated wheat exposed to drought in the field. **Canadian Journal of Botany**, v.82, p.273–281, 2004.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Micropropagação fotoautotrófica e uso da luz natural. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.4, p.961-965, 2005.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas. **Editora Planta**, 2º ed, 2006.

FAO. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e agricultura. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>. Acesso em 30 de Junho de 2016.

FREITAS, S. J.; CARVALHO, A. J. C.; BERILLI, S. S.; SANTOS, P. C.; MARINHO, C. S. Substratos e osmocote na nutrição e desenvolvimento de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Vitória. **Revista Brasileira Fruticultura**. Jaboticabal, Volume Especial, E. 672-679, 2011.

FUENTES, G.; TALAVERA, C.; OROPEZA, C.; DESJARDINS, Y.; SANTAMARIA, J. M. Exogenous sucrose can decrease *in vitro* photosynthesis but improve field survival and growth of coconut (*Cocos nucifera* L.) *in vitro* plantlets. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, 41: 69, 2005.

HOFFMANN, A.; PASQUAL, M.; CHALFUN, N. N. J.; VIEIRA, S. S. N. Substratos na indução e desenvolvimento *in vitro* de raízes em dois porta-enxertos de macieira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, vol. 36, no. 11, pp. 1371–1379, 2001.

KOZAI, T. Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, T.H. Micropropagation technology and application. **Dordrecht: Kluwer**, 484p, 1991.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. Microbiologia de Brock. 14<sup>o</sup> edição, **Artmed**, 931p, 2016.

MORAES, A. M.; ALMEIDA, F. A. C.; BRUNO, R. L. A.; FILHO, J. C.; NUNES, S. T.; GOMES, J. P. Micropropagação de abacaxizeiro cv. Emepa 1<sup>o</sup>. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.14, n.9, p.932–936, 2010.

MUNIZ, A. W.; SÁ, E. L.; DALAGNOL, G. L.; FILHO, J. A. Rooting and acclimatization of micropropagated marubakaido apple rootstock using *Adesmia latifolia* rhizobia. **Journal Springer Plus**. Vol. 2, n. 437, 2013.

MURASHIGE, T.; SKOOG F. A. A revised medium for a rapid growth and bioassays with tobacco tissues cultures. **Plant Physiol** 15: 473-479. 1962.

RADWAN, T. E. E.; MOHAMED, Z. K.; REIS, V. M. Aeração e adição de sais na produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.10, p.997-1004, 2005.

SILVA, A. B.; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M.; MIYATA, L. Y.; MELO, L. M.; BRAGA, F. T. Luz natural na micropropagação do abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr). **Revista ciência e Tecnologia das Américas**, V. 33 n. 11, 2008.

SOUZA, F. V. D.; SOUZA, A. S.; SANTOS-SEREJO, J. A. S.; SOUZA, E. H.; JUNGHANS, T. G.; SILVA, M. J. Micropropagação de abacaxizeiro e outras bromélias. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. (Eds.). Aspectos práticos da micropropagação de plantas. **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**, Cruz das Almas, p. 177-205. 2009

TEIXEIRA, J. B.; CRUZ, A. R. R.; FERREIRA, F.R.; CABRAL, J. R. Biotecnologia aplicada à produção de mudas: Produção de mudas micropropagadas de abacaxi. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v 3, N 19, p.42-47, 2001.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia. 10<sup>o</sup> edição, **Artmed**, p.113-153, 2012.

VAN LIER, Q. J. Oxigenação do sistema radicular: uma abordagem física. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 25:233-238, 2001.

WEBER, O. B.; CORREIA, D.; SILVEIRA, M. R. S.; CRISÓSTOMO, L. A.; OLIVEIRA, E. M. & SÁ, E.G. Efeito da bactéria diazotrófica em mudas micropropagadas de abacaxizeiros Cayenne Champac em diferentes substratos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v 38, p. 689-696, 2003.

ZHANG, M.; ZHAO, D.; MA, Z.; LI, X.; XIAO, Y. Growth and photosynthethetic capability of *Momordica grosvenori* plantlets grown photoautotrophically in response to light intensity. **Hort Science**, 44:757-763, 2009.

## **CAPÍTULO III**

---

**Crecimiento de mudas micropropagadas de abacaxizeiro em  
substratos suplementados com rizobactérias  
produtoras de ácido indolacético.**

## RESUMO

GONÇALVES, J. S. **Crescimento de mudas micropropagadas de abacaxizeiro em substratos suplementados com rizobactérias produtoras de ácido indolacético**. Cruz das Almas, 2016. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

A técnica de micropropagação *in vitro* para abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill) resulta em plantas saudáveis, homogêneas e em grande quantidade. Embora mesmo com essas vantagens, a fase de aclimatização requer um longo período, tornando a produção de mudas atividade de elevado custo. A redução desse período tem sido estudada. O uso de um substrato adequado, bem como bactérias com capacidade de produzir substâncias que induzam o crescimento da planta, pode se tornar uma alternativa viável na minimização desses longos períodos e facilitar o processo de adaptação das plantas ao chegar ao campo. Com isso o objetivo do nosso trabalho foi avaliar o tempo de aclimatização de plantas micropropagadas de abacaxi, utilizando diferentes substratos de cultivo suplementados com rizobactérias produtoras de ácido indolacético. Plantas de abacaxizeiro da variedade Imperial foram cultivadas em diferentes substratos: Turfa, fibra de coco, vivatto®, fibra de coco + vivatto®, fibra de coco + Vermiculita e fibra de coco + turfa e, a estes foi adicionado, a cada 15 dias uma combinação de rizobactérias. Foram feitas avaliações ao longo do tempo e mensuradas características de crescimento: Altura, número de folhas, comprimento da raiz, massa fresca e seca de parte aérea e massa fresca e seca do sistema radicular. Os resultados observados mostram que o uso do substrato fibra de coco + turfa com adição de rizobactérias proporciona um maior crescimento das plantas de abacaxizeiro, sendo assim uma alternativa para redução do período de aclimatização.

