

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

**MICROORGANISMOS BENÉFICOS CULTIVÁVEIS ASSOCIADOS A
Ananas spp. EM DIFERENTES AMBIENTES**

CARLOS RAIMUNDO DOS SANTOS SOUZA

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
SETEMBRO – 2017**

MICROORGANISMOS BENÉFICOS CULTIVÁVEIS ASSOCIADOS A
***Ananas spp.* EM DIFERENTES AMBIENTES**

CARLOS RAIMUNDO DOS SANTOS SOUZA

Licenciado em Ciências Biológicas

Alagoinhas – Bahia, 2010.

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: Dsc. Saulo Alves Santos de Oliveira

Co-orientador: Dsc. Cláudia Fortes Ferreira

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

SETEMBRO – 2017

FICHA CATALOGRÁFICA

S729m	<p>Souza, Carlos Raimundo dos Santos. Microorganismos benéficos cultiváveis associados a Ananas spp. em diferentes ambientes / Carlos Raimundo dos Santos Souza. _ Cruz das Almas, BA, 2017. 88f.; il.</p> <p>Orientador: Saulo Alves Santos de Oliveira. Coorientadora: Cláudia Fortes Ferreira.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p> <p>1.Solo – Microbiologia do solo. 2.Abacaxi - Cultivo. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 631.4</p>
-------	--

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

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
CARLOS RAIMUNDO DOS SANTOS SOUZA



Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira
Embrapa Mandioca e Fruticultura
Orientador



Dr. Harllen Sandro Alves Silva
Embrapa Mandioca e Fruticultura



Dr.ª Andresa Priscila de Souza Ramos
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, pela educação que conferiram a mim. À minha mulher e irmãos pelo companheirismo.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre! Que no mais profundo silêncio, age!

Aos meus pais, José e Maria, à minha mulher Lucicleide pelos conselhos e companhia, às minhas irmãs Ivana, pela dedicação a mim, Tainã pelas orações, aos irmãos Alisson e Júnior pelo apoio;

A minha Tia Elizabete por todas as orações;

Aos demais familiares, amigos que apesar da distância, não negam apoio;

Ao Dr. Saulo Oliveira pela aceitação em orientar, pelos ensinamentos e por acreditar que eu poderia fazer um bom trabalho;

A Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, por oportunizar o PPGMA. Também aos professores deste programa, em especial a Phellippe Marback, Francisco Laranjeira, Thiago Oliveira e Harllen Silva;

A Embrapa Mandioca e Fruticultura por subsidiar a realização deste trabalho e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo fornecimento da bolsa de estudo;

A Dr^a. Cláudia Fortes Ferreira pela excelente co-orientação;

Ao pessoal do LFITO (Laboratório de Fitopatologia), especialmente a Leandro Rocha, pelo apoio e dicas valiosas.

À equipe do LBM (Laboratório de Biologia Molecular), principalmente a Ana Cláudia (Claudinha), Raimundo, Vandeson e Andresa por toda contribuição;

A família mandioca (Bruno, Daniela, Mariana, Luiz) pela ajuda, conversas e cantigas.

Aos colegas da Microbiologia Agrícola, em especial a Ramon por toda ajuda, Jamile, Camila, Joyse, Fátima, Anelita e Joseane, pelos conhecimentos compartilhados;

A todos os homens simples do setor de campo da EMBRAPA;

Àquelas pessoas que não foram citadas mas que colaboraram para esta fase.

ÍNDICE

RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO	12
CAPÍTULO 1 - Revisão de literatura: Microbiota funcional cultivável	14
RESUMO.....	15
ABSTRACT	16
O abacaxizeiro	17
Solos rizosférico e rizoplano como fontes de microrganismos benéficos.....	18
Interação planta-microrganismo endofítico	18
Estudo de microrganismos cultiváveis	20
REFERÊNCIAS	22
CAPÍTULO 2 - Diversidade de microrganismos cultiváveis associados a <i>Ananas</i> spp. provenientes de ambiente natural, de conservação <i>ex situ</i> (Banco Ativo de Germoplasma) e de cultivo comercial.....	26
RESUMO.....	27
ABSTRACT	29
INTRODUÇÃO	30
MATERIAL E MÉTODOS	31
Quantificação da microbiota cultivável.....	33
Preservação de isolados	34
Extração de DNA de isolados bacterianos e fúngicos.....	35
Reações de BOX-PCR e ERIC-PCR	36
Análise dos dados	37
RESULTADOS	37
DISCUSSÃO	55
AGRADECIMENTOS	59
REFERÊNCIAS	60
CAPÍTULO 3 - Potencial biotecnológico da microbiota associada a <i>Ananas</i> spp. proveniente de ambiente natural e cultivado quanto à promoção do crescimento de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. 'BRS Imperial'	64
RESUMO.....	65
ABSTRACT	66
INTRODUÇÃO	67
RESULTADOS	71
DISCUSSÃO	77
AGRADECIMENTOS	80

REFERÊNCIAS	81
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
APÊNDICE	84

RESUMO

Souza, C. R. dos S. MICRORGANISMOS BENÉFICOS CULTIVÁVEIS ASSOCIADOS A *Ananas* spp. EM DIFERENTES AMBIENTES.

As interações entre plantas e microrganismos habitantes do solo e endofíticos têm recebido destaque em trabalhos, sobretudo as que envolvem os microrganismos benéficos e sua atuação na promoção do crescimento das plantas e biocontrole dos fitopatógenos. Entretanto, estudos sobre a composição da microbiota e sua interação com o abacaxizeiro (*Ananas* spp.) são escassos. Este trabalho objetivou comparar a diversidade de microrganismos em associação com *Ananas* spp., considerados pela literatura como benéficos, em ambiente de conservação *ex situ* (Banco Ativo de Germoplasma), de cultivo comercial e de ocorrência natural, com o intuito de permitir a conservação dos isolados e o uso futuro na produção de *Ananas* spp. Para isso, amostras foram coletadas em três estados, Bahia, Mato Grosso e Rondônia, seguido de análise da composição da microbiota cultivável associada a *Ananas* spp. As amostras foram subdivididas em diferentes frações: solo rizosférico; solo do rizoplano; raiz; caule e folha, e submetidas à quantificação das populações de bactérias e fungos por meio da contagem de unidades formadoras de colônia em meios de cultura básicos (bactérias e fungos totais) e seletivos para os principais grupos funcionais de microrganismos (bactérias produtoras de sideróforos [BPS], bactérias produtoras de edósporos [BPE]; actinobactérias e *Trichoderma* spp.). Foram obtidos um total de 829 isolados, sendo 385 fúngicos e 444 bacterianos. Como método de estimativa da diversidade utilizou-se análises baseadas na amplificação das regiões repetitivas ERIC e BOX dos isolados fúngicos e bacterianos obtidos. As bactérias foram predominantes nos três ambientes, cultivo, *ex situ* e natural, com densidade de 79,7%, 89,5% e 88,8% respectivamente. As actinobactérias foram mais representativas no ambiente *ex situ*, com $6,6 \times 10^6$ UFC.g⁻¹, já nos demais ambientes as BPS's apresentaram a maior densidade, com $8,0 \times 10^6$ UFC.g⁻¹ e $6,9 \times 10^6$ UFC.g⁻¹, para os ambientes natural e de cultivo respectivamente. As técnicas ERIC e BOX-PCR permitiram o agrupamento dos microrganismos

independente da amostra de origem, sugerindo uma distribuição similar entre os grupos desde solo até parte aérea. Os resultados obtidos para as inoculações destes isolados em plantas micropropagadas de abacaxi da cultivar 'BRS Imperial' (biosensaio) evidenciaram a presença de fungos e bactérias com potencial de promoção de crescimento e com potencial para uso biotecnológico, especialmente aqueles provenientes de ambiente de cultivo.

Palavras-chave: Abacaxizeiros. Microrganismos benéficos. Técnicas moleculares.

ABSTRACT

Souza, C. R. dos S. CULTIVATING BENEFICIAL MICROORGANISMS ASSOCIATED WITH *Ananas* spp. IN DIFFERENT ENVIRONMENTS.

The interactions between plants and soilborne microorganisms and endophytes have been highlighted in works, especially those involving beneficial microorganisms and their role in promoting plant growth and biocontrol of phytopathogens. However, studies on the composition of the microbiota associated with pineapple (*Ananas* spp.) are scarce. This work aimed to compare the diversity of microorganisms in association with *Ananas* spp., considered by the literature as beneficial, in *ex situ* conservation environment (Germoplasm Active Bank), of commercial cultivation and naturally occurring, in order to allow the conservation of isolates and the future use in *Ananas* spp. production. For this, samples were collected in three states, Bahia, Mato Grosso and Rondônia, followed by analysis of the composition of the cultivable microbiota associated with *Ananas* spp. The samples were subdivided into different fractions: rhizospheric soil; soil of the rhizoplano; root; stem and leaf, and subjected to quantification of bacterial and fungal populations by counting colony forming units in basic culture media (bacteria and fungi) and selective for the main functional groups of microorganisms (siderophores producing bacteria [BPS], endospores producing bacteria [BPE], actinobacteria and *Trichoderma* spp.). A total of 829 isolates were obtained, being 385 fungal and 444 bacterial. Analyzes based on the amplification of the ERIC and BOX repeating regions of the fungal and bacterial isolates obtained were used for the estimative of diversity of the samples. There was predominance of bacteria for the three environments, commercial field, *ex situ* and natural, with density of 79.7%, 89.5% and 88.8% respectively. The actinobacteria group were more representative in the *ex situ* environment, with 6.6×10^6 CFU.g⁻¹, whereas in the other environments the BPSs presented the highest density, with 8.0×10^6 CFU.g⁻¹ and 6.9×10^6 UFC.g⁻¹, for the natural and commercial field environments respectively. The ERIC-PCR and BOX-PCR techniques allowed the grouping of microorganisms independent of the original sample, suggesting a similar distribution of the groups among samples from soil to plant shoot,

especially those obtained on commercial production fields. In addition, there is a correlation between soil samples and functional groups, which indicates a requirement for these groups by plants. The obtained result for the inoculation of the isolates on micropropagated pineapple plants of the cv. 'BRS Imperial' indicated the presence of fungi and bacteria with potential to promote growth in *Ananas* spp. and for biotechnological use, especially for those isolates obtained on commercial production fields.

Keywords: Pineapples. Beneficial microorganisms. Molecular techniques.

INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores de frutas do mundo, dentre as quais encontra-se o abacaxi (*Ananas comosus* var. *comosus* (L.) Merrill) (FAO, 2015). Apesar disso, a produção nacional é comprometida por diferentes pragas e doenças, como por exemplo a fusariose (SALES et al., 2016).

Além de manter relações com fitopatógenos, acredita-se que as espécies de *Ananas* também se relacionam com um grupo de microrganismos benéficos, descritos pela literatura como endofíticos (NAIR & PADMAVATHY, 2014; RYAN et al., 2007), os quais podem ser encontrados em muitas plantas ocupando seus tecidos internos, constituindo diferentes relações com os vegetais, podendo melhorar o desenvolvimento destes, atuar na solubilização de nutrientes e na produção de reguladores de crescimento vegetal, contribuindo desta forma para incrementos no desenvolvimento das plantas e podendo atuar como agentes de controle biológico (JASIM et al., 2014; NAIR & PADMAVATHY, 2014; RYAN et al., 2007).

Entretanto, de acordo com Marín-Cevada et al. (2011), estudos sobre a diversidade microbiana benéfica, do solo ou endofítica, associada a abacaxizeiros estão sendo conduzidos, apesar de não serem abundantes, e que espécies de *Ananas* geralmente são colonizadas por microrganismos benéficos como *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Burkholderia* sp. e *Asaia bogorensis*, com algum efeito benéfico às plantas.

Acredita-se que há diferenças na composição e nas relações benéficas estabelecidas entre estes microrganismos e plantas do ambiente natural quando comparadas aquelas constituídas no ambiente agrícola, pois este está sob constante influência das práticas de cultivo, as quais tendem a interferir nestas relações por emprego de nutrientes sintéticos e pesticidas, que contribuem para que as plantas requeiram menos os microrganismos benéficos (PHILIPPOT et al., 2012).

Tais microrganismos e suas funções podem ser investigados por meio de métodos dependentes de cultivo, que geralmente incluem a obtenção de culturas puras em condições laboratoriais, e por métodos moleculares baseados na

técnica de PCR ou mesmo de metagenômica. Apesar de as técnicas baseadas em cultivo apresentarem uma menor informatividade da diversidade total de microrganismos quando comparadas à técnicas mais sensíveis, como é o caso da metagenômica, existe a vantagem do direcionamento das espécies-alvo de isolamento, bem como a possibilidade de preservação a longo prazo e uso futuro.

Este tipo de análise pode ser complementado com a utilização de técnicas moleculares, como BOX e ERIC, que são de fácil execução, possuem iniciadores com sequências conhecidas, cujos resultados podem ser usados para a discriminação de espécies (SOUZA, 2011). Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo comparar a microbiota funcional cultivável potencialmente benéficos da rizosfera, rizoplano e endofíticos de *Ananas* spp., provenientes de ambiente natural, de ambiente de conservação *ex situ* (Banco Ativo de Germoplasma de abacaxizeiros [BAG]) e de cultivo comercial.

Para isso, no primeiro capítulo foi feita a revisão de literatura sobre os aspectos da cultura de abacaxizeiros, das relações entre microrganismos-plantas e dos métodos de estudo da diversidade microbiana. No segundo capítulo realizou-se um estudo de diversidade da microbiota funcional associada a abacaxizeiros, por meio de quantificação de unidades formadoras de colônias e com base em ferramentas moleculares (BOX e ERIC-PCR). Como validação da inocuidade e do possível potencial biotecnológico dos isolados obtidos, no terceiro capítulo foi feito um bioensaio baseado no cultivo *in vitro* de plantas da cultivar 'BRS Imperial'.

CAPÍTULO 1

Revisão de literatura: Microbiota funcional cultivável

RESUMO

O abacaxizeiro (*Ananas comosus* var. *comosus* (L.) Merrill) produz uma das frutas mais apreciadas no mundo. Seu centro de origem é atribuído ao Brasil, o qual é detentor da diversidade genética do gênero. A abacaxicultura é uma fonte empregatícia e contribui para estabilidade do homem no âmbito rural, entretanto pode ser afetada por uma série de doenças de importância econômica, como por exemplo a fusariose. Desta forma, o estudo de bactérias e fungos que compõem o microbioma rizosférico e endofítico do gênero *Ananas*, coletados em seu ambiente de ocorrência natural ou em ambiente de cultivo, apresentam um enorme potencial para a descoberta de ferramentas biotecnológicas de interesse agrícola, além da possibilidade de restabelecimento do equilíbrio dos agroecossistemas. Estes microrganismos possuem potencial para solubilização de nutrientes importantes para a planta e têm a capacidade de competir com os fitopatogênicos. Com isso, é cada vez mais crescente o número de pesquisas que visam a bioprospecção destes microrganismos, os benefícios que eles promovem para o vegetal, além da sua aplicação para o melhoramento de cultivares.

Palavras-chave: Solo. Relações microbianas. Endofíticos.

ABSTRACT

Pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus* (L.) Merrill) produces one of the most appreciated fruits in the world. Its center of origin is attributed to Brazil, which holds the genetic diversity of the genus. Pineapple farming is a source of employment and contributes to the stability of man in rural areas, but can be affected by a number of pests with economic importance, such as fusariosis. In this way, the study of bacteria and fungi that compose the rhizosphere and endophytic microbiome of the genus *Ananas*, collected in their natural or cultivated environment, present an enormous potential for the discovery of biotechnological tools of agricultural interest, besides the possibility restoration of the balance of agroecosystems. These microorganisms have the potential to solubilize important nutrients for the plant and have the capacity to compete with phytopathogens. With this, the number of researches that aim at the bioprospection of these microorganisms, the benefits that they promote for the vegetable, and its application for the improvement of cultivars, are increasing.

Keywords: Solo. Microbial relations. Endophytics.

O abacaxizeiro

O abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merr.) é uma planta pertencente à família Bromeliaceae que tem no Brasil o seu provável centro de origem (SOUZA, 2012; BARBOZA, 2006) e diversidade genética, isso porque além de *A. comosus* o país possui todas as espécies desse gênero na forma silvestre ou cultivadas distribuídas em muitas regiões brasileiras (CRESTANI et al., 2010). O fruto é na verdade uma infrutescência caracterizada pela união de vários frutículos, de formato cônico, possuindo uma coroa no topo (LOPES NETO, et al., 2015). A propagação dos abacaxizeiros pode se dar por meio de mudas do tipo coroa, filhote, filhote-rebentão, rebentão e plântula (RODRÍGUEZ-ESCRIBA et al, 2016; EMBRAPA, 2013).