**Palavras-chave:** *Ananas comosus* (L.) Merr., ácido indolacético, aclimatização.

## ABSTRACT

GONÇALVES, J. S. **Growth promoting rhizobacteria application in pineapple plants grown on different substrates.** Cruz das Almas, 2016. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia.

The micropropagation in vitro for pineapple (*Ananas comosus* L. Merrill) results in healthy plants, homogeneous and plenty. Although even with these advantages, the acclimatization phase requires a long period, making the production of seedlings with high cost. The reduction of this period has been studied. The use of a suitable substrate and bacteria capable of producing substances that induce plant growth can become a viable alternative in minimizing these long periods and improve the adaptation of plants to reach the field. Thus the aim of our study was to reduce the time of acclimatization of micropropagated pineapple plants, using different culture substrates supplemented with producing rhizobacteria indole acetic acid. variety of Imperial pineapple plants were grown on different substrates: peat, coir, vivatto®, coir + vivatto®, coir, vermiculite + peat and coconut fiber, and to this was added every 15 days a combination of rhizobacteria. Patients were evaluated over time and measured growth characteristics: height, leaf number, root length, fresh and dry weight of shoot and fresh and dry weight of the root system. Our results show that use of coconut fiber substrate with the addition of peat + rhizobacteria provides a better performance of the pineapple plants so as an alternative to reduce the acclimatization period.

**Keywords:** *Ananas comosus* (L.) Merr., indole acetic acid, acclimatization.

## INTRODUÇÃO

A cultura do abacaxi está amplamente disseminada nos países de região tropical e o Brasil destaca-se como segundo maior produtor mundial (FAO, 2016). No entanto, a produtividade ainda é baixa, devido principalmente à qualidade das mudas plantadas e manejo inadequado de práticas de cultivo (WEBER et al., 2003). Diante disso, a propagação de plantas *in vitro* tem sido uma boa opção para o aumento e melhoria na produtividade da cultura do abacaxi, uma vez que, a técnica possibilita a obtenção de mudas de qualidade (BALDOTTO et al., 2010).

Após a etapa *in vitro* as plantas passam para a aclimatização em condições *ex vitro*, período necessário para que se adaptem às condições de campo. Essa etapa é considerada crítica, devido à grande diferença entre os dois ambientes. A perda do vigor e a consequente morte devido ao dessecamento são sérios problemas que ocorrem com plantas transferidas das condições *in vitro* para a condição *ex vitro* em casa de vegetação (MOREIRA et al., 2006).

A manutenção da alta umidade relativa dentro da casa de vegetação, as condições de sombreamento, o uso adequado de recipientes e substrato para plantio, estão entre os fatores que podem otimizar esse processo (BRAGA et al., 2011).

Diferentes estudos têm sido realizados visando a redução do período de aclimatização do abacaxizeiro, com o intuito de acelerar o crescimento e o desenvolvimento das plantas, como a aplicação de reguladores de crescimento (CATUNDA et al., 2008), emprego de diferentes substratos usados no enraizamento (WEBER et al., 2003; MOREIRA et al., 2006), aplicação de ácidos húmicos (BALDOTTO et al., 2009) e a aplicação de bactérias promotoras de crescimento vegetal (WEBER et al., 2003; BALDOTTO et al., 2010).

Em relação ao substrato de cultivo, este deve possuir capacidade de reter umidade e não compactar excessivamente, comprometendo a drenagem e a aeração radicular (SOUZA JÚNIOR et al., 2001) além de possuir nutrientes para as plantas. A escolha adequada do substrato pode reduzir a mortalidade das plantas e melhorar as condições nutricionais (MOREIRA et al., 2006).

O uso de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas associados a um substrato adequado pode ter efeitos benéficos, tornando-se uma alternativa

viável na redução do período de aclimatização das plantas de abacaxizeiros e na melhoria das características fisiológicas, fazendo com que tenham melhor adaptação as condições de campo.

Dentre os efeitos benéficos observados pelo uso desses microrganismos, podem ser citados o aumento na taxa de germinação de sementes, maior rendimento na cultura, aumento na taxa de sobrevivência após o transplante e tolerância a estresses bióticos e abióticos (VESSEY, 2003).

Atuam através de diversos mecanismos de ação, podendo-se citar a produção de substâncias antimicrobianas e síntese de reguladores de crescimento como o ácido indolacético (AIA) (POLLI et al., 2012). Essa auxina atua como um mensageiro químico e exerce um papel fundamental no crescimento e desenvolvimento nas plantas (CASTRO; VIEIRA, 2001).

O uso desses microrganismos vem sendo utilizado com sucesso em diferentes culturas. Kozusny-Andreani et al. (2012), trabalhando com mudas de Salsa (*Petroselinum crispum*) obtiveram 100% de germinação, aumento de massa fresca de parte aérea e melhor desenvolvimento de raízes, em virtude da aplicação de rizobactérias promotoras de crescimento.

Cunha et al. (2013) utilizaram isolados de rizobactérias com o intuito de otimizar o processo de produção de mudas de Sibipiruna (*Caesalpinia pluviosa*), como resultado tiveram um aumento na porcentagem de germinação das sementes e aumento de massa seca do sistema radicular.