Na última década, a produção brasileira variou entre 2,2 milhões de toneladas e 2,7 milhões de toneladas, com uma produção média nos últimos anos chegando a cerca de 2,5 Mt (FAO, 2015). A região que teve a maior área cultivada e quantidade produzida foi a Nordeste, com 24.367 hectares (35,03 %) e 649.128 toneladas (36,03 %), respectivamente. O estado da Bahia apresentou uma área plantada de 5.800 hectares (23,8 %), produzindo 144.827 toneladas (22,3 %) de abacaxis (IBGE, 2014).

Entretanto, a produção desta fruta pode ser comprometida por uma série de doenças de importância fitossanitária. Uma das mais importantes doenças é a fusariose, provocada pelo fungo *Fusarium guttiforme*, que pode ocasionar até 100 % de perdas na produção, em condições que a planta apresenta suscetibilidade (SALES et al., 2016). Além disso, os autores ainda deixam claro que a produção também pode ser afetada na fase de pós-colheita por outras doenças como a podridão negra causada pelo fungo *Chalara paradoxa*.

Apesar das perdas na produção causadas pelas doenças, estima-se que a produção da fruta alcance 2,9 Mt na próxima década, o que acompanhará a demanda interna (FAO, 2015).

Solos rizosférico e rizoplano como fontes de microrganismos benéficos

O solo é constantemente influenciado pela microbiota e esta, por sua vez, pode ser estruturada por intermediação de compostos químicos liberados pelas raízes em seu entorno, conhecido também como rizosfera (YERGEAU et al., 2014; LAKSHMANAN et al., 2014).

É sabido que diversos fatores exercem ação relevante para a construção do microbioma rizosférico, como o tipo de hospedeiro e solo (SCHREITER et al., 2014). Além destes, outros fatores também afetam de maneira significativa a dinâmica populacional dos microrganismos, como o estresse biótico e abiótico, condições climáticas e os efeitos da ação humana.

Quanto às raízes, estas também exercem papel importante na composição da rizosfera pela “rizodeposição de exsudatos, mucilagens e células descamadas” (LAKSHMANAN et al., 2014, PHILIPPOT et al., 2013). Os exsudatos liberados pelas raízes atuam como mediadores de diversas interações planta-planta, planta-microrganismo e microrganismo-microrganismo (PHILIPPOT et al., 2013). Tais compostos contribuem para a composição da microbiota rizosférica e do rizoplano ao induzir o quimiotatismo dos microrganismos, o que é essencial para instituir a associação planta-microrganismo nas raízes.

A constituição do microbioma rizosférico, principalmente com maior participação de microrganismos benéficos, é imprescindível para aumentar a capacidade da planta de controlar o surgimento de pragas e doenças, sobretudo pelo melhoramento no desempenho e crescimento vegetal, refletindo no ganho em produtividade (CHAPARRO et al., 2014).

Interação planta-microrganismo endofítico

Microrganismos endofíticos são aqueles que habitam o interior de tecidos de plantas, constituindo uma associação simbiótica sem causar doença aparente

(SUN et al., 2015; ACOSTA & DUARTE, 2014; SILVA, 2014; MOLINA et al., 2012; POLLI et al., 2012).

O processo de colonização é caracterizado por várias e diferentes fases, que vão desde o movimento quimiostático dos microrganismos endofíticos, presentes no solo, ao sistema radicular, até o estabelecimento nas raízes, permitindo a sua sobrevivência. No que diz respeito à colonização das partes aéreas, a presença destes microrganismos depende da sua composição gênica, a qual refletirá na produção de metabólitos essenciais para colonização no ápice da planta (GARCIA, 2015).

Os endófitas geralmente promovem efeitos benéficos para o seu hospedeiro, podendo contribuir para o crescimento das plantas e agir como agentes de controle biológico (OLIVERIA et al., 2014; JASIM et al., 2014; NAIR & PADMAVATHY, 2014), além de produzirem uma gama de produtos naturais que podem também ser aproveitados para uso potencial em medicina, na agricultura ou na indústria (KHAN et al, 2016; SOUZA et al., 2015; ACOSTA & DUARTE, 2014; NAIR & PADMAVATHY, 2014). Além disso, há evidências que estes microrganismos têm o potencial para remover contaminantes do solo, aumentando a fitorremediação, e podem desempenhar um papel em sua fertilidade, pela fixação e solubilização de nutrientes (SOUZA et al., 2015, NAIR & PADMAVATHY, 2014).

Pouco se sabe acerca dos microrganismos endofíticos que mantêm uma associação com *Ananas* spp. A parcela de trabalhos que aborda este tipo de interação envolve ensaios em casas de vegetação, como por exemplo, o desenvolvido por Weber et al. (2013), que realizaram um estudo para caracterizar bactérias diazotróficas endofíticas da cultivar 'Champaka' em um sistema orgânico durante o período de frutificação. Estes mesmos autores, em trabalhos anteriores, relataram que a associação de bactérias diazotróficas com as cultivares Champaka e Victoria contribuiu significativamente para o aumento do crescimento destas cultivares de abacaxi.

Em relação a estudos de bactérias endofíticas, Abreu-Tarazi et al. (2010) investigaram com o emprego de PCR-DGGE, a associação destes microrganismos com mudas micropropagadas de abacaxizeiros cultivadas de maneira axênica. Os autores concluíram que os microrganismos endofíticos

persistiram nas mudas por um longo tempo sem ocasionar nenhum sintoma aparente, mesmo sendo cultivadas de forma axênica.

Apesar de os trabalhos descritos anteriormente, são escassas as investigações sobre a relação de microrganismos endofíticos com abacaxizeiros em ambiente natural e da comparação deste com locais de cultivo comercial e/ou de manutenção de germoplasma a campo (*ex situ*).

Estudo de microrganismos cultiváveis

As técnicas baseadas na quantificação de microrganismos, com uso de meios de cultura, têm grande aplicabilidade para a caracterização das comunidades microbianas habitantes do solo e endofíticas. Apesar de as técnicas baseadas em cultivo apresentarem uma menor informatividade da diversidade total de microrganismos quanto comparadas à técnicas mais sensíveis, como é o caso da metagenômica, existe a vantagem do direcionamento das espécies-alvo de isolamento, bem como a possibilidade de preservação a longo prazo e uso futuro (PHILLIPOT et al, 2013).

Com o intuito de solucionar a menor abrangência dos métodos dependentes de cultivo em estudos de diversidade, técnicas moleculares começaram a emergir em complemento aos resultados dos meios de cultivo, e a serem direcionadas ao estudo da diversidade destes microrganismos (YE et al., 2013; WANG et al., 2012).

Uma família de técnicas moleculares é comumente utilizada em complemento aos métodos dependentes de cultivo, principalmente para caracterização da diversidade genética microbiana. Esta família recebe o nome de REP-PCR, composta por sequências repetitivas intergênicas encontradas nos procariotos, como os elementos REP, BOX e ERIC (SOUZA, 2012).

Os elementos REP podem apresentar tamanho variando de 35-45 pb, enquanto que os ERIC possuem tamanho de 124-127 pb e BOX geralmente possuem tamanho de 154 pb (SOUZA, 2011; VERSALOVIC et al., 1991). Os *primers* utilizados para amplificar as regiões BOX tendem a gerar uma quantidade

maior de *amplicons* e de menor distinção entre si, diferentemente do que é visto com os *amplicons* resultantes das ampliações com *primers* ERIC, que produzem bandas mais distinguíveis (SOUZA, 2011).

Estas técnicas vêm sendo comumente usadas em estudos de diversidade genética de populações microbianas, pois são de fácil execução, oferecem resultados rápidos e de excelente reprodutibilidade (RADEMAKER et al., 2000).

REFERÊNCIAS

- ABREU-TARAZI, M. F. et al. Endophytic bacteria in long-term in vitro cultivated “axenic” pineapple microplants revealed by PCR–DGGE. **World Journal Microbiol Biotechnology**. vol. 26, 2010, p. 555–560.
- ACOSTA, M. B. R.; DUARTE, L. G. C. Pesquisa da existência de bactérias Gram negativas endofíticas potencialmente patogênicas para o homem em hortaliças provenientes de cultivos orgânicos. **Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología**, vol. 34, 2014, p. 59-63.
- BARBOZA, S. B. S. C. et al. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.41, n.2, ,2006, p.185-194.
- EMBRAPA. Abacaxi : o produtor pergunta, a Embrapa responde / editores técnicos, Nilton Fritzon Sanches, Aristóteles Pires de Matos. – 2 ed. rev. e ampl. – Brasília, DF : Embrapa, 2013, p. 196.
- BRASIL-MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Plano Agrícola e Pecuário 2014/2015. vol. 9. Pg. 1.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Cadeia produtiva de frutas. **Secretaria de Política Agrícola, Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura**. Brasília, vol. 7, 2007, p.1-105.
- CHAPARRO, Jacqueline M. et al. Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. **International Society for Microbial Ecology Journal**, vol. 8, 2014, p.790–803.
- CRESTANI, M. et al. Das Américas para o Mundo - origem, domesticação e dispersão do abacaxizeiro. **Ciência Rural**. v.40, n.6, 2010, p.1473-1483.
- FAO** – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. Perspectivas Agrícolas no Brasil: desafios da agricultura brasileira 2015-2024. Perspectivas agrícolas 2015-2024. Disponível em www.agri-outlook.org.
- GARCIA, T. V.; KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Bactérias endofíticas como agentes de controle biológico na orizicultura. **Agricultural Microbiology / Article Review**. vol. 82, 2015, p. 1-9.
- IBGE**. Produção Agrícola Municipal, vol. 41, 2014, p. 21.
- JASIM, B. et al. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria from the rhizome of *Zingiber officinale*. **Biotech**. Vol. 4, 2014, p. 197–204.

KHAN, A. L. et al. Indole acetic acid and ACC deaminase from endophytic bacteria improves the growth of *Solanum lycopersicum*. **Electronic Journal of Biotechnology**. 2016, p. 1-16.

LAKSHMANAN, Venkatachalam; SELVARAJ, Gopinath; BAIS, Harsh P. Functional Soil Microbiome: Belowground Solutions to an above ground problem. **Plant Physiology**, vol. 166, 2014, p. 689–700.

LOPES NETO, J. J. et al. Estudo botânico, fitoquímico e avaliação de atividades biológicas do fruto de *Ananas comosus* var. *comosus* (L.) Merrill (Bromeliaceae). *Gaia Scientia*. volume 9(1): 2015, p.164-171.

MARÍN-CEVADA, V. et al. Antagonistic interactions among bacteria inhabiting pineapple. **Applied Soil Ecology**. 2011, p. 1-6.

MOLINA, G. et al. Application of fungal endophytes in biotechnological processes. **Chemical Engineering Transactions**, vol. 27, 2012, p. 289-294.

MONTAÑEZA, A. et al. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects in vitro. **Applied Soil Ecology**. vol. 58, 2012, p. 21– 28.

MOREIRA, F. M. de S; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do solo**. 2 ed, UFLA, Lavras, Minas Gerais. 2006, p. 729.

NAIR, D. N; PADMAVATHY, S. Impact of Endophytic Microorganisms on Plants, Environment and Humans. **The Scientific World Journal**, 2014, p. 11.

OLIVEIRA, R. J. V. DE. Diversidade e identificação de fungos endofíticos em folhas de *Cocos nucifera* L., em Goiana Pernambuco, com base em morfologia e sequências de rDNA. Dissertação (Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco), 2014.

PHILIPPOT, L. et al. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature reviews**. vol. 11, 2013, p. 789-799.

POLLI, A. et al Aspectos da interação dos microrganismos endofíticos com plantas hospedeiras e sua aplicação no controle biológico de pragas na agricultura. **SaBios: Revista Saúde e Biologia**, vol.7, 2012, p. 82-89.

RADEMAKER, J. L. W. et al. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA–DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, 2000, p. 665–677.

RODRÍGUEZ-ESCRIBA, R. C. et al. Hardening of ‘MD-2’ Micropropagated Pineapple Plants by Drought to Improve the Acclimatization-field Transition. **Newsletter, Pineapple Working Group, International Society for Horticultural Science**. N. 23, 2016, p. 31-61.

RYAN, R. P. et al. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiol Lett.** Vol. 278, 2008, p. 1–9.

SALES, M. D. C. Antifungal activity of plant extracts with potential to control plant pathogens in Pineapple. **Pacific Journal of Tropical Biomedicine.** Vol. 6, 2016, p. 26-31.

SCHREITER, Susanne. et al. Effect of the soil type on the microbiome in the rhizosphere of field-grown lettuce. **Frontiers in Microbiology: Plant-Microbe Interaction.** Vol. 5, , 2014, p. 1-13.

SHIOMI, H. F.; MELO, I. S. de; MINHONI, M. T. de A. Avaliação de bactérias endofíticas para o controle biológico da mancha foliar de *Exserohilum turcicum* em milho. **Plant Pathology / Scientific Article.** Vol. 82, 2015, p.1-4.

SILVA, I. P. da. Fungos endofíticos: fonte alternativa a metabólitos secundários de plantas. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, vol.10, n.18, 2014, p. 3888-3905.

SOUZA, Á. de. Atividade antagônica e diversidade genética de bactérias endofíticas isoladas de diferentes cultivares de *Musa* spp. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, Universidade do Estado do Amazonas). 2012, p. 1-46.

SOUZA, R. D.; MENDONÇA, E. A. F., SOARES, M. A.. Atividade antagônica a microrganismos patogênicos por bactérias endofíticas isoladas de *Echinodorus scaber* Rataj. **Summa Phytopathologica**, vol.41, n.3, 2015, p.229-232.

SOUZA, E. H. de. et al. Genetic variation of the Ananas genus with ornamental potential. *Genet Resour Crop Evol.* nº 59, 2012, p. 1357–1376.

SOUZA, S. A. de. Diversidade de bactérias endofíticas em bananeira ‘Prata-anã’. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, Universidade Estadual de Montes Claros). 2011, p. 1-116.

SUN, S. et al. Diverse fungi associated with partial irregular heartwood of *Dalbergia odorifera*. **Scientific Reports**, vol. 5, 2015, p. 7.

VERSALOVIC, J., KOEUTH, T., & LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19(24), 1991, p.6823–6831.
<https://doi.org/10.1093/nar/19.24.6823>

WANG, X. et al. Pyrosequencing Analysis of Bacterial Diversity in 14 Wastewater Treatment Systems in China. **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 78, nº 19, 2012, p. 7042–7047.

WEBER, O. B.; VIDEIRA, S. S.; ARAÚJO, J. L. S. de. Identification of culturable endophytes in 'Champaka' pineapple grown in an organic system. **African Journal of Agricultural Research**. Vol. 8, 2013, pg. 3422-3430.

YERGEAU, Etienne. et al. Microbial expression profiles in the rhizosphere of willows depend on soil contamination. **International Society for Microbial Ecology Journal**, vol. 8, 2014, p.344–358.

YE, L.; Zhang, T. Bacterial communities in different sections of a municipal wastewater treatment plant revealed by 16S rDNA 454 pyrosequencing. **Applied Microbiology Biotechnology**, vol. 97, 2013, p. 2681.

CAPÍTULO 2

Diversidade de microrganismos cultiváveis associados a *Ananas* spp. provenientes de ambiente natural, de conservação *ex situ* (Banco Ativo de Germoplasma) e de cultivo comercial.

Diversidade de microrganismos cultiváveis associados a *Ananas* spp. provenientes de ambiente natural, de conservação *ex situ* (Banco Ativo de Germoplasma) e de cultivo comercial.

**Carlos Raimundo dos Santos Souza⁽¹⁾, Ana Cláudia de Oliveira Barbosa⁽¹⁾,
Cláudia Ferreira Fortes⁽²⁾, Fernanda Vidigal Duarte Souza⁽²⁾, Leandro de
Souza Rocha⁽²⁾, Saulo Alves Santos de Oliveira⁽²⁾**

⁽¹⁾ Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Rua Rui Barbosa 710 44380- 00, Cruz das Almas, Brasil. E-mail: carlos-raimundo@hotmail.com, aina-cob2@hotmail.com.

⁽²⁾ Embrapa Mandioca e Fruticultura, Rua Embrapa s/n 44380-000, Cruz das Almas, Brasil. E-mail: claudia.ferreira@embrapa.br, fernanda.souza@embrapa.br, saulo.oliveira@embrapa.br, leandro.rocha@embrapa.br.

RESUMO

O Brasil encontra-se entre os grandes produtores de frutas do mundo, com um destaque para o abacaxi (*Ananas comosus* var. *comosus* (L.) Merrill). Acredita-se que *Ananas* spp. mantenha relações com uma gama de microrganismos, fitopatogênicos ou benéficos. Entretanto, estudos sobre a diversidade de microrganismos associados às plantas de abacaxi ainda são escassos. Neste sentido, o presente trabalho objetivou quantificar e comparar a diversidade de microrganismos considerados pela literatura como benéficos, existentes no solo rizosférico e nos tecidos internos de *Ananas* spp., em ambiente de ocorrência natural, de cultivo comercial e de conservação *ex situ*. Para isto, foram aplicados métodos dependentes de cultivo, além de técnicas moleculares com marcadores BOX e ERIC para caracterização das amostras e suas diferentes frações. Com base nos dados de de quantificação da microbiota por métodos dependentes de cultivos e sua complementação com as técnicas de ERIC e BOX-PCR, verificou-se a similaridade entre as composições de microrganismos independentemente do local de origem (cultivado, *ex situ* ou ambiente natural). Estas técnicas permitiram o agrupamento de isolados de amostras diferentes, como aqueles de solo, raiz e caule, em um mesmo *cluster*, permitindo inferir que há uma distribuição dos grupos funcionais desde solo até as partes aéreas das plantas. Além disso, análises de correlação indicaram associação de certos grupos funcionais às

amostras, o que sugere que as plantas estão requerendo sempre os mesmos grupos de microrganismos.

Palavras-chave: Associações microrganismos-planta. *Fingerprinting*.

ABSTRACT

Brazil is among the world's largest fruit producers, with emphasis on pineapples (*Ananas comosus* var. *comosus* (L.) Merrill y). It is believed that *Ananas* spp. maintain relations with a range of microorganisms, phytopathogenic or beneficial. However, studies on the microbial diversity associated with pineapple plants are still scarce. In this sense, the present work aimed to quantify and compare the diversity of microorganisms considered in the literature as beneficial, existing in the rhizospheric soil and the internal tissues of *Ananas* spp. from an environment of natural occurrence, commercial cultivation fields and *ex situ* conservation. For this, culture-dependent methods were applied, as well as molecular techniques with BOX and ERIC markers for characterization of the obtained samples and its fractions. These techniques allowed the grouping of isolates from different samples, such as those of soil, root and stem, in the same cluster, allowing to infer that there is a distribution of functional groups from soil to aerial parts of plants. In addition, correlation analyzes indicated the association of certain functional groups with the samples, which suggests that the plants are always requiring the same groups of microorganisms.

Palavras-chave: Microorganisms-plant associations. Fingerprinting.

INTRODUÇÃO

Diversos microrganismos podem ser encontrados no entorno de raízes e colonizando os tecidos internos das plantas, dentre os quais alguns são descritos como benéficos (POLLI, et al., 2012; RYAN et al., 2007). Entretanto, acredita-se que o número destes microrganismos conhecidos ainda é pequeno. Além disso, tais microrganismos, por possuírem habitat e nicho praticamente idêntico ao dos fitopatógenos, estão amplamente envolvidos no controle biológico (LOPES, 2015; SOUZA; MENDONÇA; SOARES, 2015), podendo atuar na promoção do crescimento vegetal, pois são capazes de aumentar a taxa de crescimento e biomassa do hospedeiro, conferir defesas adicionais contra patógenos, fixar nitrogênio, solubilizar fosfato, produzir ácido indolacético (COPE-SELBY et al., 2017).

Essas funções desempenhadas por estes microrganismos podem ser estudadas com a utilização de diversas técnicas, como por exemplo as dependentes de cultivo, que fazem uso de meios nutritivos para crescimento das populações microbianas ou por meio de métodos independentes de cultivo, como as técnicas moleculares que auxiliam investigações diretas ou indiretas das comunidades microbianas em seus habitats (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Os métodos dependentes de cultivo, apesar de menos informativos do que os derivados de técnicas moleculares, apresetam-se como uma das principais formas de comparação dos microrganismos que compõem um determinado microbioma, principalmente por permitir o isolamento dos indivíduos e sua utilização em diferentes ensaios, como os destinados à promoção de crescimento, controle biológico de pragas e doenças ou mesmo de interações patogênicas (STEFANI et al., 2015; VAZ-MOREIRA et al., 2011).

Com o intuito de se comparar a diversidade e distribuição de espécies com potencial de utilização na agricultura, se faz necessária a utilização dessas técnicas, dependentes ou não do cultivo. Neste sentido, as diferentes técnicas (dependentes e independentes de cultivo) devem ser complementares, a fim de se conhecer a diversidade e as funções que os microrganismos desempenham, nos diferentes ecossistemas (LEE, et al., 2016), uma vez que este tipo de estudo

contribui para o entendimento da ecologia microbiana de diferentes ambientes, fundamentando assim a aplicação deste conhecimento no agroecossistema (MONTAÑEZA et al., 2012).

Por esse motivo, é fundamental o emprego de técnicas que ampliem o número de informações, se complementem, e que ofereçam resultados confiáveis e reprodutíveis. Uma dessas técnicas é a rep-PCR que pode ser usada em complemento aos meios de cultivo, fundamentando-se na amplificação de regiões repetitivas intergênicas e que além de ser utilizada para diferenciação de linhagens bacterianas, tem sido amplamente empregada em estudos de diversidade genética de fungos (SILVA, 2016; SUZUKI et al., 2010; BARDAS; KOUTITA; TZAVELLA-KLONARI, 2009).

A rep-PCR baseia-se no uso de três famílias de sequências repetitivas intergênicas, a REP (*repetitive extragenic palindromic*) de aproximadamente 38pb, ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*) possuindo cerca de 126 pb e BOX 150-154 pb (VERSALOVIC et al., 1991; 1994; RADEMAKER, DE BRUJIN, 1997). O uso destas sequências torna-se confiável, pois foram largamente empregadas em estudos de diversidade genética de bactérias, e com isso tem-se propriedade das sequências dos *primers* empregados nas análises (SOUZA, 2011).

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi comparar a diversidade de microrganismos cultiváveis com potencial de aplicação biotecnológica associados à plantas de *Ananas* spp. oriundas de diferentes localidades e condições de cultivo (cultivo comercial, conservação *ex situ* [Banco Ativo de Germoplasma] e ambiente natural), por meio da utilização de meios de cultivos básicos e seletivos, complementados com as ferramentas moleculares BOX e ERIC-PCR.

MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 13 amostras, provenientes de três ambientes distintos, foram coletadas nos estados da Bahia, Mato Grosso e Rondônia (Tabela 1). Para efeito deste trabalho, considerou-se com uma amostra o conjunto de solo rizosférico e a planta correspondente. Amostras de solos na camada de 0 a 20 cm no entorno de

cada planta foram coletadas para avaliação das propriedades químicas (APÊNDICE A) e físicas (APÊNDICE B).

O solo rizoplano foi obtido da seguinte forma: amostras compostas de raízes de cada planta foi obtida e 1 grama destas raízes foi reunido dentro de um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina esterilizada de MgCl₂ a 10 mM, vortexada e o sedimento resultante definido como solo rizoplano, utilizado para isolamento dos microrganismos (BULGARELLI et al, 2012). Já o solo rizosférico foi definido como aquele coletado o mais próximo ao redor das raízes das plantas.

As amostras foram levadas ao Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizada em Cruz das Almas, Bahia, Brasil, para posterior utilizações nos ensaios de quantificação das densidades populacionais e comparação dos perfis genéticos.

No ambiente natural foram coletadas sete plantas, quatro delas no estado do Mato Grosso, duas em Rondônia e uma na Bahia. O ambiente natural, foi caracterizado como aquele em que as plantas foram coletadas em áreas de mata nativa. As três plantas dos ambientes de cultivo e as três do ambiente de conservação *ex situ* (Banco Ativo de Germoplasma) foram coletadas no Estado da Bahia (Tabela 1).

Tabela 1 – Relação de plantas coletadas para isolamentos.

Identificação	Variedade Botânica	Localização
BGA 839	<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr. var. ananassoides (Baker) Coppens & Leal	Nossa Senhora do Livramento - Mato Grosso Latitude: -15.692806; Longitude: -56.441972
BGA 840	<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr. var. ananassoides (Baker) Coppens & Leal	Poconé – Mato Grosso Latitude: -16.933806; Longitude: -56.897889
BGA 842	<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr. var. ananassoides (Baker) Coppens & Leal	Comodoro - Mato Grosso Latitude: -13.838967; Longitude: -59.762778
BGA 843	<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr. var. ananassoides (Baker) Coppens & Leal	Comodoro - Mato Grosso Latitude: -13.490306; Longitude: -59.838389
BGA 844	<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr. var. ananassoides (Baker) Coppens & Leal	Vilhena - Rondônia Latitude: -12.501056; Longitude: -60.393667
BGA 855	<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr. var. ananassoides (Baker) Coppens & Leal	Rio Crespo – Rondônia Latitude: -9.655556; Longitude: -63.071467
BGA 858	<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr. var. bracteatus (Lindl.) Coppens & Leal	Itacaré – Bahia Latitude: 14.341103 Longitude: 39.008311
BGA 139	<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr. var. comosus	Cruz das Almas – Bahia Latitude: -12.677491; Longitude: -39.089458
BGA 123	<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr. var. bracteatus (Lindl.) Coppens & Leal	Cruz das Almas – Bahia Latitude: -12.677491; Longitude: -39.089458
BGA 324	<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr. var. ananassoides (Baker) Coppens & Leal	Cruz das Almas – Bahia Latitude: -12.677491; Longitude: -39.089458
PR1	<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr. cv. pérola	Itaberaba – Bahia Latitude:-40.3308333; Longitude: 12.4370555
PR2	<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr. cv. pérola	Itaberaba – Bahia Latitude:-40.3310555;Longitude: -12.4369444
PR3	<i>Ananas comosus</i> (L.) Merr. cv. pérola	Itaberaba – Bahia Latitude:-40.3308611; Longitude:-12.4373333

Quantificação da microbiota cultivável

Os fragmentos de tecidos vegetais usados nos isolamentos foram submetidos a desinfestação superficial caracterizada por lavagem em álcool 70% (1 minuto), hipoclorito de sódio (NaClO) a 1% (1 minuto), novamente em álcool 70% (30 segundos) e posteriormente lavados em água destilada esterilizada. Como controle do processo de desinfestação superficial, 50 µL da última água de lavagem dos explantes vegetais foram semeados em placas de Petri contendo os meios de cultivo para isolamento (CANDEIAS et al., 2016).

Os fungos e bactérias do solo rizosférico, rizoplano e endofíticos de raízes, caules, bainhas e folhas foram quantificados por meio de diluição seriada, usando-se solução salina de cloreto de magnésio ($MgCl_2$ a 10 mM) com plaqueamento de 100 µL dos fatores de diluição 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} em meios seletivos, em placas de Petri, com três repetições para cada fator. Os meios seletivos usados foram o Martin com modificações (15 g de ágar; 1 g de KH_2PO_4 ; 0,5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 5 g de peptona; 10 g de dextrose; 0,033 g de rosa bengala; 0,1 g de estreptomicina) para *Trichoderma* spp., Batata Dextrose Ágar (Extrato de batata [200 g / 500 mL]; 20 g de dextrose; 17-20 g de ágar) para demais fungos, meio nutriente ágar (3 g de extrato de carne; 5 g de peptona; 15 g de ágar; água destilada [q.s.p] 1 L) para bactérias totais (BT) e BPE (Bactérias Produtoras de Endósporos), meio B de King (água destilada [q.s.p] 1 L; 15 g de ágar; 2,5 g de K_2HPO_4 ; 6 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 20 g de proteose peptona nº 3; 15 mL de glicerol) para BPS (Bactérias Produtoras de Sideróforos) e o meio Amido-Caseína-Ágar (água destilada [q.s.p] 1 L; 18 g de ágar; 0,02 g de $CaCO_3$; 0,01 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 2 g de NaCl; 2 g de KNO_3 ; 0,05 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 2g de K_2HPO_4 ; 0,3 g de caseína; 10 g de amido), para Actinobactérias (ACT).

Isolados também foram obtidos pelo isolamento indireto, com plaqueamento de seis fragmentos de tecidos de raízes, caules, bainhas e folhas em triplicata.

A semeadura da diluição em placa foi feito com uso de esferas de vidro e as placas incubadas por 24 h, a 25 °C. Após o crescimento microbiano, realizou-se a contagem do número de unidades formadoras de colônias por meio da

fórmula $UFC = n \cdot \frac{FD}{VA}$, onde n = número de colônias; FD = fator de diluição onde o número de colônias foi obtido; VA = volume da alíquota de plaqueamento. O n foi considerado em placas com no mínimo 25 e no máximo 300 colônias.

As colônias foram isoladas, de acordo com as diferenças morfológicas como cor, textura, presença/ausência de viscosidade e brilho das colônias bacterianas. Cada isolado bacteriano foi purificado pela técnica de estrias de esgotamento em placas de Petri contendo o meio de cultura nutriente ágar.

A quantificação das unidades formadoras de colônias para os fungos seguiu o mesmo padrão para as bactérias, com a fórmula descrita anteriormente. As colônias fúngicas foram isoladas com o mesmo princípio de morfotipos, tomando-se como requisitos as diferenças na coloração, cor principal e secundária, presença/ausência de setor, pouco/muito cotonosa e brilho. A purificação dos isolados fúngicos ocorreu por meio de repicagens sucessivas em meio BDA (Batata-dextrose-ágar).

Preservação de isolados

As bactérias foram conservadas mantidas em água destilada esterilizada (MARIANO & SOUZA, 2016) e em meio nutriente líquido (3 g de Extrato de carne; 5 g de peptona; água destilada [q.s.p] 1L) com glicerol 30 %. Já os fungos foram conservados por meio do método Castellani.

Para o método de conservação em água destilada esterilizada (ADE), repicou-se os isolados em tubos de 2 mL contendo ADE e incubou-se por 24h, a 25 °C em BOD. Após este período, os tubos foram armazenados a -20 °C. Já para o método de conservação em meio líquido com glicerol a 30 %, os isolados foram repicados em tubos de 2 mL contendo meio caldo nutriente e incubados por 24 h, a 25 °C em BOD. Concluída a incubação, os tubos foram centrifugados a 800 x g por 5 minutos para precipitar as bactérias. O sobrenadante foi descartado e substituído por 1 mL de solução salina de MgCl₂ a 10 mM para resuspender e lavar o precipitado. Feito isso, realizou-se uma nova centrifugação a 800 x g por 5 minutos com posterior descarte do sobrenadante e adição de 1 mL de caldo Nutriente com 30 % de glicerol. Os tubos foram então armazenados a -80 °C em ultrafreezer.

Extração de DNA de isolados bacterianos e fúngicos

Isolados bacterianos obtidos foram repicados em meio nutriente ágar onde cresceram por 48 horas, a 25 °C em BOD. Após a incubação, uma colônia de cada isolado foi removida e posta em placa para PCR esterilizada contendo água ultrapura esterilizada, seguido de aquecimento por 15 minutos em termociclador a uma temperatura de 95 °C, visando a obtenção do DNA genômico.

A extração de DNA de isolados fúngicos foi realizada em consonância com o protocolo desenvolvido por Doyle & Doyle (1990), com modificações, como se segue: discos de micélio de isolados conservados em castellani foram postos em placas de Petri contendo o meio BDA sólido, seguido de incubação em BOD a 25°C por dez dias. Após este período realizou-se a raspagem dos micélios de cada placa e colocou-se em almofarizes onde foram macerados com a utilização de nitrogênio líquido em quantidade suficiente para cobrir todo o micélio.

Em seguida, o macerado foi recolhido para tubos de 2 mL, no qual adicionou-se 1 mL de tampão de extração (concentração final: CTAB a 2,4%, NaCl a 1,7M, Tris HCL a 0,1M pH 8,0, EDTA a 20 mM, β-mercaptoetanol 0,4%, PVP 2,0 [Polivinilpirrolidona], H₂O de mili-Q q.s.p). Os tubos foram agitados em vortéx até obter-se um líquido homogeneizado e logo em seguida incubados em banho-maria a 65 °C por 30 min, sendo homogeneizados a cada 10 min.

Procedeu-se a centrifugação dos tubos a 1680 x g em temperatura ambiente por 5 min. Coletaram-se 800 µL do sobrenadante e estes transferidos para novo tubo de 2 mL. No lugar deste, adicionou-se a mesma quantidade de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e homogeneizado rapidamente. Uma nova centrifugação foi realizada por 10 minutos a 1680 x g. Retiraram-se 800 µL do sobrenadante, o qual foi transferido para novos tubos de 1,5 mL devidamente identificados. 600 µL de álcool isopropílico gelado, equivalente a aproximadamente $\frac{3}{4}$ do volume coletado (600 µL) foi adicionado e então homogeneizado suavemente, e incubado a -20 °C por 30 minutos. Novamente centrifugado por 10 minutos a 1680 x g.