Baldotto et al. (2010) selecionaram estirpes de bactérias promotoras de crescimento em plantas abacaxizeiro 'Vitória' com o objetivo de promover uma melhor adaptação da planta na aclimatização. Observaram aumentos em mais de 50% no crescimento da planta e nas características nutricionais. Diante disso, o trabalho objetivou avaliar o crescimento das plantas de abacaxizeiros no período de aclimatização utilizando diferentes substratos comerciais com aplicação de rizobactérias produtoras de ácido indolacético, em plantas provenientes de cultivo *in vitro* com o intuito de reduzir o longo período de aclimatização.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Seleção dos isolados**

Foram utilizados 200 isolados, obtidos a partir da rizosfera de abacaxizeiros sadios, mantidos no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Mandioca e fruticultura. Atualmente esses isolados encontram-se na coleção microbiológica do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Resíduos Orgânicos da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Estes foram submetidos a ensaios para detecção *in vitro* da capacidade de síntese de ácido indolacético (AIA). Para isso, os isolados foram transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura TSA (trypticase soy agar) 1/10 enriquecido com 5 mM de L-Triptofano ( $1,021 \text{ g L}^{-1}$ ). Em seguida, o meio de cultura foi coberto com uma membrana de nitrocelulose e as placas de Petri incubadas a 28 °C, por 24 horas. Após este período, as membranas foram removidas do meio de cultura e saturadas com solução de Salkowski. Os isolados que proporcionaram o aparecimento de halo avermelhado na membrana, no período entre 30 minutos e 2 horas, foram considerados produtores de AIA (CATTELLAN, 1999). Foram utilizadas três repetições para cada isolado. Dos 200 isolados testados de rizobactérias, 26 foram selecionados por terem apresentado formação de halo avermelhado.

### **Teste de antibiose recíproca**

Estudos relativos à produção de substâncias antimicrobianas entre os isolados selecionados no ensaio anterior foram realizados, vislumbrando a possibilidade do uso dos mesmos em combinações. Realizou-se o teste de dupla camada adaptado de Stonier (1960), onde os isolados foram, inicialmente, incubados em placa de Petri contendo meio nutriente ágar (NA) a 28 °C, por 24 horas. Decorrido esse intervalo, as colônias foram mortas por exposição a vapores de clorofórmio. Rizobactérias possivelmente inibidas foram adicionadas a 10 mL de meio NA semi-fundente e a seguir vertidos sobre o mesmo meio de cultura contendo o isolado inibidor. O aparecimento de halos de inibição foi verificado por inspeções diárias durante quatro dias. Foram feitas três repetições para cada teste com rizobactéria.

## **Ensaio de crescimento de mudas micropropagadas de abacaxizeiro em substratos suplementados com rizobactérias na fase de aclimatização.**

Foram utilizadas mudas micropropagadas de abacaxizeiro 'BRS Imperial' do quinto subcultivo em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) sem regulador com cerca de 3 cm de altura. As plantas foram aclimatizadas em tubetes de 240 cm<sup>3</sup> contendo diferentes substratos comerciais e mantidas em telado com sombrite de 70 % e umidade relativa variando de 70 a 80 %.

Os substratos comerciais foram:

### **Tratamentos**

---

Turfa

Fibra de coco

Vivatto®

Vivatto® + Fibra de coco (1:1)

Fibra de coco + Vermiculita (3:1)

Fibra de coco + Turfa (1:1)

---

As rizobactérias foram aplicadas aos substratos em combinações de três isolados. Esses isolados foram crescidos em meio caldo nutriente por 24 horas a 28 °C. Em seguida, 200 µL foram adicionados em placas de Petri contendo meio NA, onde foram mantidas por 24 horas, na mesma temperatura anterior. Foram aplicados ao substrato 20 mL na forma de solução aquosa, ajustada para 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, e na proporção de 0,1 mL cm<sup>-3</sup> de substrato. As aplicações das rizobactérias tiveram início no dia do transplante e a cada 15 dias até os 180 dias. Foram feitas três avaliações após 60, 120 e 180 dias após o estabelecimento das plantas em substrato. Foram avaliadas as seguintes variáveis: altura da planta (cm), número de folhas, comprimento da raiz (cm), massa fresca (g) e massa seca (g) da parte aérea e do sistema radicular.

Além das variáveis avaliadas, foi calculado um índice de crescimento (IC) para cada substrato, englobando todas as variáveis. Para o cálculo, a média das repetições de cada variável do tratamento controle foi considerada como valor 100. Foram feitas as comparações por meio de regra de três em relação às repetições das variáveis onde as rizobactérias foram aplicadas. Somados os sete valores atribuídos, o controle apresentava IC igual a 700.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 2 X 6 (ausência e presença de rizobactéria X seis substratos comerciais) com 30 plantas por tratamento, sendo cada avaliação, composta por cinco plantas, pois as análises foram destrutivas. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade, pelo programa SAS (SAS Intitute, 2010).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Seleção dos isolados**

Dos 200 isolados testados quanto a produção de ácido indolacético, 26 foram considerados positivos por apresentar formação de halo avermelhado.

Os 26 isolados de rizobactérias considerados positivos, passaram por o teste de antibiose recíproca, para que pudesse fazer uso de combinações. Cinco deles apresentaram restrições entre si, sendo assim descartado para o ensaio de casa de vegetação.

A escolha dos três isolados se deu principalmente, em função de apresentarem um rápido crescimento em meio de cultura.