O precipitado foi lavado com 500 µL de etanol 70 % e o “pellet” posto para secar. O DNA isolado foi ressuscitado em 100 µL de tampão TE (Tris HCL a 10 mM pH 8,0, EDTA a 1 mM + RNase 1,0 µl/amostra) e levados para estufa a 37 °C

para completa solubilização do DNA (30 minutos). O DNA foi conservado a -20 °C.

As quantificações dos gDNAs obtidos foram realizadas em gel de agarose a 1 %, corado com brometo de etídio ($1,5 \mu\text{L} \cdot 100\text{mL}^{-1}$), durante 1 hora, a 90 V. A quantidade dos DNAs foi determinada com base no peso molecular de marcadores de DNA lambda com pesos de 25, 50 e 100 ng. Feito isso, os DNAs foram diluídos em TE (Tris HCL a 10 mM pH 8,0, EDTA a 1 mM + RNase 1,0 $\mu\text{l}/\text{amostra}$) e ajustados para solução de trabalho de 10 ng.

Reações de BOX e ERIC-PCR

As reações em cadeia da polimerase foram realizadas com uso dos iniciadores BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (KOEUTH et al. 1995; VERSALOVICS et al., 1994) para a técnica BOX-PCR e os ERIC1R (5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3') e ERIC2 (3'- AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-5') (VERSALOVICS et al., 1991) para a técnica de ERIC-PCR. As reações de PCR foram ajustadas para um volume final de 20 μL , contendo 30 ng de DNA genômico, 0,5 mM de primer (IDT), 1 U de TaqDNA Polimerase (Promega, USA), 2 mM de MgCl_2 , 0,2 mM de dNTP, 1X de Tris KCl (Invitrogen) e água ultrapura esterilizada (q.s.p). As condições de PCR utilizadas foram uma desnaturação inicial a 95 °C por 2 minutos seguidos de 39 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 51 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minutos, e uma extensão final a 72 °C por 10 minutos em termociclador Veritti[®] 96-well (Applied Biosystems).

Os produtos das amplificações foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5 % em tampão TBE 0,5 X corado com brometo de etídio ($1,5 \mu\text{L} \cdot 100 \text{ml}^{-1}$), sob 80 V por 3 horas. Logo após, digitalizados utilizando o sistema de foto documentação Gel Logic 212 Pro (Carestream Molecular Imaging, New Haven, USA). Para estimar o tamanho dos fragmentos de DNA amplificados, foi utilizado marcador molecular de 100 pb (Fermentas).

Os padrões de bandas obtidos para os isolados foram convertidos em matrizes de ausência e presença de bandas por meio da atribuição de código binário, sendo 0 para ausência e 1 para presença de bandas.

Análise dos dados

Os dados da quantificação de unidades formadoras de colônias das amostras de solo, raiz, caule e folhas foram transformados em $\log(x + 1)$, onde x foram os valores das UFC.mL⁻¹, e comparados por meio da ANOVA, pelo teste Tukey e/ou Scott-Knott, ambos a 5% de probabilidade, usando o programa SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2008).

Os isolados bacterianos e fungicos foram comparados com base no perfil de banda para os marcadores BOX e ERI-PCR, além dos dados concatenados com base no coeficiente de dissimilaridade de Jaccard e método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages*) para a construção dos dendrogramas. Os dados foram agrupados com auxílio do pacote 'vegan' implementado no software estatístico R (R CORE TEAM, 2015).

RESULTADOS

A densidade dos microrganismos foi avaliada pela contagem de unidades formadoras de colônias em placas (UFCs). As bactérias alcançaram , 79,7 %, 89,5 % e 88,8 % de predominância nos ambientes de cultivo, de conservação *ex situ* (Banco Ativo de Germoplasma [BAG]) e natural, respectivamente (Figura 1).

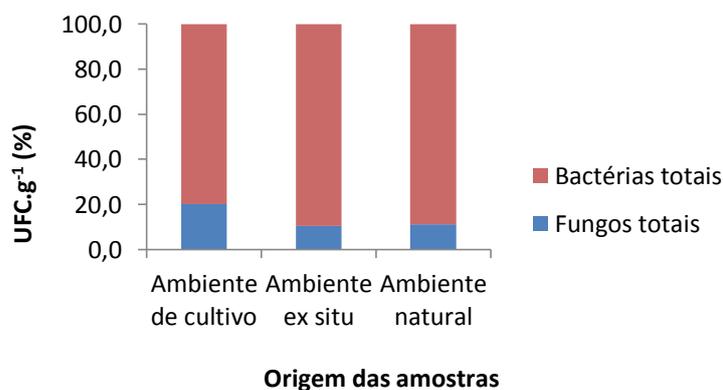


Figura 1 – Densidade de bactérias e fungos totais em três ambientes.

Em relação à densidade das bactérias e fungos totais por amostras de solos, raiz, caule, bainha e folha, notou-se que as bactérias foram predominantes nestas amostras (Figura 2). Os fungos foram verificados em maior escala em solo rizosférico (SRZ), rizoplano (SRP) e raiz nos três ambientes (Figura 2A, B e C), sendo exclusivos em amostras de bainha do ambiente *ex situ* (BAG) (Figura 2B).

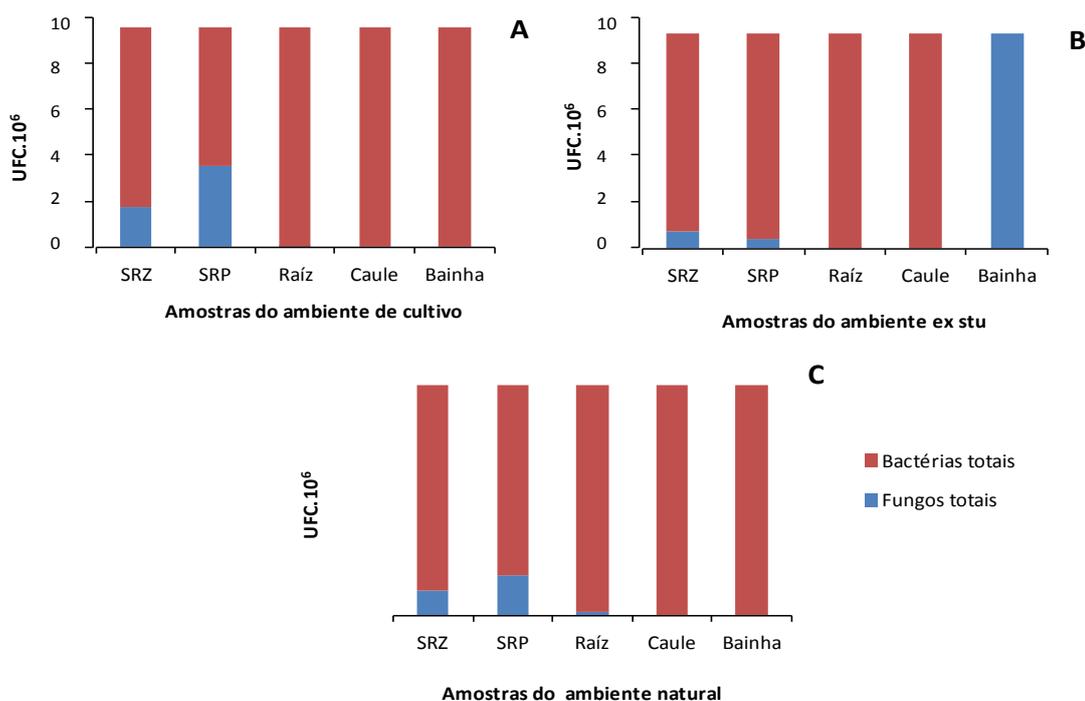


Figura 2 – Distribuição de bactérias e *Trichoderma* spp. em amostras de solos, raiz, caule, bainha e folha do ambiente de cultivo (A), *ex situ* (B) e natural (C). SRZ = Solo rizosférico; SRP = solo rizoplano. Médias seguidas por mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

Actinobactérias, BPEs, BPSs e *Trichoderma* spp. estiveram representados em todos os ambientes (Figura 3), sendo que o primeiro grupo de microrganismos apresentou a maior densidade no ambiente *ex situ* (BAG), com $6,6 \times 10^6$ UFC.g⁻¹. BPSs revelaram-se como maior número de indivíduos nos ambiente de cultivo e natural alcançando $8,0 \times 10^6$ UFC.g⁻¹ e $6,9 \times 10^6$ UFC.g⁻¹, respectivamente, do total de UFCs para este local. BPEs e Actinobactérias não diferiram significativamente nos ambientes de cultivo e natural. *Trichoderma* spp. alcançaram as menores médias em todos os ambientes (Figura 3).

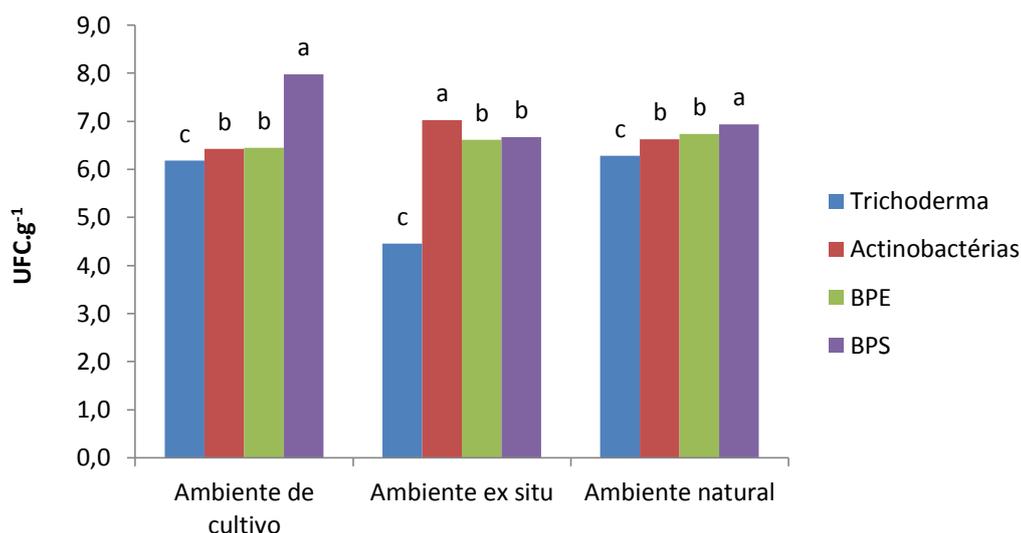


Figura 3 – Densidade total de Actinobactérias, BPEs, BPSs e *Trichoderma* spp. para cada ambiente. Médias seguidas por mesma letra não diferem estatisticamente entre si dentro de cada ambiente pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

Percebeu-se uma ampla distribuição das BPSs em todas as amostras, exceto em amostras de bacia e folhas de plantas dos ambientes de cultivo e *ex situ* (Figura 4A e B). Sendo suas maiores densidades nas amostras de SRZ, SRP e caule de plantas de ambiente de cultivo, raiz e caule de plantas de ambiente *ex situ*, em SRZ, caule e folhas de plantas do ambiente natural (Figura 4A, B e C respectivamente). Actinobactérias estiveram presentes em amostras de solos a caule dos três ambientes. E BPEs se restringiram entre amostras de solos à

bainha dos três ambientes. Populações de *Trichoderma* spp. ficaram restritas às amostras de solos e raízes das plantas dos ambientes de cultivo e natural (Figura 4A e C). Entretanto foi exclusiva em folhas dos abacaxizeiros do ambiente *ex situ* (Figura 4B).

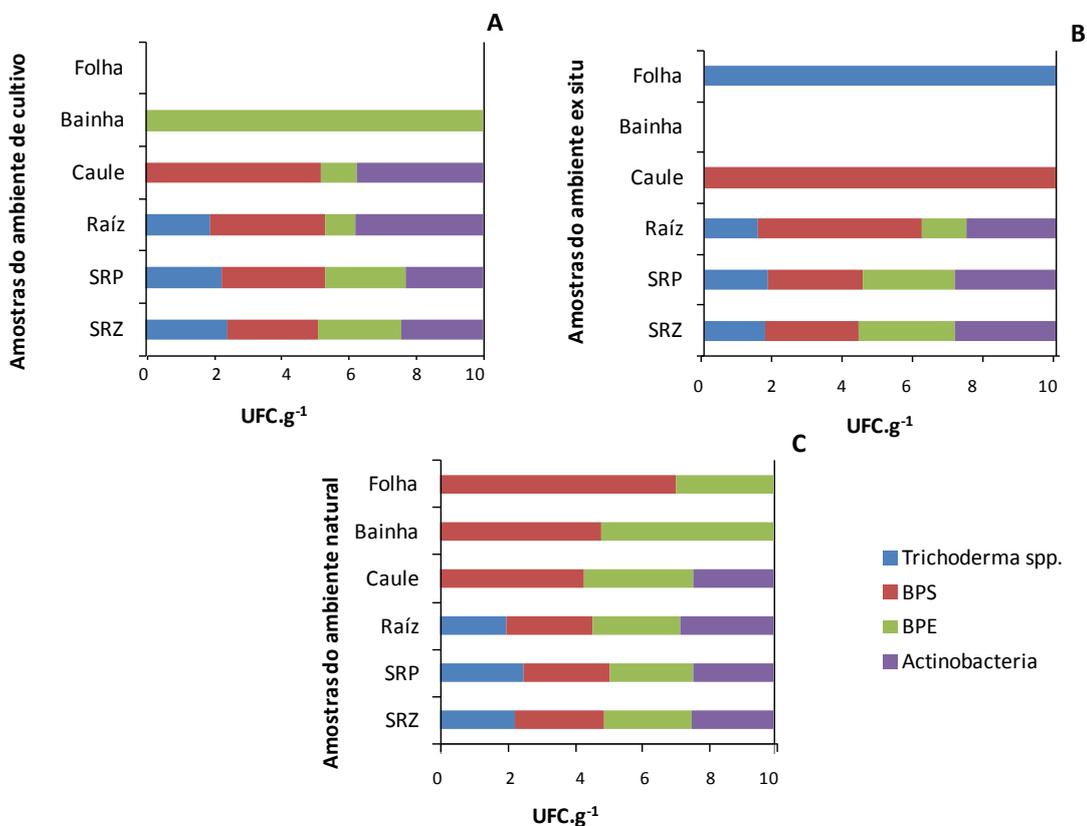


Figura 4 – Densidade de Actinobactérias, BPEs, BPSs e *Trichoderma* spp. em amostras de solos, raiz, caule, bainha e folha do ambiente de cultivo (A), *ex situ* (B) e natural (C). SRZ = Solo rizosférico; SRP = solo rizoplano. Médias seguidas por mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Comparando as análises da densidade total para os três ambientes de estudo não se verificaram diferenças significativas entre eles. O ambiente de cultivo apresentou um total de $7,2 \times 10^{14}$ UFC.g⁻¹, seguido pelos ambientes natural com $7,1 \times 10^{14}$ UFC.g⁻¹ e de conservação *ex situ* com $6,7 \times 10^{14}$ UFC.g⁻¹.

Foi percebida, a partir da análise da densidade absoluta nas amostras provenientes dos ambientes, uma maior presença de microrganismos em solos (SRZ e SRP), além de raízes e caules (Figura 5). No ambiente de cultivo, *ex situ* e natural não houve diferenças significativas em relação a densidade microbiana nas amostras de solo da rizosfera e do rizoplano, atingindo respectivamente $6,1 \times 10^6$ UFC.g⁻¹ e $6,5 \times 10^6$ UFC.g⁻¹ no ambiente de cultivo, $5,7 \times 10^6$ UFC.g⁻¹ tanto para SRZ quanto para SRP no ambiente *ex situ*, e $6,2 \times 10^6$ UFC.g⁻¹ para ambas no natural. As maiores diferenças foram encontradas entre amostras de solos e as partes aéreas como bainhas e folhas as quais apresentaram os menores valores de UFC.g⁻¹. Isso evidencia que a carga microbiana nos abacaxizeiros diminuiu no sentido solos-ápice das plantas.

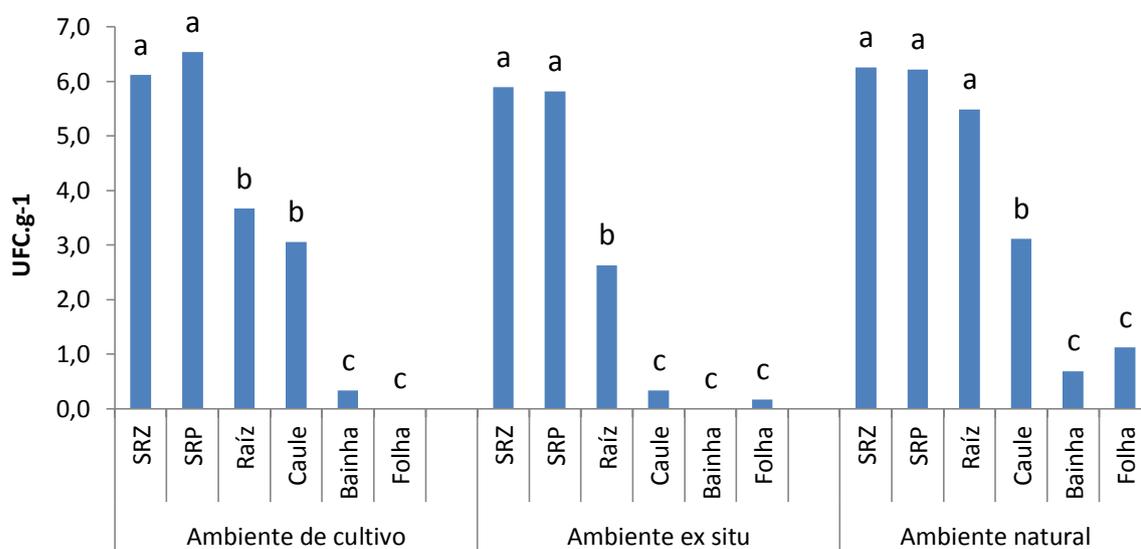
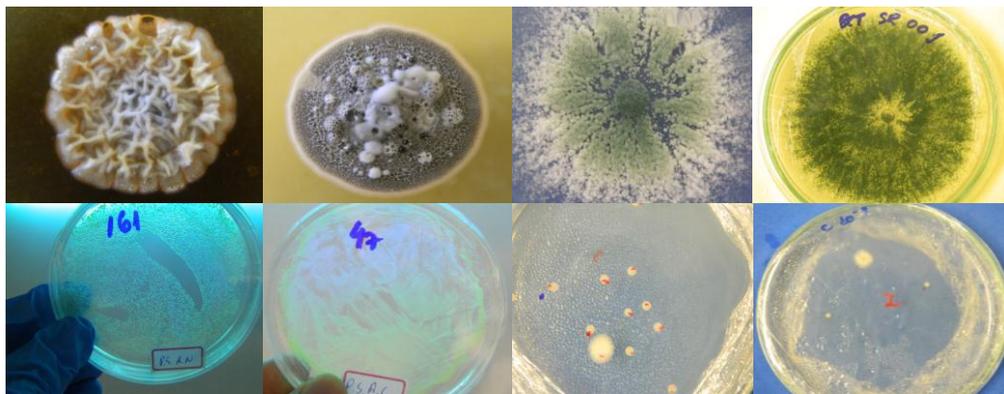


Figura 5 – Densidade dos microrganismos por amostras dos três ambientes. SRZ = Solo rizosférico; SRP = solo rizoplano. Médias seguidas por mesma letra pertencem ao mesmo grupo pelo teste Scott-Knott a 5 % de probabilidade.

Dentre o total de isolados obtidos, foram selecionados 430 morfotipos com as características dos grupos de interesse deste trabalho (Figura 6). Os demais isolados corresponderam àqueles que foram selecionados nos meios seletivos e nos meios básicos para bactérias e fungos, que não apresentavam características dos grupos funcionais.



Fonte: o autor.

Figura 6 – Características morfológicas de isolados morfotipos. **A e B**: Morfotipos de Actinobactéria; **C e D**: Morfotipos de *Trichoderma* spp.; **E e F**: Morfotipos de Bactérias produtoras de sideróforos (BPSs); **G e H**: Morfotipos de Bactérias produtoras de endósporos (BPEs).

Obteve-se a composição de morfotipos dos quatro grupos em índice percentual para os três ambientes, considerando-se a sua distribuição em solo rizosférico (SRZ), rizoplano (SRP), raiz, caule, bainha e folha. Morfotipos de *Trichoderma* spp., bactérias produtoras de endósporos (BPEs), actinobactérias e bactérias produtoras de sideróforos (BPSs) foram isolados praticamente de forma equitativa em amostras de solo rizoplano, rizosférico, raiz, caule e bainha nos três ambientes (Figura 7). Entretanto, percebeu-se um maior percentual de morfotipos de *Trichoderma* spp. nas partes aéreas (100 % em folhas do ambiente *ex situ*) e BPSs distribuídas praticamente em todas as amostras de todos os ambientes (Figura 7).

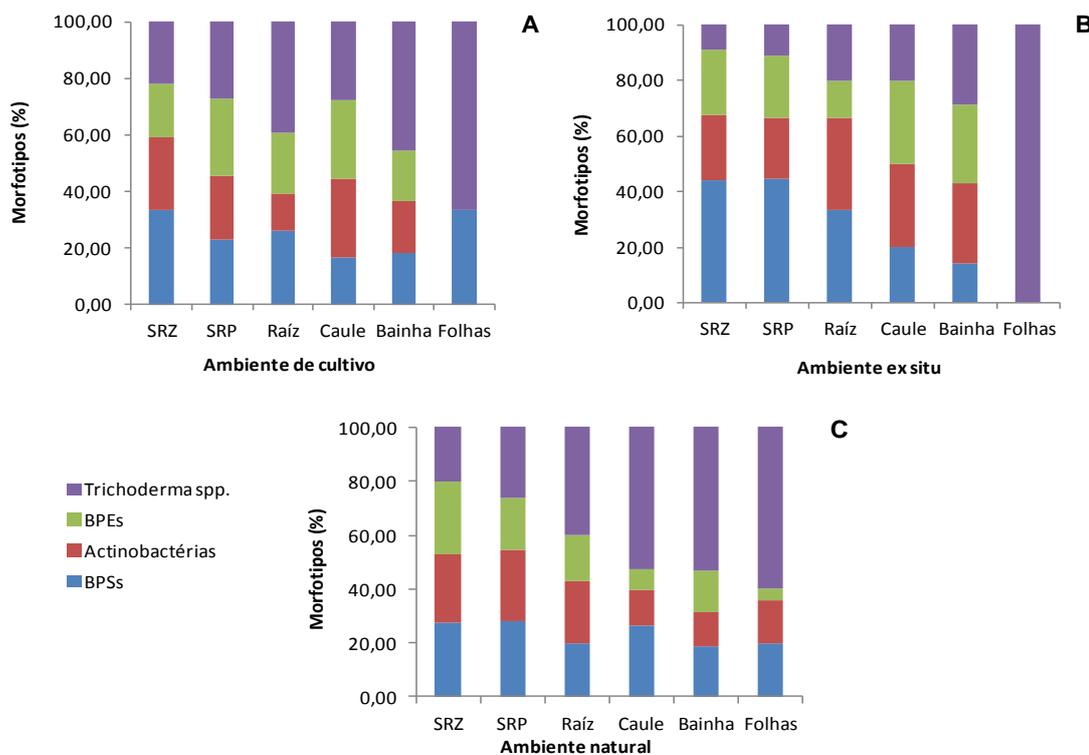


Figura 7 – Percentuais de morfotipos de *Trichoderma* spp., BPEs, Actinobactérias e BPSs provenientes do ambiente de cultivo (A), ex situ (B) e natural (C), por amostras. SRZ = solo rizosférico; SRP = solo rizoplano.

Foi obtido um total de 829 isolados, sendo que destes, 385 foram fúngicos e 444 bacterianos. Os mesmos foram separados em morfotipos levando-se em consideração o crescimento em meio seletivo e as características macroscópicas das colônias.

Dentre os três ambientes comparados neste trabalho, o de ocorrência natural de *A. comosus* (L.) Merr. foi aquele em que se obteve o maior número de isolados, 226 de bactérias e 233 de fungos, totalizando 459, seguido pelo ambiente de conservação ex situ (BAG), com total de 202 isolados e do ambiente de cultivo com 168 isolados (Figura 8).

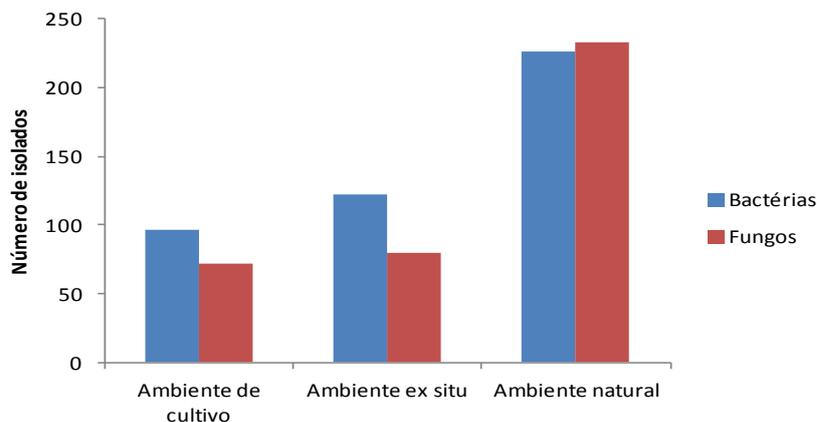


Figura 8 – Número total de isolados obtidos nos ambientes de cultivo, de conservação *ex situ* e de ocorrência natural de *A. comosus* (L.) Merr.

Fungos e bactérias totais foram isolados dos três ambientes e foram definidos como sendo aqueles com características morfológicas diferentes entre si. A ocorrência de ambos foi detectada desde amostras de solos até folhas dos três ambientes. Foi percebida uma maior ocorrência de bactérias totais nos solos rizosférico e do rizoplane (Figuras 9A e 9B, respectivamente). Esta ocorrência diminui no sentido raiz-folhas. Em contra partida, observou-se menor ocorrência dos fungos nos solos rizosférico e do rizoplane e maior no sentido raiz-ápice das plantas (Figura 9, de C a F). Sendo que nas folhas observou-se maior ocorrência de fungos dentre todas as amostras (Figura 9F).

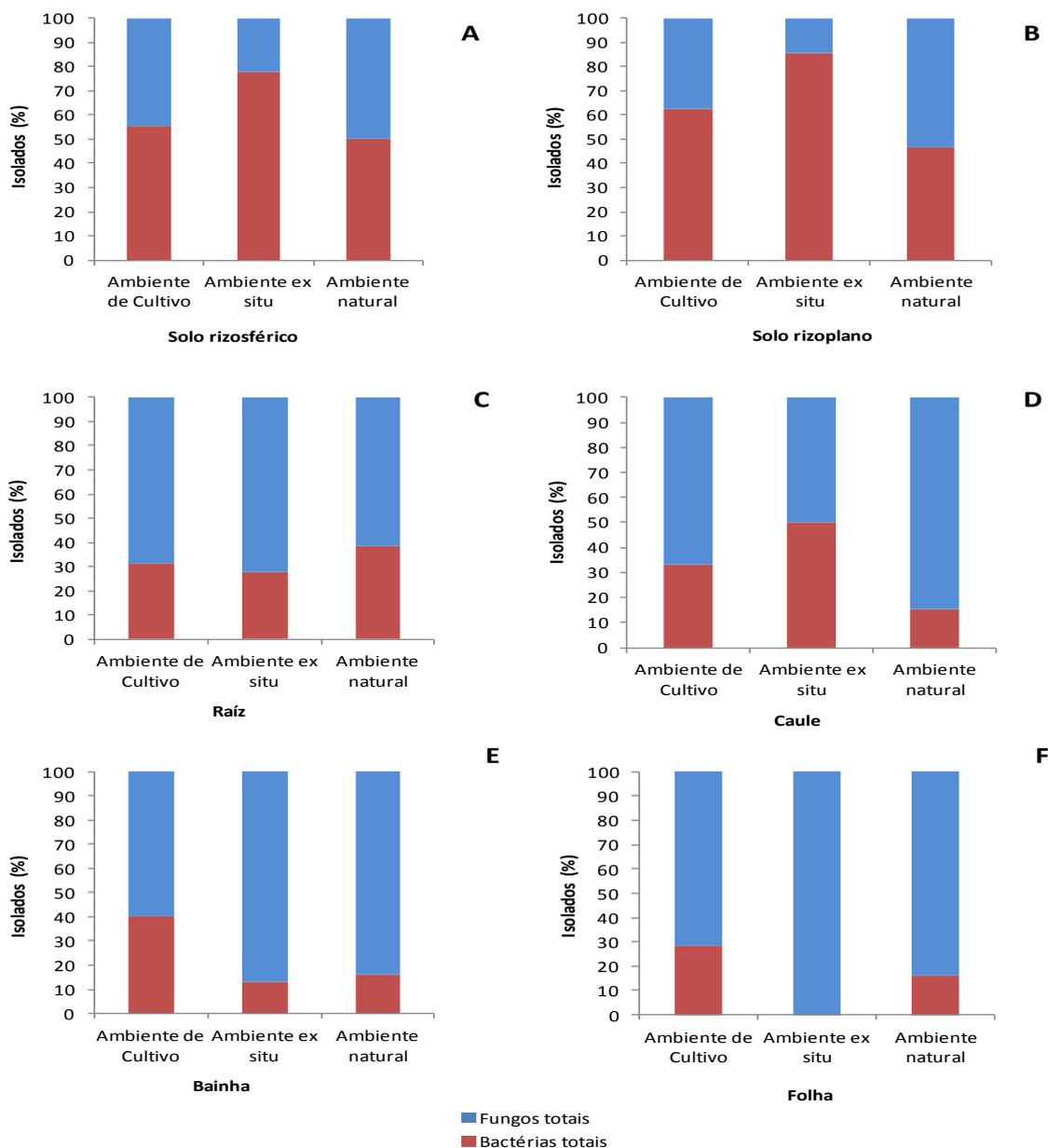


Figura 9 – Percentual de isolados de fungos e bactérias nos ambientes de cultivo, *ex situ* e natural. **A**: Percentual em amostras de solo rizosférico dos três ambientes; **B**: Em amostras de solo rizoplano; **C**: Em raízes; **D**: Em caules; **E**: Em bainhas; **F**: Em folhas.

As análises de componentes principais (Figura 10B) e agrupamento hierárquico (Figura 10A) das amostras de solo com base nas propriedades físico-químicas permitiram a formação de quatro grupos de solo com características físico-químicas muito próximas. Entretanto, duas amostras de solo de ambiente *ex situ* (Banco Ativo de Germoplasma de abacaxi) (BGA123 e BGA139) foram

agrupadas separadamente, principalmente pelo fato destas duas amostras de solo apresentarem os maiores níveis de P inorgânico e pH próximo à neutralidade (APÊNDICE A).

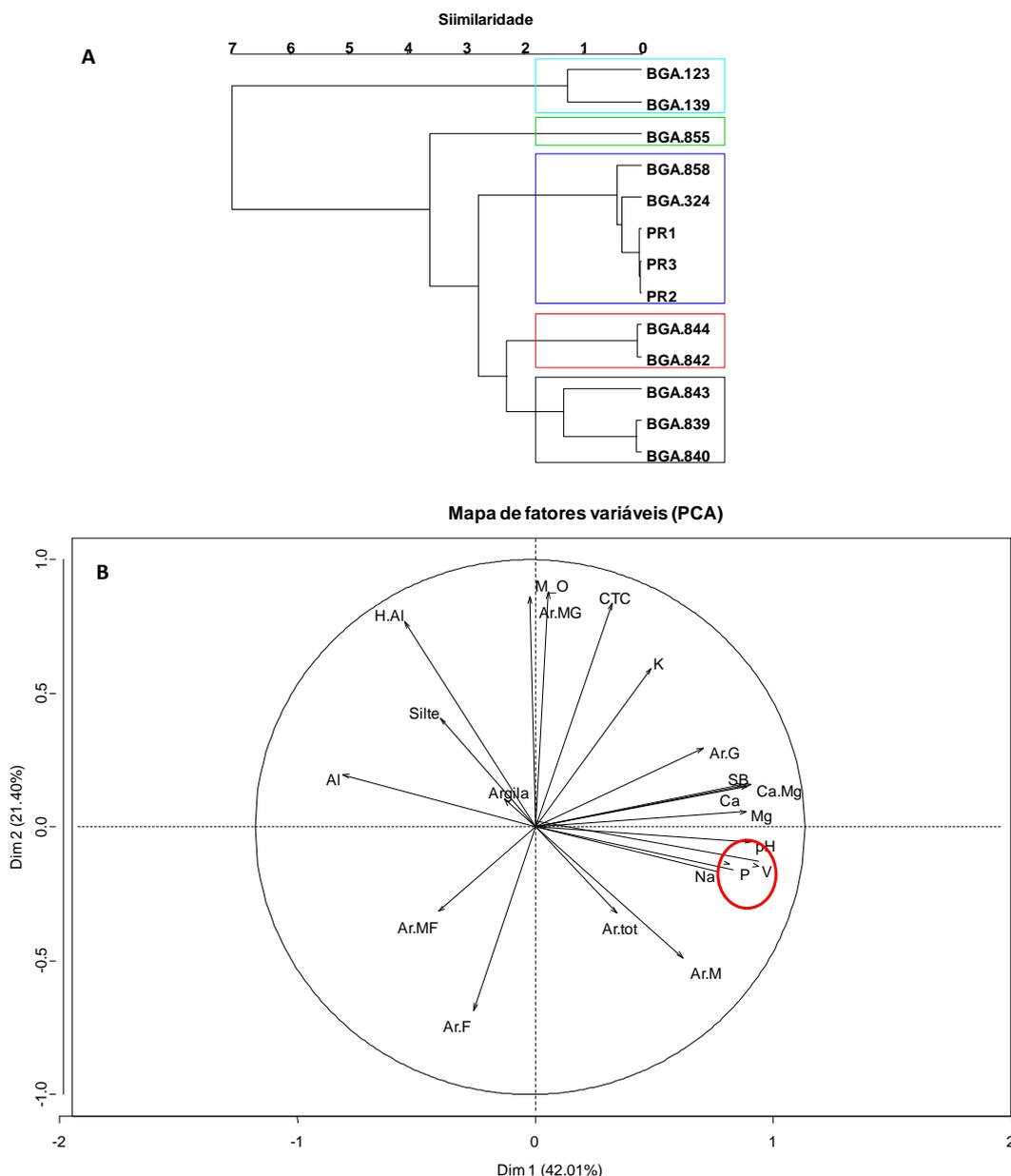


Figura 10 – Agrupamento hierárquico (A) e mapa dos autovalores das variáveis quantitativas provenientes da análise química do solo e qualitativa obtida na análise física e textural com base nos dois primeiros componentes principais extraídos da análise fatorial de dados mistos (B) para os solos dos ambientes natural, de cultivo e de conservação *ex situ*. Círculo vermelho indica alto nível de fósforo inorgânico em amostras.