### **Aclimatização das plantas**

Foi observada diferença significativa para todas as variáveis analisadas, para todos os tratamentos bem como, para todos os períodos de avaliação (Tabela 1). Após 60 dias de aclimatização, o cultivo das plantas em fibra de coco + vivatto® com a presença das rizobactérias foi o que apresentou a maior altura de plantas, comprimento da raiz, massa fresca e seca da parte aérea e raiz, com resultados significativamente superiores à ausência de rizobactérias nesse mesmo substrato. Em contrapartida, o cultivo das plantas em turfa não proporcionou um bom desenvolvimento das plantas conforme as variáveis analisadas. O tratamento fibra de coco com adição das rizobactérias, foi superior apenas para a variável número de folhas, quando comparados aos demais tratamentos.

A composição fibra de coco + vermiculita com aplicação das bactérias proporcionou um ganho na matéria fresca da raiz.

De forma geral aos 60 dias, as rizobactérias demonstram uma maior homogeneização diminuindo as diferenças entre os substratos, isso é considerado um efeito positivo, visto que os substratos têm ação direta sobre o crescimento das plantas.

Aos 120 dias de aclimatização (Tabela 1), o Vivatto® com a combinação de bactérias, mostrou-se como o melhor substrato de cultivo, promovendo um maior crescimento para as plantas, com um maior incremento para número de folhas, comprimento da raiz e matéria seca da parte aérea; nas demais variáveis não apresentou diferença significativa.

A combinação de fibra de coco + turfa com adição das bactérias também apresentou resultados significativos para massa fresca da parte aérea, massa fresca e seca da raiz.

Os demais tratamentos não se mostraram eficientes para o cultivo de abacaxizeiro pelas variáveis analisadas. Novamente o tratamento composto por Turfa não apresentou bom desempenho para nenhuma das variáveis analisadas.

A variável comprimento de raiz nessa avaliação demonstra uma homogeneidade maior entre os tratamentos quando na presença de bactérias, muito embora só haja diferença significativa no tratamento Vivatto®.

**Tabela 1.** Aclimatização de plantas de abacaxizeiros (*A. comosus* var. *comosus*) cv. BRS Imperial em diferentes substratos na presença e ausência de rizobactérias aos 60, 120 e 180 dias de avaliação após plantio.

Tratamentos	Altura da planta (cm)		Número de folhas		Comprimento da raiz (cm)		Matéria fresca da parte aérea (g)		Matéria seca da parte aérea (g)		Matéria fresca da raiz (g)		Matéria seca da raiz (g)	
	Sem Bactéria	Com Bactéria	Sem Bactéria	Com Bactéria	Sem Bactéria	Com Bactéria	Sem Bactéria	Com Bactéria	Sem Bactéria	Com Bactéria	Sem Bactéria	Com Bactéria	Sem Bactéria	Com Bactéria
	60 dias													
Turfa	5,12 cA	5,15 dA	12,25 bcA	12,75 bA	2,86 dA	2,85 cA	0,67 dA	0,94 cA	0,07 dA	0,09 cA	0,09 aA	0,05 cA	0,02 aA	0,02 bcA
Fibra de coco	5,61 cA	5,53 cdA	10,86 cB	15,86 aA	12,40 abA	12,01 abA	1,38 cA	1,57 bcA	0,11 cA	0,13 bcA	0,11 aA	0,11 bA	0,03 aA	0,04 aA
Vivato	7,83 bA	7,88 abA	13,83 abcA	15,00 aA	7,05 dB	9,43 bA	2,08 bA	2,51 abA	0,18 bA	0,22 abA	0,07 aA	0,10 bA	0,02 aA	0,03 abA
Fibra + Vivato	7,43 bB	8,66 aA	16,00 abA	15,57 aA	10,13 bcB	13,57 aA	2,67 aB	3,68 aA	0,23 aB	0,30 aA	0,08 aB	0,13 bA	0,02 aB	0,05 aA
Fibra + Verm.	6,44 bcA	7,00 bcA	15,14 abcA	16,14 aA	13,78 aA	14,70 aA	2,01 bB	3,10 aA	0,17 bB	0,27 aA	0,11 aB	0,17 aA	0,04 aA	0,05 aA
Fibra + Turfa	9,34 aA	9,07 aA	17,14 aA	16,67 aA	9,36 bcB	12,25 aA	2,78 aA	3,26 aA	0,26 aA	0,30 aA	0,07 aA	0,07 cA	0,03 aA	0,03 abA
CV	12,23**		17,24**		18,80**		30,18**		30,37**		48,03**		40,41**	
120 dias														
Turfa	5,78 bA	6,50 cA	7,83 bA	9,16 bA	1,30 cA	2,91 bA	0,84 bA	1,59 cA	0,08 bA	0,17 cA	0,05 bA	0,07 Ca	0,01 bA	0,02 bA
Fibra de coco	6,18 bA	6,22 cA	8,28 bA	10,57 bA	15,90 aA	14,10 aA	1,45 bA	1,92 cA	0,12 bA	0,16 cA	0,08 abA	0,13 bcA	0,03 bA	0,03 bA
Vivato	10,68 aA	12,53 abA	11,40 abB	14,66 aA	9,38 bB	14,93 aA	4,83abB	8,60 abA	0,39 bB	0,67 abA	0,14 abA	0,25 abA	0,04 abA	0,04 bA
Fibra + Vivato	10,34 aA	9,96 bA	13,14 aA	13,00 abA	14,61 abA	16,61 aA	4,28abA	4,93 bcA	0,35 bA	0,41 bcA	0,12 abA	0,15 abcA	0,03 bA	0,05 bA
Fibra + Verm.	5,98 bA	6,35 cA	8,16 bA	9,66 bA	9,23 bB	14,38 aA	1,38 bA	2,03 cA	0,15 bA	0,17 cA	0,10 abA	0,11 bcA	0,04 abA	0,06 abA
Fibra + Turfa	13,43 aA	13,93 aA	14,50 aA	14,50 aA	15,53 abA	17,68 aA	8,53 aB	11,55 aA	0,87 aA	0,99 aA	0,25 abA	0,32 aA	0,09 Aa	0,10 aA
CV	23,07**		20,67**		31,02**		60,70**		61,76**		67,34**		66,55**	
180 dias														
Fibra de coco	6,07 dA	7,12 dA	10,42 bA	11,71 cA	16,81 aA	17,30 bA	1,77 bA	2,59 bA	0,15 cA	0,22 cA	0,06 bA	0,11dA	0,02 cA	0,04 cA
Vivato	15,10 aA	14,58 bA	17,60 aA	18,83 aA	17,50 aA	19,58 abA	17,55 aA	21,17 aA	1,57 aA	1,91 bA	0,59 aA	0,86 cA	0,17 abA	0,26 bA
Fibra + Vivato	12,13 bA	12,01 cA	16,50 aA	15,50 bA	15,71 aA	21,58 aA	11,00 aA	9,45 cA	0,91 abA	0,83 cA	0,34 abA	0,57 bcA	0,11 abcB	0,21 bA
Fibra + Verm.	8,66 cA	8,01 dA	11,16 bA	12,28 cA	18,05 aA	19,92 abA	3,28 bA	3,38 cA	0,29 bcA	0,31 cA	0,16 abA	0,18 cdA	0,06 bcA	0,07 cA
Fibra + Turfa	14,02 abB	18,20 aA	15,00 aB	18,50 aA	19,20 aA	20,58 abA	13,55 aB	29,68 aA	1,41 aB	2,95 aA	0,53 aB	1,57 aA	0,21 Ab	0,51 aA
CV	11,80**		11,95**		14,12**		42,49**		44,77**		55,79**		51,16**	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de tukey a 1 % de probabilidade\*\* altamente significativo com  $P < 0,01$ .