Comparação dos isolados por meio de BOX-PCR e ERIC-PCR

Do total de isolados citado acima, foram selecionados 210, fungos e bactérias, para extração de DNA genômico. Destes, 116 tiveram seus DNAs extraídos.

As técnicas ERIC-PCR e BOX-PCR levaram à formação de bandas polimórficas na maior parte dos 116 isolados utilizados. As reações foram repetidas para confirmação do padrão de bandas dos isolados.

Foi observado um total de 37 bandas pela técnica de ERIC-PCR (APÊNDICE C) e 26 bandas por BOX-PCR (APÊNDICE D) para os isolados fúngicos dos três ambientes. Já para os isolados bacterianos, a técnica de ERIC-PCR gerou um total de 90 *amplicons* (APÊNDICES E e F) e BOX-PCR um total de 73 bandas (APÊNDICES G e H). Todas as bandas, tanto para uma técnica quanto para outra, apresentaram tamanhos que variaram de 100 pb a 3000 pb, sendo que os isolados apresentaram número e tamanho de bandas distintos.

Apenas 25 % dos isolados não apresentaram produtos de amplificação ou não exibiram boa qualidade de resolução das suas bandas.

Após análise dos perfis de bandas obtidos para as duas técnicas empregadas, obtiveram-se os dendrogramas utilizando o coeficiente de dissimilaridade de Jaccard e UPGMA como método de agrupamento. Foi definido um limiar de 90 % de distância para formação de grupos maiores, a fim de perceber as relações entre isolados das diferentes amostras (solo, raiz, caule, folhas) e entre os ambientes, permitindo uma abrangência maior nas análises.

Considerando o limiar de 90 % de dissimilaridade, ocorreu a formação de 8 *clusters*, após análise dos perfis dos *amplicons* gerados pela técnica BOX-PCR (Figura 11). A variação da similaridade foi de aproximadamente 55 % a 100 % entre os oito *clusters*. Dos oito grupos, três foram compostos exclusivamente por bactérias isoladas de amostras de solo dos três ambientes.

Os demais grupos apresentaram bactérias isoladas de diferentes amostras, mas que mantém uma relação entre si. E apenas um isolado não se agrupou dentre os 45 que amplificaram para a técnica BOX-PCR.

Para a técnica ERIC-PCR foram obtidos 12 *clusters* (Figura 12), todos constituídos por bactérias isoladas de amostras de solo com similaridade às encontradas em amostras de raízes e partes aéreas como caules e folhas. Dentre os 61 isolados que apresentaram produtos de amplificação para a técnica ERIC-PCR, 4 não foram agrupados indicando que estes não possuem uma relação genética próxima com os demais.

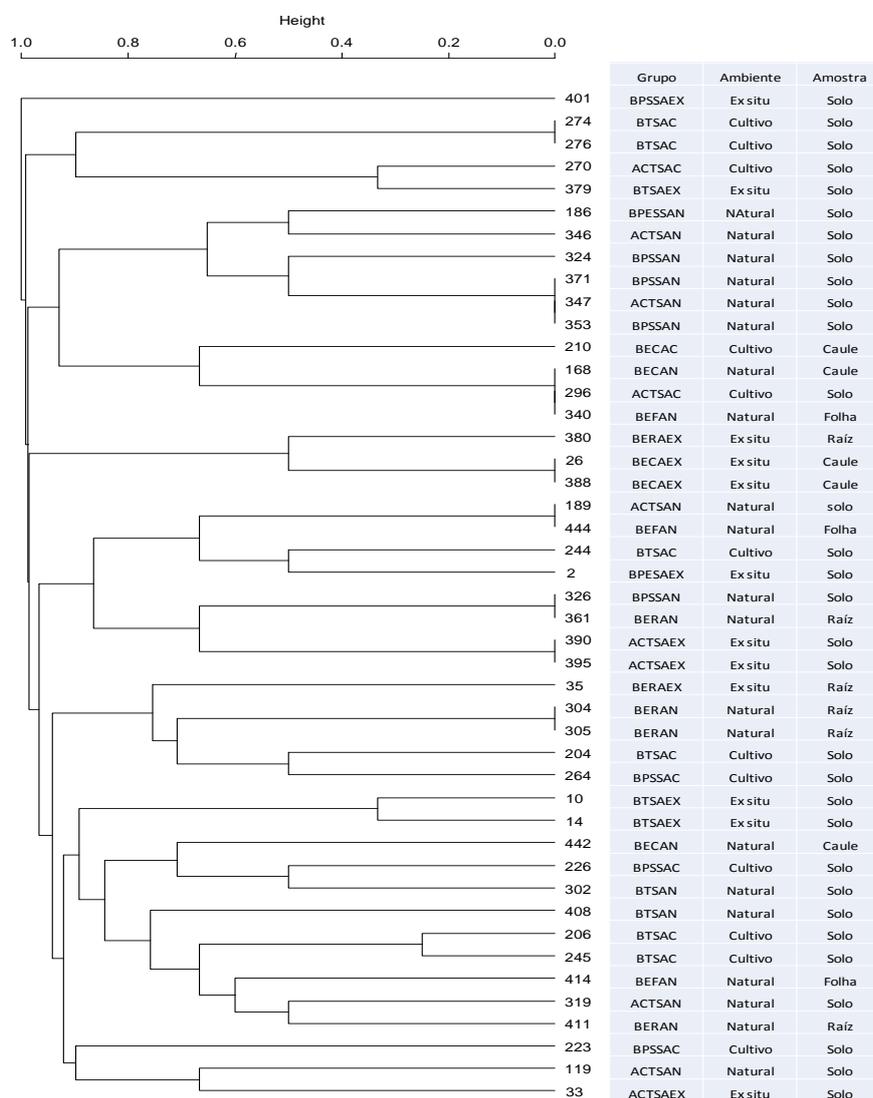


Figura 11 - Dendrograma plotado a partir dos perfis de banda dos produtos de amplificação da técnica BOX-PCR para isolados de bactérias dos ambientes natural, *ex situ* e cultivado, usando o coeficiente de dissimilaridade de Jaccard (J) através do método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages). **BTSAN/C/EX** = Bactérias Totais de Solo de Ambiente Natural/Cultivo/*Ex situ*; **ACTSAN/C/EX** = Actinobactérias Totais de Solo de Ambiente Natural/Cultivo/*Ex situ*; **BPSSAN/C/EX** = Bactérias Produtoras de Sideróforos de Solo de Ambiente Natural/Cultivo/*Ex situ*; **BPESAN/C/EX** = Bactérias Produtoras de Endósporos de Ambiente Natural/Cultivo/*Ex situ*; **BERAN/C/EX** = Bactérias Endofíticas de Raiz de Ambiente Natural/Cultivo/*Ex situ*; **BECAN/C/EX** = Bactérias Endofíticas de Caule de Ambiente Natural/Cultivo/*Ex situ*; **BEFAN/C/EX** = Bactérias Endofíticas de Folha de Ambiente Natural/Cultivo/*Ex situ*.

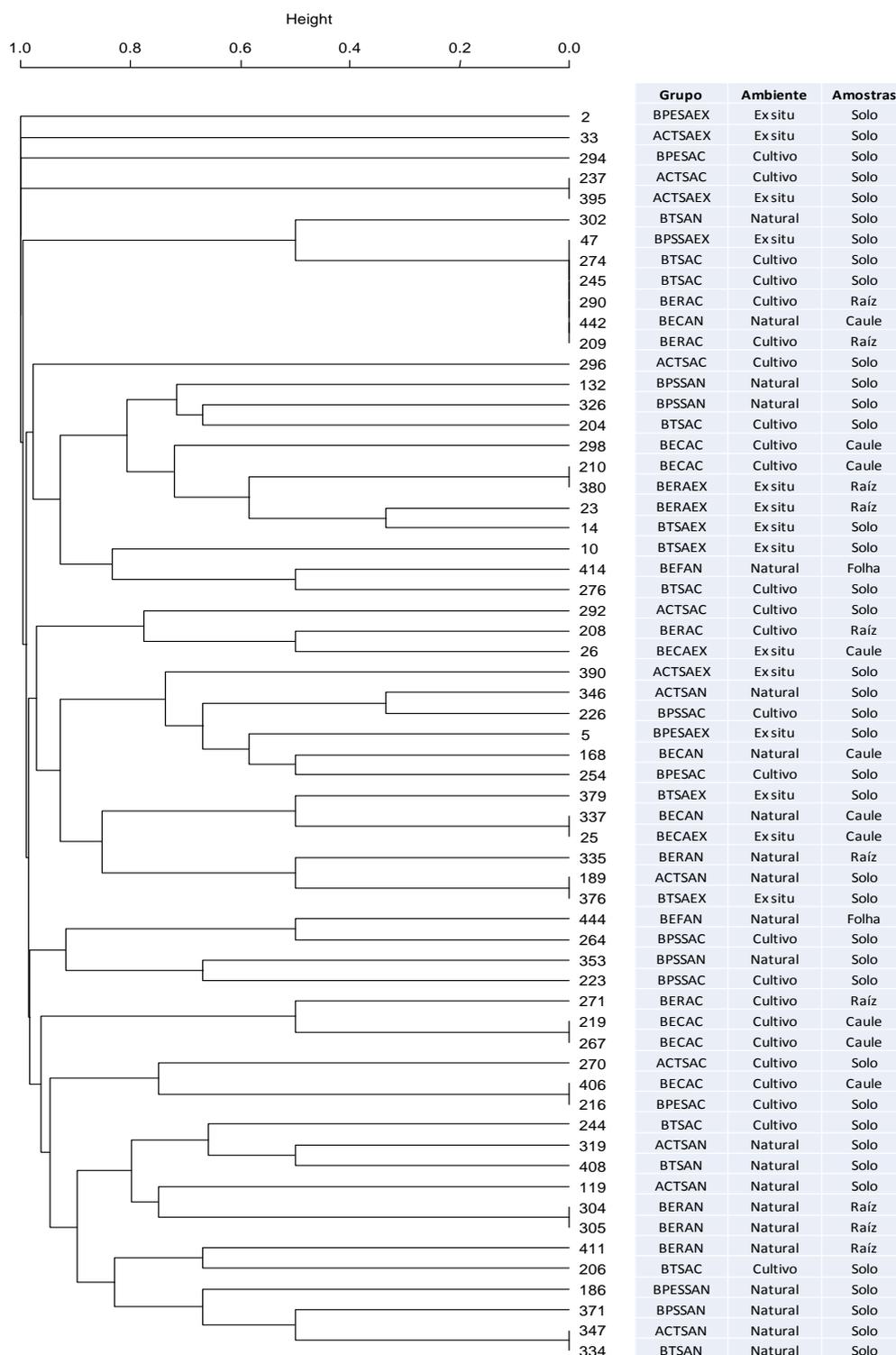


Figura 12 - Dendrograma plotado a partir dos perfis de banda dos produtos de amplificação da técnica ERIC-PCR para isolados de bactérias dos ambientes natural, *ex situ* e cultivado, usando o coeficiente de dissimilaridade de Jaccard (J) através do método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages). **BTSAN/C/EX** = Bactérias Totais de Solo de Ambiente Natural/Cultivo/*Ex situ*; **ACTSAN/C/EX** = Actinobactérias Totais de Solo de Ambiente Natural/Cultivo/*Ex situ*; **BPSSAN/C/EX** = Bactérias Produtoras de Sideróforos de Solo de Ambiente Natural/Cultivo/*Ex situ*; **BPESAN/C/EX** = Bactérias Produtoras de Endósporos de Ambiente Natural/Cultivo/*Ex situ*; **BERAN/C/EX** = Bactérias Endofíticas de Raíz de Ambiente Natural/Cultivo/*Ex situ*; **BECAN/C/EX** = Bactérias Endofíticas de Caule de Ambiente Natural/Cultivo/*Ex situ*; **BEFAN/C/EX** = Bactérias Endofíticas de Folha de Ambiente Natural/Cultivo/*Ex situ*.

A junção dos dados obtidos pelas duas técnicas permitiu o agrupamento de 38 isolados amplificados em comum pelas duas técnicas, permitindo a formação de 11 grupos (Figura 13). Sendo que os dois últimos formados exclusivamente por bactérias isoladas de amostras de solo dos ambientes. A similaridade entre os *clusters* variou entre 56 % a 100 %.

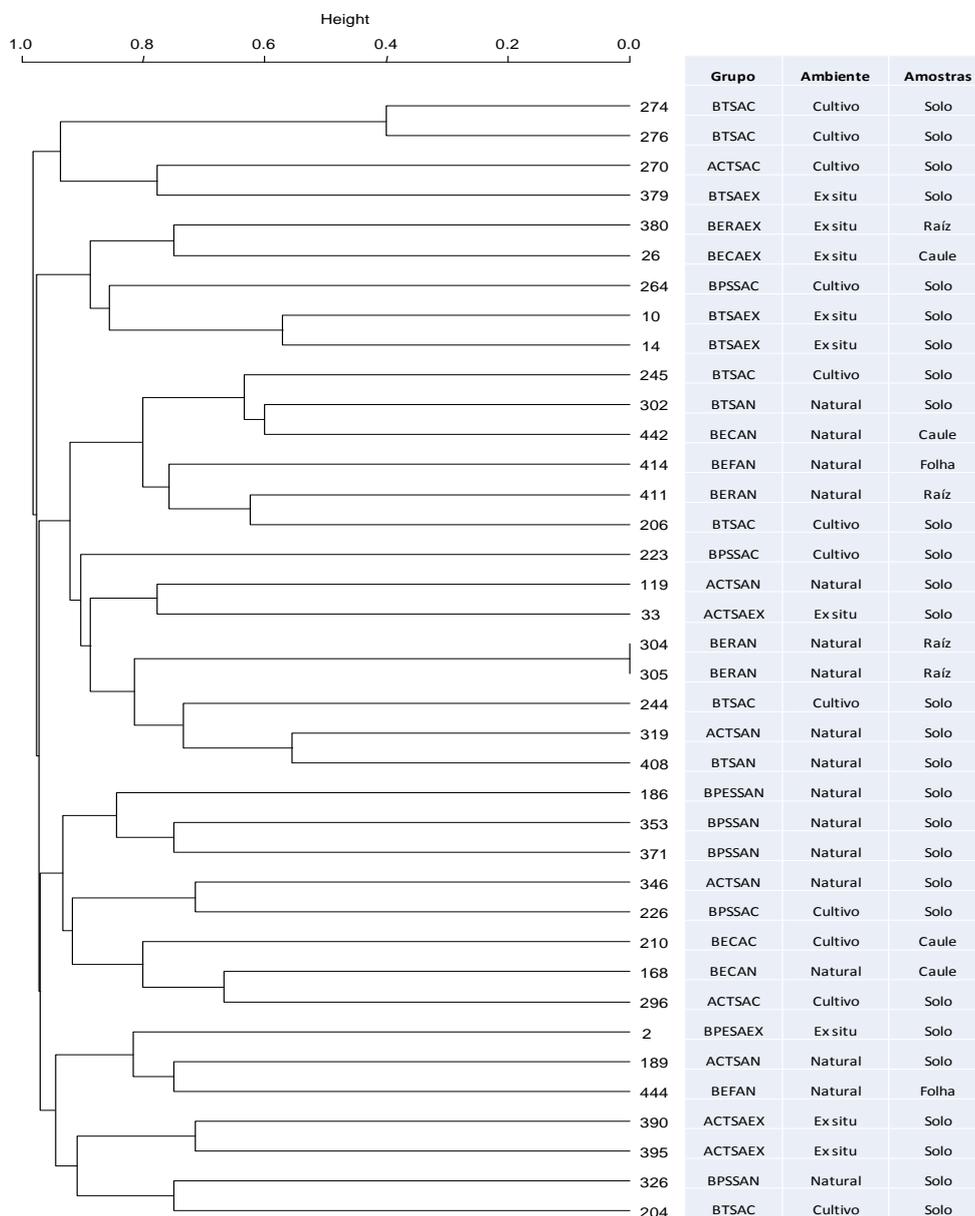


Figura 13 - Dendrograma plotado a partir da concatenação dos dados gerados pelos perfis de banda dos produtos de amplificação das técnicas BOX e ERIC-PCR para bactérias, usando o coeficiente de dissimilaridade de Jaccard (J) através do método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages). **BTSAN/C/EX** = Bactérias Totais de Solo de Ambiente Natural/Cultivo/Ex situ; **ACTSAN/C/EX** = Actinobactérias Totais de Solo de Ambiente Natural/Cultivo/Ex situ; **BPSSAN/C/EX** = Bactérias Produtoras de Sideróforos de Solo de Ambiente Natural/Cultivo/Ex situ; **BPESAN/C/EX** = Bactérias Produtoras de Endósporos de Ambiente Natural/Cultivo/Ex situ; **BERAN/C/EX** = Bactérias Endofíticas de Raíz de Ambiente Natural/Cultivo/Ex situ; **BECAN/C/EX** = Bactérias Endofíticas de Caule de Ambiente Natural/Cultivo/Ex situ; **BEFAN/C/EX** = Bactérias Endofíticas de Folha de Ambiente Natural/Cultivo/Ex situ.

A BOX-PCR para fungos, a partir do mesmo limiar de dissimilaridade, permitiu gerar a formação de 4 grupos maiores de isolados fúngicos dos três ambientes (Figura 14). A menor similaridade entre os grupos foi de 80%. Dos 31 isolados usadas para a técnica 5 não foram agrupados.

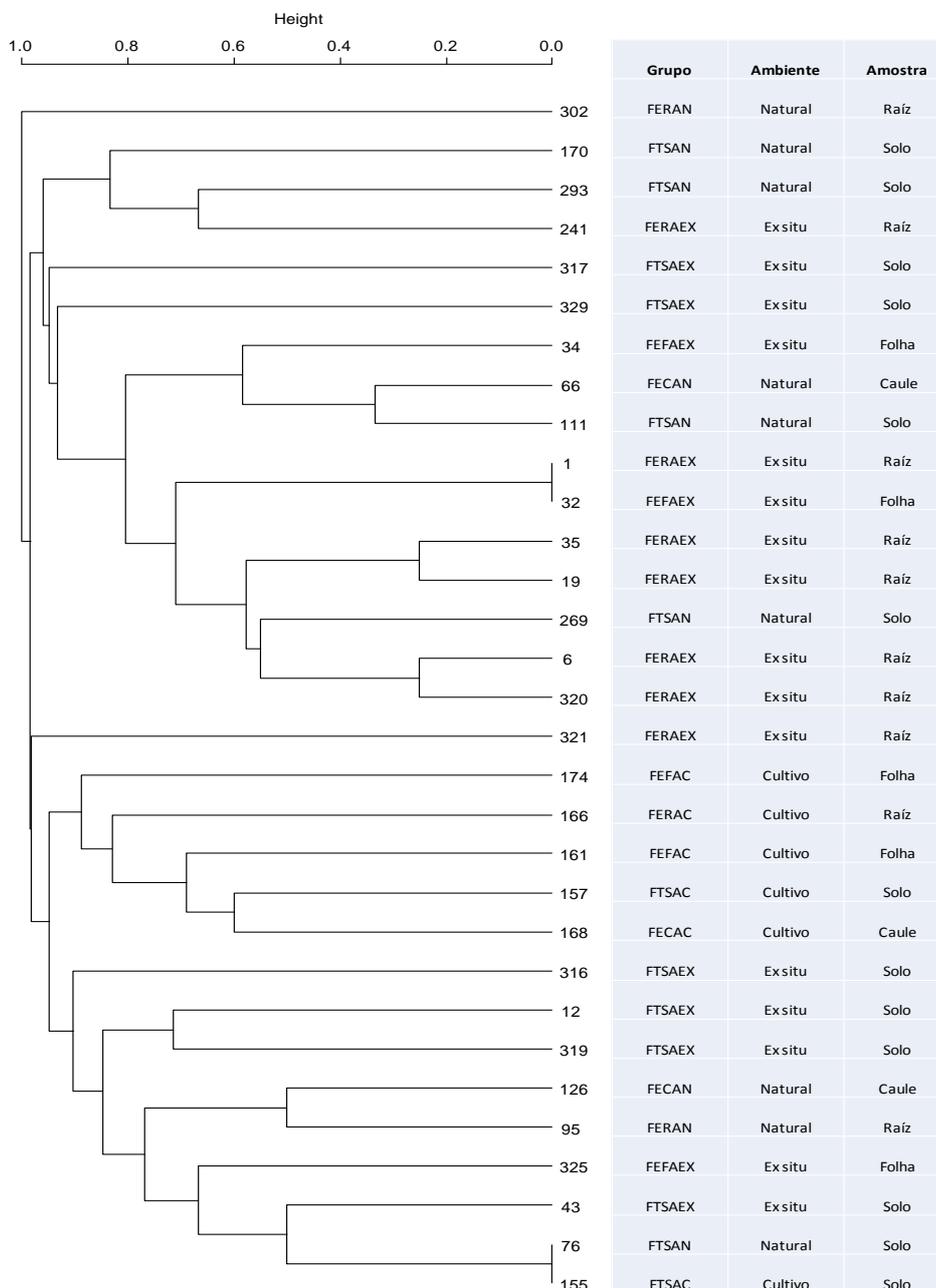


Figura 14 - Dendrograma plotado a partir dos perfis de banda dos produtos de amplificação da técnica BOX-PCR para fungos, usando o coeficiente de dissimilaridade de Jaccard (J) através do método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages). **FERAN/C/EX** = Fungo Endófito de Raíz de Ambiente Natural/Cultivo/Ex situ; **FTSAN/C/EX** = Fungos Totais de Solo de Ambiente Natural/Cultivo/Ex situ; **FECAN/C/EX** = Fungo Endófito de Caule de Ambiente Natural/Cultivo/Ex situ; **FEFAN/C/EX** = Fungos Endófitos de Folha de Ambiente Natural/Cultivo/Ex situ.

Já para a ERIC-PCR foram originados 7 grupos maiores de isolados fúngicos (Figura 15). A menor similaridade entre os grupos foi também de 80%. Dentre os 29 isolados que amplificaram, 2 não foram agrupados.

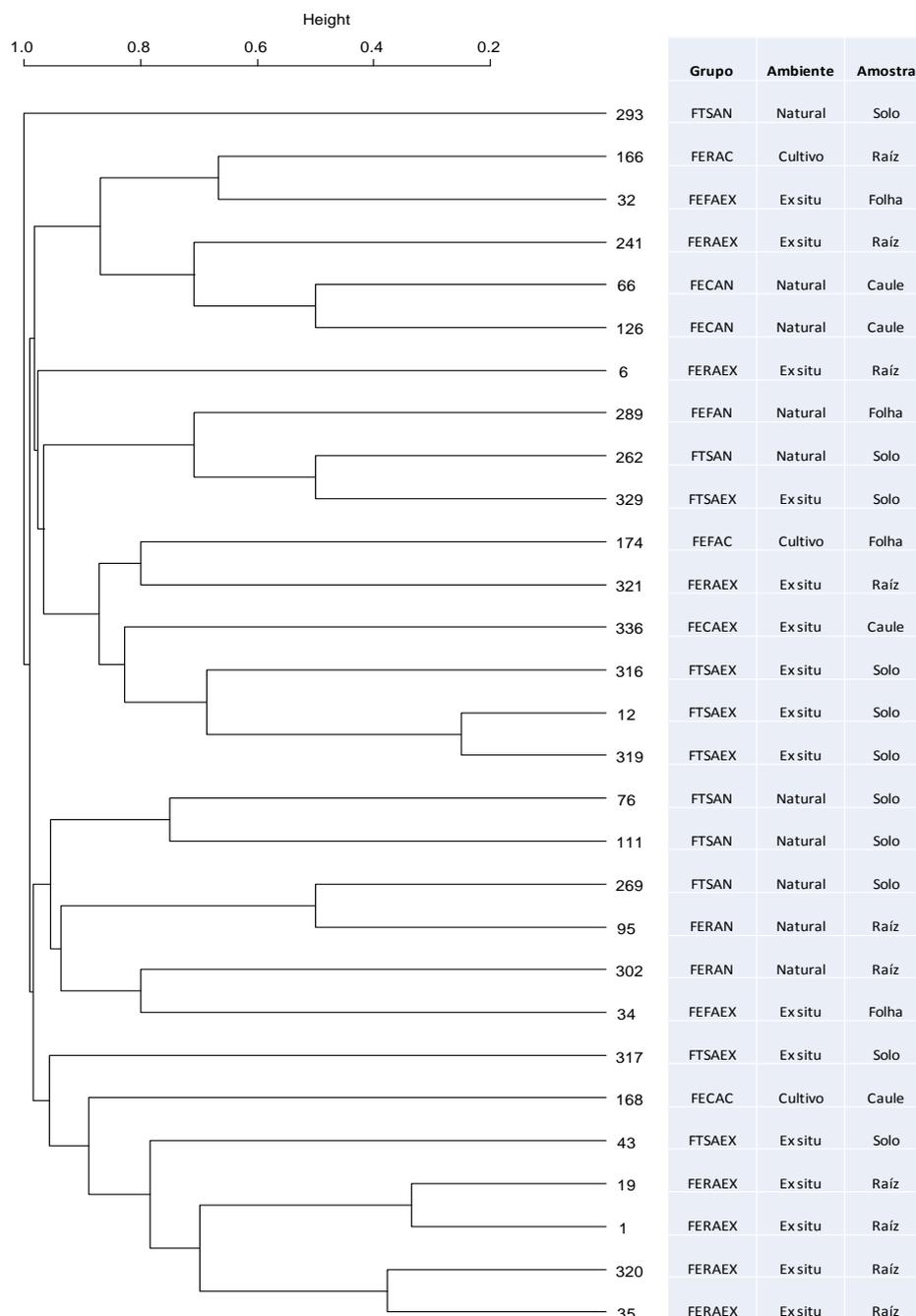


Figura 15 - Dendrograma plotado a partir dos perfis de banda dos produtos de amplificação da técnica ERIC-PCR para fungos, usando o coeficiente de similaridade de Jaccard (J) através do método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages). **FERAN/C/EX** = Fungo Endofítico de Raiz de Ambiente Natural/Cultivo/Ex situ; **FTSAN/C/EX** = Fungos Totais de Solo de Ambiente Natural/Cultivo/Ex situ; **FECAN/C/EX** = Fungo Endofítico de Caule de Ambiente Natural/Cultivo/Ex situ; **FEFAN/C/EX** = Fungos Endofíticos de Folha de Ambiente Natural/Cultivo/Ex situ.

Tanto para a BOX-PCR (Figura 14) quanto para ERIC-PCR (Figura 15), houve agrupamento entre isolados de solo e aqueles provenientes de raízes, caules e folhas.

A concatenação dos dados obtidos por BOX-PCR e ERIC-PCR possibilitou a formação de dois *clusters* e seis isolados não agrupados a 85 % de dissimilaridade (Figura 16). É possível observar que seus resultados não diferiram dos anteriores, pois isolados de amostras de solo agruparam-se com isolados provenientes de raiz e caule, indicando que estes microrganismos estão presentes principalmente em solo e raízes.

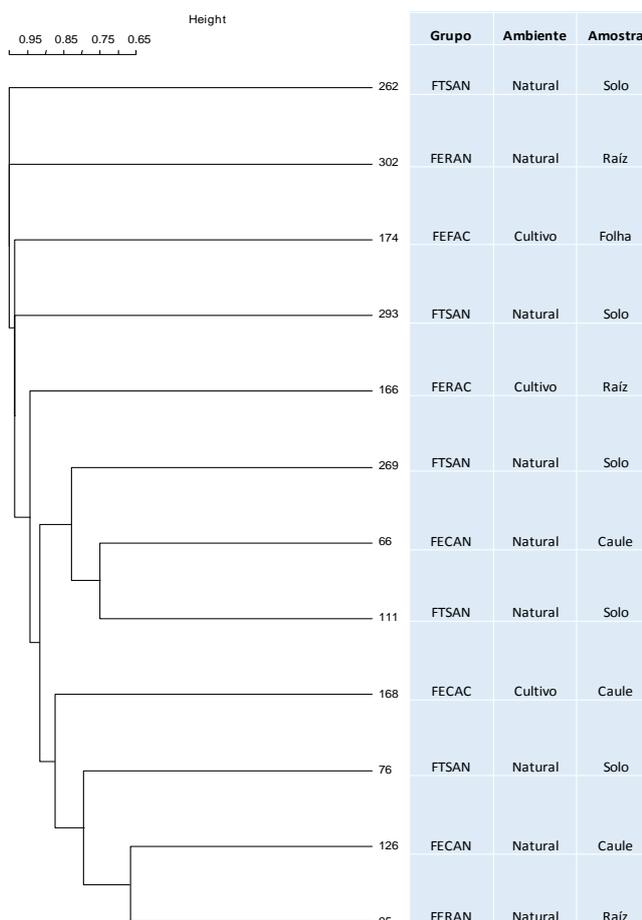


Figura 16 - Dendrograma gerado a partir dos perfis de banda dos produtos de amplificação das técnicas BOX-PCR e ERIC-PCR concatenados, para perfis genéticos de fungos, usando o coeficiente de similaridade de Jaccard (J) através do método de agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages). **FERAN/C/EX** = Fungo Endofítico de Raiz de Ambiente Natural/Cultivo/Ex situ; **FTSAN/C/EX** = Fungos Totais de Solo de Ambiente Natural/Cultivo/Ex situ; **FECAN/C/EX** = Fungo Endofítico de Caule de Ambiente Natural/Cultivo/Ex situ; **FEFAN/C/EX** = Fungos Endofíticos de Folha de Ambiente Natural/Cultivo/Ex situ.

As relações genéticas entre os isolados de diferentes amostras e ambientes não tiveram enormes discrepâncias entre as duas técnicas, as quais evidenciaram agrupamentos entre isolados de solo, raiz, caule e folha, indicando uma possível distribuição dos microrganismos nas plantas.

As análises de correspondência, baseadas no isolamento dos grupos funcionais, indicaram a formação de cinco *clusters* (Figura 17), onde os componentes principais das dimensões explicam 88 % da correlação entre os grupos formados, considerado excelente para este tipo de análise. O primeiro *cluster* (círculo amarelo) foi constituído por microrganismos, principalmente fungos totais e aqueles isolados como *Trichoderma* spp. de amostras de folhas e caule dos ambientes natural e de cultivo.

No segundo *cluster* (círculo marrom), diferentemente do anterior, correlacionaram-se mais fortemente dentro do grupo os microrganismos isolados de amostras de solo rizosférico (SRZ), rizoplano (SRP) e de raiz, além de caule dos ambientes natural, de cultivo e *ex situ* (BAG). Os morfotipos dos microrganismos que melhor se relacionaram com estas amostras foram aqueles pertencentes aos grupos ACT (Actinobactérias), BPS (Bactérias produtoras de sideróforos), BPE (Bactérias produtoras de endósporos) e BTS (Bactérias totais). Além disso, percebe-se uma proximidade grande entre os tipos de solo SRZ, SRP e raiz, indicando um padrão de distribuição dos microrganismos no microbioma vegetal.

Esta relação entre os tipos de solo (SRZ e SRP), também apareceu para o terceiro *cluster* (círculo azul), constituído por amostras dos solos do ambiente *ex situ*, no qual os morfotipos (ACT, BPS, BPE e BTS) estiveram muito mais próximos.

O quarto grupo foi composto por uma associação entre amostras de raiz e caule do ambiente *ex situ* (círculo verde), entretanto com correlação menor para os grupos destacados acima. O quinto *cluster* formou-se com amostras de folhas do ambiente *ex situ*. A este *cluster*, esteve correlacionado o grupo de fungos totais (FTS).