Após 180 dias de aclimatização (Tabela 1), o tratamento composto por turfa já havia perdido todas as suas repetições, devido a morte total das plantas. Nos demais tratamentos foram feitas a última avaliação.

O tratamento de fibra de coco + turfa com adição das rizobactérias, consolida ainda mais o seu efeito. E após seis meses de aclimatização foi o que melhor promoveu o crescimento das plantas, aumentando o ganho de altura, número de folhas, massa fresca da parte aérea, massa seca de parte aérea, massa fresca de raiz e massa seca de raiz.

O tratamento Vivatto® com adição das bactérias promoveu um incremento para número de folhas e massa fresca da parte aérea.

Fibra de coco + Vivatto com aplicação das rizobactérias foi a melhor combinação para crescimento de raiz nessa avaliação.

De maneira geral o substrato fibra de coco + turfa proporcionou os melhores resultados, seguido de Vivatto® e fibra de coco + Vivatto®, ambos com adição das bactérias. Já a turfa quando testada isoladamente teve um efeito negativo, afetando a sobrevivência e desenvolvimento das plantas, de tal maneira que não foi possível realizar a última avaliação em função da perda total das plantas.

Isso pode ter ocorrido em função da baixa aeração do substrato, bem como pela baixa drenagem de água. Verificava-se, no momento de irrigação das plantas, que a água necessitava de um tempo maior para penetrar por completo no substrato.

Mesmo obtendo a mesma frequência de irrigação que os demais substratos testados, a Turfa se mantinha sempre muito seca. Segundo Nascente et al. (2005) plantas de abacaxizeiro tem preferência por solos de textura média ou arenosa. Isso pode ter sido o responsável pelo baixo desenvolvimento do sistema radicular, e com isso uma diminuição na absorção de água e nutrientes. O que refletiu diretamente em um baixo crescimento da parte aérea das plantas e no número de folhas.

Os resultados de Menezes et al. (2000) estão de acordo com os obtidos nesse trabalho, ao utilizar o substrato turfa. Os autores verificaram que a baixa aeração prejudicou o desenvolvimento do sistema radicular, possivelmente por dificultar a difusão do oxigênio pelas raízes, acarretando uma menor massa seca, e ao comprometimento da parte aérea, conseqüentemente.

Apesar da fibra de coco ser o substrato comumente utilizado pelas biofábricas para a produção de mudas de abacaxizeiro, verificou-se que ela proporcionou baixo desenvolvimento das plantas quando comparado com os demais substratos testados. Esse resultado também foi semelhante para a mistura de fibra de coco + vermiculita.

Já o substrato tratamentos Vivatto® e a combinação de fibra de coco + Vivatto® proporcionaram resultados satisfatórios, tanto na presença quanto na ausência das rizobactérias, ambos com valores semelhantes, apresentando assim como uma melhor alternativa para o cultivo de abacaxizeiro em aclimatização. Esses resultados já foram constatados por vários autores. Cunha Filho et al. (2008) também verificaram que plantas de abacaxizeiro ornamental advindas do cultivo *in vitro*, tinha um bom desenvolvimento quando cultivadas nos substratos Plantmax® e fibra de coco. Já Moreira et al. (2006) não obtiveram bons resultados com o substrato Plantmax® quando utilizado isoladamente, mas quando misturado ao esterco, obtiveram-se resultados satisfatórios.

A combinação de fibra + turfa com adição dos microrganismos foi a que proporcionou o melhor desempenho para a planta. Esse resultado provavelmente se deve ao fato da mistura resultar numa boa aeração, boa drenagem de água e possivelmente uma grande quantidade de matéria orgânica, proveniente da turfa. Pio et al. (2005) citaram que a fibra de coco proporcionou melhor enraizamento em estacas de herbácea de figueira (*Ficus carica* L.), em função de apresentarem cerca de 50% de porosidade de aeração. E segundo Lamim et al. (2001), a turfa seca tem cerca de 60% de matéria orgânica. Essa mistura possivelmente favoreceu as plantas de forma bastante positiva.

Alguns trabalhos vêm relatando a importância da matéria orgânica para a produção de mudas de abacaxizeiro. Moreira et al. (2006), verificaram que somente na presença de solo ou do substrato comercial Plantmax® sem um incremento de matéria orgânica, plantas de abacaxizeiro Pérola tiveram um desenvolvimento muito baixo quando comparadas com plantas na presença de matéria orgânica. Os tratamentos que continham composto orgânico e esterco proporcionaram um maior incremento para a planta, tanto de parte aérea, como do sistema radicular.

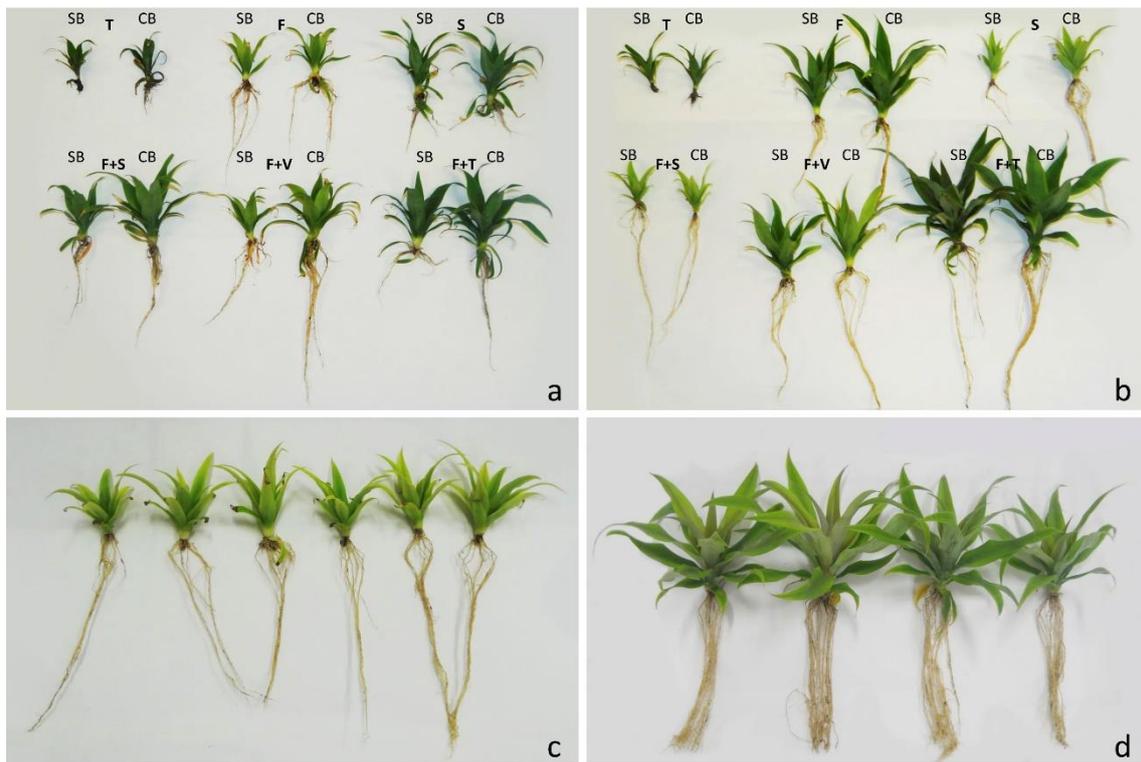
Isso também foi verificado no trabalho de Baldotto et al. (2009), onde plantas de abacaxizeiro Vitoria tiveram ganhos no crescimento de parte aérea e de raiz, quando cultivados com ácidos húmicos.

Nos tratamentos com a presença das rizobactérias, houve um incremento para algumas variáveis analisadas, mostrando o efeito benéfico de sua aplicação. Resultado esse, semelhante ao encontrado por Weber et al. (2003), quando utilizou bactérias diazotróficas em casa de vegetação, para a promoção do crescimento de diferentes cultivares de abacaxizeiros micropropagados. E conseguiram com a aplicação dos microrganismos uma redução no tempo de aclimatização em cerca de 40 dias. Isso demonstra o grande potencial de uso desses microrganismos para estímulo do crescimento de plantas. Podendo vir a ser destinados à aplicação em larga escala por meio de formulados de bioprodutos.

Um fato observado, e não esperado, ocorreu no comprimento da raiz, local onde efetivamente as rizobactérias agiriam, e onde foram feitas aplicações até o final do experimento. Na primeira avaliação houve diferenças significativas para essa variável entre três tratamentos: fibra de coco + vivatto, fibra de coco + Vermiculita e fibra de coco + turfa. Já na segunda avaliação esse número caiu para dois tratamentos: vivatto e fibra de coco + turfa, e na terceira avaliação já não se verificaram diferenças com os controles, onde não houve aplicação das rizobactérias. Segundo Dobbelaere et al. (1999), uma das respostas da planta ao ser feita a aplicação com microrganismos produtores de AIA é o crescimento das raízes.

No entanto, Bashan & Holguin (1997) afirmam que somente esse mecanismo de ação não seria capaz de explicar o crescimento da planta, sendo que este é resultado da ação de vários mecanismos atuando em conjunto.

Nas figuras 1a e 1b pode-se visualizar a diferença entre os tratamentos com e sem inoculação dos microrganismos com 60 e 120 dias de aclimatização. Na figura 1c e 1d há uma comparação entre o pior e o melhor tratamento. Isso nos mostra a influência do tipo de substrato de cultivo para o crescimento de plantas de abacaxizeiro e a influência das bactérias nesse processo.



**Figura 1.** Plantas de abacaxizeiros cv. BRS Imperial em diferentes substratos na presença e ausência de rizobactérias. a) Avaliação aos 60 dias após aclimatização. b) Avaliação aos 120 dias após aclimatização. c) Tratamento Fibra de coco com rizobactéria aos 180 dias após aclimatização. d) Fibra + Turfa com rizobactéria aos 180 dias após aclimatização. SB = sem rizobactéria; CB = com rizobactéria; T = turfa; F = fibra de coco; S = substrato Vivatto®; V = vermiculita.

De acordo com o índice de crescimento (Tabela 2), foi possível observar que com 60 dias de aclimatização a bactéria proporcionou efeitos positivos nas plantas nos tratamentos Vivatto®, fibra de coco + Vivatto®, fibra de coco + vermiculita e fibra de coco + turfa, quando comparado ao controle.

Com 120 dias o índice mostra não haver diferenças entre os tratamentos. E com 180 os tratamentos fibra de coco, fibra de coco + Vivatto® e fibra de coco + turfa na presença de bactéria tiveram os melhores resultados. O que pode vir a ser um indicativo para a redução do período de aclimatização. Em um trabalho de Baldotto et al. (2010) plantas de abacaxizeiro da variedade 'Vitoria' foram aclimatizadas em substratos Plantmax® e feitas aplicações com isolados de bactérias diazotróficas. Verificou-se que o cultivo *in vitro* de plântulas de abacaxizeiro com a aplicação de bactérias diazotróficas endofíticas e epifíticas

pode melhorar a adaptação das mesmas ao ambiente *ex vitro*, reduzindo o período de aclimatização.

O que pode se observar também foi a grande influência do substrato de cultivo para o crescimento da planta. A combinação de fibra + turfa foi o substrato que proporcionou um melhor desenvolvimento das mudas de abacaxizeiro em fase de aclimatização e que quando houve adição das bactérias isso foi favorecido ainda mais.

Essa influência do tipo de substrato e da aplicação de bactérias também foi constatado por Weber et al. (2003), onde o substrato formulado com a mistura de casca de arroz carbonizada, vermiculita e vermicomposto, constitui na melhor alternativa para aclimatização de mudas micropropagadas do abacaxizeiro, quando comparou aos demais substratos testados.

**Tabela 2.** Índice de crescimento das plantas de abacaxizeiros cv. BRS Imperial em diferentes substratos na presença e ausência de rizobactérias aos 60, 120 e 180 dias de avaliação após plantio.

Tratamento	60 dias		120 dias		180 dias	
	Sem bactéria	Com bactéria	Sem bactéria	Com bactéria	Sem bactéria	Com bactéria
Turfa	700 aA	726 bA	700 aB	1.151 aA	-	-
Fibra de coco	700 aA	777 abA	700 aA	874 aA	700 aB	990 bA
Vivatto	700 bA	916 abA	700 aA	1.068 aA	700 aA	854 bcA
Fibra+vivatto	700 aB	974 aA	700 aA	817 aA	700 aB	871 bcA
Fibra+Vermiculita	700 bA	934 abA	700 aA	860 aA	700 aB	739 cA
Fibra+turfa	700 aA	754 abA	700 aA	811 aA	700 aB	1.333 aA
CV (%)	17,46**		43,28**		17,28**	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de tukey a 5 % de probabilidade.

De forma geral, o uso de rizobactérias teve um efeito positivo sobre as plantas de BRS Imperial, demonstrando o grande potencial desses microrganismos para a redução dos longos períodos de aclimatização exigidos pela espécie. A combinação desses isolados em fibra de coco + turfa foi a alternativa mais viável para o plantio, visto que promoveu o crescimento das plantas.

Esses resultados servem de subsídios para novos estudos na etapa de aclimatização de plantas de abacaxizeiro, visando otimizar ainda mais o processo de produção de mudas, visto a grande importância econômica da cultura.

É possível levar em consideração em estudos futuros outros aspectos não estudados nesse trabalho, como adubação nitrogenada, comumente utilizada no processo de produção de mudas pelas biofábricas, podendo assim alcançar resultados ainda mais satisfatórios.

## CONCLUSÃO

A combinação de fibra de coco + turfa proporciona um melhor desempenho da planta, sendo o mais indicado para cultivo de mudas micropropagadas de abacaxizeiros.

Vivatto® e Fibra + Vivatto® são alternativas de uso, em caso de indisponibilidade dos materiais inicialmente propostos.

Rizobactérias produtoras de ácido indolacético promovem o crescimento de mudas de abacaxi em cultivo *ex vitro*, quando reaplicadas ao longo do tempo.

## BIBLIOGRAFIA

BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; GIRO, V. B.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; SMITH, R. B. Desempenho do abacaxizeiro 'vitória' em resposta à aplicação de ácidos húmicos durante a aclimação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, p. 979-990, 2009.

BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; OLIVARES, F. L.; VIANA, A. P.; SMITH, R. B. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar vitória durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, p.349-360, 2010.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: Environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, n. 43, p. 103-121, 1997.

BRAGA, F. T.; PASQUAL, M.; CASTRO, E. M.; RAFAEL, G. C.; FAVERO, A. C.; VALENTE, T. C. T. Alterações morfofisiológicas de plantas de abacaxizeiro influenciadas por diferentes substratos durante o processo de aclimatização. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 5, p. 863-868, 2011.

CASTRO, P. R. C.; VIEIRA, E. L. Aplicações de reguladores vegetais na agricultura tropical. **Guaíba: Agropecuária**, 132p, 2001.

CATTELLAN, A. J. Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com rizobactérias promotoras de crescimento vegetal. **Embrapa Soja**, Londrina, 36p 1999.

CATUNDA, P. E. A.; MARINHO, C. S.; GOMES, M. M. A.; CARVALHO, A. J. C. Brassinosteróide e substratos na aclimatização do abacaxizeiro 'Imperial'. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 30, p. 345-352, 2008.

CUNHA FILHO, F. N.; TORRES, A. C.; CHARCHAR, J. M. Avaliação de substratos na produção de mudas do abacaxizeiro ornamental [*Ananas comosus* (L.) Merr. Var. *bracteatus* (Lindl.) Coppins & f. Leal] em condições de casa de vegetação. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, Lavras, v. 4, n. 2, p. 70-75, 2008.

CUNHA, J. F.; ALFENAS, A. C.; SILVA, A. G.; BRANDÃO, I. J.; Potencial de rizobactérias no crescimento de mudas de sibipiruna (*Caesalpinia peltophoroides* Benth). **Revista Árvore**, Viçosa, v.37, n.2, p.211-218, 2013.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; BROEK, A. V.; VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant Soil**, Crawley, n. 212, p. 155-164, 1999.

FAO. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e agricultura. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>. Acesso em 30 de Junho de 2016.

KOZUSNY-ANDREANI, D. I.; ANDREANI JUNIOR, R.; COELHO, O. M. Efeito de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas no desenvolvimento de mudas de salsa. **Revista Cultivando o saber**, Cascavel, v.5, n.4, p. 203-212, 2012.

LAMIM, A. P. B.; JORDÃO, C. P.; PEREIRA, J. L.; BELLATO, C. R. Caracterização química e física de turfa litorânea e avaliação da adsorção competitiva por cobre e zinco. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 18-23, 2001.

MENEZES JÚNIOR, F. O. G.; FERNANDES, H. S.; MAUCH, C. R.; SILVA, J. B. Caracterização de diferentes substratos e seu desempenho na produção de mudas de alface em ambiente protegido. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 18, n. 3, p. 164-170, 2000.

MOREIRA, M. A.; CARVALHO, J. G.; PASCOAL, M.; FRÁGUAS, C. B.; SILVA, A. B. Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 5, p. 875-879, 2006.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. **Plant Physiology**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NASCENTE, A. S.; COSTA, R. S. C.; COSTA, J. N. M. Cultivo do abacaxi em Rondônia. **Comunicado técnico**. Embrapa Rondônia, p. 1-37, 2005.

PIO, R.; ARAÚJO, J. P. C.; BASTOS, D. C.; ALVES, A. S. R.; ENTELMANN, F. A.; FILHO, J. A. S.; MOURÃO FILHO, F. A. A. Substratos no enraizamento de estacas herbáceas de figueira oriundas da desbrota. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 3, p. 604-609, 2005.

POLLI, A.; NEVES, A. F.; GALO, F. R.; GAZARINI, J.; RHODEN, S. A.; PAMPHILE, J. A. Aspectos da interação dos microrganismos endofíticos com plantas hospedeiras e sua aplicação no controle biológico de pragas na agricultura. **Revista de Saúde e Biologia**, Campo Morão, v.7, n.2, p.82-89, 2012.

ROSA, M. F.; BEZERRA, F. C.; CORREIA, D.; SANTOS, F. J. S.; ABREU, F. A. P.; FURTADO, A. A. L.; BRÍGIDO, A. K. L.; NORÕES, E. R. V. Utilização da casca de coco como substrato agrícola. **Documentos 52**, Embrapa Agroindústria Tropical, 2002.

SAS INSTITUTE INC. **SAS/Stat user's guide**: statistics. Version 9.1. 3. ed. Cary, NC, 2004.

SOUZA JÚNIOR, E. E.; BARBOZA, S. B. S. C.; SOUZA, L. A. C. Efeitos de substratos e recipientes na aclimatização de plântulas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr) cv. Pérola. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Brasília, v. 31, n. 2, p. 147-151, 2001.

STONIER, T. *Agrobacterium tumefaciens* Conn. II. Production of an antibiotic substance. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 79, p. 889-898, 1960.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10ª edição, Artmed, p. 113-153, 2012.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant Soil**, Crawley, v. 255, p. 571-586, 2003.

WEBER, O. B.; CORREIA, D.; SILVEIRA, M. R. S.; CRISÓSTOMO, L. A.; OLIVEIRA, E. M.; SÁ, E. G. Efeito da bactéria diazotrófica em mudas micropropagadas de abacaxizeiros Cayenne Champac em diferentes substratos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n.6, p. 689-696, 2003.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As rizobactérias produtoras de ácido indolacético estudadas promovem o crescimento de mudas de abacaxizeiro cultivadas em substrato na fase de pré-aclimatização *in vitro*, por meio do aumento na matéria fresca e seca das plantas, do sistema radicular, no número de folhas, entre outros incrementos.

O uso de substrato na fase de aclimatização teve um efeito positivo sobre as plantas, uma vez que foi detectada atividade fotossintética.

No entanto plantas provenientes da pré-aclimatização em substrato, mesmo tendo havido a aplicação de rizobactérias, não se adaptaram bem às condições de telado. Nesse caso, a melhor adaptação ocorreu para as plantas vindas do cultivo em meio Murashige e Skoog.

O uso de rizobactérias na combinação de fibra de coco + turfa foi a melhor opção para aclimatização de abacaxizeiro em plantas vindas de micropropagação.

Diante disso, se faz necessário que os estudos com esses microrganismos tenham continuidade, para se possa chegar a formulações de bioprodutos, que visam além de redução do custo de produção na cultura do abacaxizeiro, uma agricultura sustentável e produtos livres de agroquímicos.