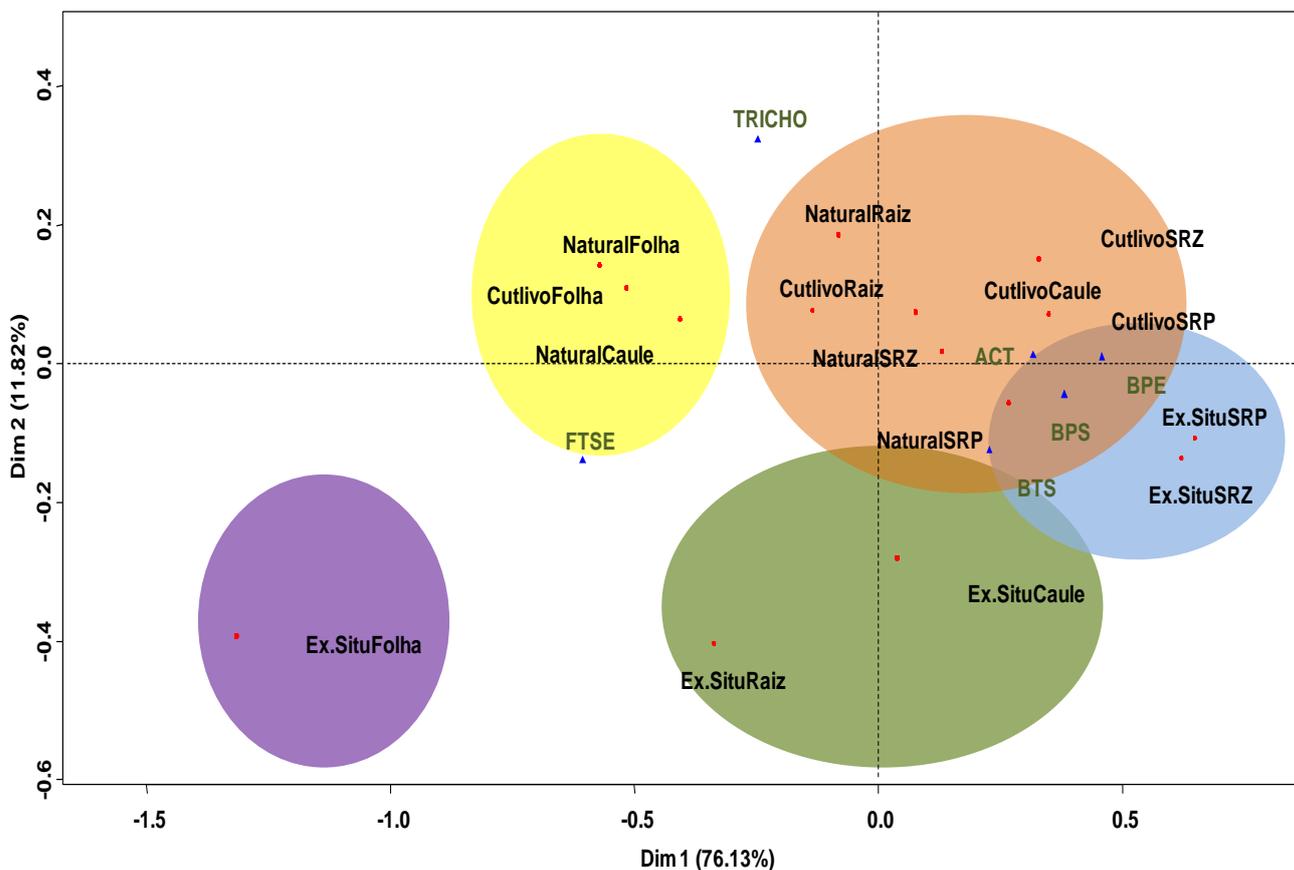


Figura 17 – Mapa de fatores da análise de Correspondência entre ambiente/amostra/grupos funcionais. Círculos indicam os clusters formados entre os ambientes por análise de componentes principais; triângulos indicam os grupos funcionais e pontos indicam as amostras e seus respectivos ambientes. SRZ = solo rizosférico; SRP = Solo rizoplano; ACT = Actinobactérias; BPS = Bactérias Produtoras de Sideróforos; BPE = Bactérias Produtoras de Endósporos; BTS = Bactérias Totais de Solo; FTS = Fungos Totais de Solo; TRICHO = *Trichoderma* spp.

DISCUSSÃO

O fato de o maior número de isolados e morfotipos terem sido provenientes do ambiente natural está atrelado ao número de plantas coletadas nesse ambiente, o qual foi superior aos demais, para possibilitar a abrangência da ocorrência geográfica dos microrganismos.

A maior ocorrência de morfotipos e UFC.g⁻¹ de *Trichoderma* spp. e fungos totais nas partes aéreas (caule, bainha e folhas) pode ser explicada pela capacidade de disseminação de inóculos por estes microrganismos. Por meio da

disseminação horizontal, os fungos podem liberar seus esporos tanto de forma ativa quanto passiva, sendo as duas formas eficientes para sua dispersão. Uma forma de liberação passiva de inóculos se dá por impactos de água ou do vento, o qual pode ser responsável também pela dispersão dos esporos. Brimner e Boland (2003) ao fazer uma análise aprofundada da atividade antagonista de *Trichoderma* spp. relataram a detecção de esporos desse fungo no ar.

Uma vez liberados, os esporos podem se depositar facilmente sobre folhas, germinar e penetrar na planta por meio de aberturas naturais como os estômatos, ferimentos ou pela colonização de espaços intercelulares por meio da formação de haustórios. Tadych et al. (2014) afirmam que certos grupos de fungos endofíticos formam estruturas reprodutivas externas e crescem principalmente nas folhas das plantas hospedeiras.

A predominância de bactérias em todos os ambientes e amostras e a maior ocorrência no solo daquelas dos grupos estudados neste trabalho é justificável, uma vez que este é um dos seus principais habitats, sobretudo os solos próximos às raízes, que são ricos em rizodepósitos. Coadunando desta forma com Philippot et al. (2013) e De Boer et al. (2015), os quais afirmam que esses microrganismos são atraídos por nutrientes, mucilagens, células mortas liberados pelas plantas.

A esses fatos se pode atribuir também a capacidade de disseminação das bactérias, a qual é mais limitada que a dos fungos, ocorrendo principalmente por ocupação de espaço pela reprodução das células. A reprodução rápida e o tamanho das células permitem o aumento exponencial das populações e a ocupação de espaços nas partículas de solo que não são alcançados pelos fungos. Esta ocupação de espaço por multiplicação das células contribui para que, embora em menor diversidade e quantidade, as bactérias alcancem também as partes aéreas das plantas. Esse movimento é fundamental para o sucesso da colonização da planta hospedeira (COOLEY; MILLER; MANDRELL, 2003).

As BPSs (Bactérias produtoras de sideróforos) foram o grupo mais abundante nos ambientes de cultivo e natural. Neste grupo podem-se incluir espécies pertencentes às famílias Pseudomonadaceae ou Burkholderiaceae, as quais de acordo com Philippot et al. (2013) estão entre as mais dominantes na microbiota rizosférica. Ainda de acordo com estes autores, membros destas famílias são considerados como estrategistas *r*, aumentando rapidamente a

população e respondendo concomitantemente às exsudações radiculares, pois são capazes de utilizar um número grande de compostos de carbono.

Representantes dessas famílias ainda são capazes de produzir substâncias fungicidas ou fungistáticas em solo (OLIVEIRA et al., 2003). Com isso, a presença das BPSs pode ter contribuído para a baixa incidência dos fungos nos três ambientes. Além disso, a baixa predominância dos fungos percebida no ambiente natural pode ter sido influenciada pelo Al, que neste ambiente apresentou em média a maior concentração ($0,71 \text{ cmol}_c.\text{dm}^{-3}$). Isso pode ter afetado o crescimento das populações destes microrganismos uma vez que, em consonância com Moreira & Siqueira (2006) concentrações altas de alumínio afetam negativamente a germinação e a formação do tubo germinativo de esporos de fungos.

O fato das Actinobactérias terem sido o grupo com a maior abundância no ambiente *ex situ* provavelmente está atrelado à maior concentração em média ($199,3 \text{ mg}.\text{dm}^{-3}$) de fósforo (P) registrada entre os ambientes. Actinobactérias são exímias solubilizadoras de fósforo, o que é confirmado por Franco-Correa & Chavarro-Anzola, (2016), os quais revelam que no processo de solubilização são utilizados principalmente fósforo inorgânico e ácidos orgânicos, que contêm fósforos que são libertados pelos solubilizadores (JOG et al., 2014).

Outros microrganismos pertencentes aos grupos estudados neste trabalho, como, por exemplo, aqueles que incluem-se nas BPSs, BPEs e *Trichoderma* spp., também podem atuar como solubilizadores de fosfato. Entretanto, as Actinobactérias possuem características incomuns aos demais grupos. São capazes de crescer nos mais variados tipos de solo, podendo ser encontrados na superfície ou a dois metros de profundidade, e produzir diferentes compostos, como antifúngicos, bactericidas, inseticidas, conferindo às Actinobactérias a capacidade de atuar fortemente na antibiose (BARKA et al., 2016; HAMDALI et al., 2008).

É sabido que membros deste filo são responsáveis pela produção de enzimas quitinolíticas que degradam a parede celular micelial de fungos parasitas, antifúngicos como nigrecina, geltanamicina (BARKA et al., 2016), o que pode refletir em outros grupos de fungos. Além disso, também podem produzir sideróforos, o que lhes permitem concorrer com outros microrganismos pelo ferro disponível no solo.

O ambiente *ex situ* apresentou em média pH 5,9, o mais próximo do neutro quando comparado com os outros dois ambientes, que tiveram em média solos mais ácidos. É sabido (BARKA et al., 2015) que Actinobactérias crescem melhor em ambientes com pH entre 6 e 9. E isso atrelado a uma média considerável de matéria orgânica, menor disponibilidade de água no solo, o que pode ter alterado a fisiologia das plantas, refletindo na diminuição da liberação de seus exsudatos, pode ter contribuído para alteração da comunidade microbiana nesse local, favorecendo o maior crescimento das Actinobactérias nesse ambiente, já que respondem bem a estresses por fatores abióticos.

Tais características e o fato de terem encontrado grande disponibilidade de fósforo inorgânico, pH ótimo para crescimento no ambiente *ex situ* possivelmente fizeram deste grupo um forte competidor no microbioma da rizosfera, reduzindo a população dos demais microrganismos, os quais devem ter sido o fator preponderante para que apresentasse a maior abundância no ambiente *ex situ*.

Os três ambientes apresentaram níveis populacionais que não diferiram significativamente entre si. Isso pode estar atrelado ao fato de que as maiores populações microbianas foram percebidas em amostras de solos, principalmente rizosféricos, os quais são ricos em compostos, liberados pelas plantas através de suas raízes, que favorecem o crescimento de diferentes populações microbianas (LAKSHMANAN et al., 2014; PHILIPPOT et al., 2013; RYAN et al., 2009).

Solos rizosféricos e do rizoplane estão constantemente sobre influência dos exsudatos liberados pelas raízes, independentemente da espécie vegetal. Como discutido anteriormente, as plantas liberam uma série de compostos essenciais para manutenção do metabolismo de inúmeros microrganismos presentes nestes solos. Em contrapartida, estes microrganismos influenciam o comportamento das plantas nos diversos ambientes (MOMMER et al., 2016; PHILIPPOT et al., 2013). Isso justificaria a maior abundância dos microrganismos nos solos (SRZ e SRP), e nas raízes de plantas dos três ambientes. Além disso, os dados de UFCs deixaram claro que a densidade microbiana diminuiu no sentido solo-ápice das plantas.

Fica evidente, quando se comparam as imagens dos produtos de amplificações, as distinções nos padrões de bandas resultantes das duas técnicas utilizadas. Geralmente, os produtos de amplificações gerados pelo *primer* BOX tendem a apresentar robustez e complexidade, diferentemente daqueles

resultantes das ampliações pelos REP, os quais são menos complexos. Os *primers* ERIC resultam em bandas que são perfeitamente distinguíveis entre si, porém eles apresentam grande sensibilidade à perturbações na reação (RADEMAKER *et al.*, 2000). A técnica de ERIC-PCR permite distinguir melhor os *amplicons* dentro de um mesmo isolado e entre isolados diferentes. Isso indica que estas técnicas são eficientes para análises da similaridade entre isolados, o que as tornam confiáveis quanto à reprodutibilidade.

A proximidade dos isolados fúngicos aos clusters constituídos por amostras de tecidos das partes aéreas como os caules e folhas, sustenta o padrão de distribuição dos fungos nas plantas utilizadas neste trabalho. Padrão este, caracterizado por maior presença de fungos em amostras de raízes e folhas.

Os agrupamentos gerados pelas técnicas BOX-PCR e ERIC-PCR, evidenciaram que os microrganismos isolados de diferentes amostras correlacionaram-se entre si. O fato de isolados de Actinobactérias (ACT), BPSs e BPEs integrarem juntamente alguns *clusters*, pode está associado ao uso de meio seletivo para as Bactérias Produtoras de Sideróforos. Isso porque, segundo a literatura (SANTOS *et al.* 2014; LEE *et al.*, 2012; WILSON *et al.*, 2006) os três grupos possuem membros que produzem sideróforos. Com isso, não se exclui a possibilidade de Actinobactérias e BPE (Bactérias Produtoras de Endósporos) terem sido isoladas como BPS (Bactérias Produtoras de Sideróforos).

Sendo assim, este trabalho poderá, futuramente, embasar investigações mais aprofundadas sobre diversidade microbiana benéfica associada à abacaxizeiros, pois os dados apresentados indicam possíveis locais para a busca de microrganismos que podem ser empregados para beneficiar o desenvolvimento vegetal.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, pelo PPGMA, à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, principalmente ao Centro Nacional de Pesquisa Mandioca e Fruticultura por prover meios para realização do projeto e ao Centro de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudo.

REFERÊNCIAS

BARDAS, G. A.; KOUTITA, O.; TZAVELLA-KLONARI, K. Molecular Diversity and Assessment of Biological Characteristics of Greek Colletotrichum lindemuthianum Populations. **Journal of Phytopathology**, v. 157, n. 5, p. 311–318, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0434.2008.01477.x>>.

BARKA, E. A. et al. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 80(1), 2016, p.1–43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>.Address.

BRIMNER, T. A., & BOLAND, G. J. A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, 100(1–3), 2003, p. 3–16, . [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(03\)00200-7](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(03)00200-7)BULGARELLI et al. Revealing structure and assembly cues for Arabidopsis root inhabiting bacterial microbiota. **Nature**. vol. 488, 2012, pg. 91-95.

CANDEIAS, E. L. et al. Fungos endofíticos de raízes de sisal antagonistas ao **Aspergillus Niger**. *Agrotrópica*. 2016, pg. 29 - 36.

COOLEY, M. B., MILLER, W. G., & MANDRELL, R. E. Colonization of Arabidopsis thaliana with Salmonella enterica and enterohemorrhagic Escherichia coli O157 : H7 and competition by Enterobacter asburiae. **Appl Environ Microbiol**, 69(8), 2003, p. 4915–4926. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4915>.

COPE-SELBY, N.; COOKSON, A.; SQUANCE, M.; DONNISON, I.; FLAVELL, R.; FARRAR, K. Endophytic bacteria in Miscanthus seed: implications for germination, vertical inheritance of endophytes, plant evolution and breeding. **GCB Bioenergy**, v. 9, n. 1, p. 57–77, 2017.

CRIPPS-GUAZZONE, N., et al. Rhizosphere and endophytic colonisation of ryegrass and sweet corn roots by the isolate Trichoderma atroviride LU132 at different soil pHs. **New Zealand Plant Protection**, 69, 2016, p. 78–85.

DE BOER, W., et al. Antifungal rhizosphere bacteria can increase as response to the presence of saprotrophic fungi. **PLoS ONE**, 10(9), 2015, p. 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137988>

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, n. 1, 1990, p. 13-15.

FAKRUDDIN, Md.; MANNAN, K. S. B. Methods for Analyzing Diversity of Microbial Communities in Natural Environments. **Ceylon Journal of Science (Bio. Sci.)**. vol. 42(1), 2013, p. 19-33.

FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras. vol. 6, 2008, p. 36-41.

FRANCO-CORREA, M., & CHAVARRO-ANZOLA, V. Actinobacteria as Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Actinobacteria - Basics and Biotechnological*

Applications. 2016. <https://doi.org/10.5772/61291>

HAMDALI, H., et al. Screening for rock phosphate solubilizing Actinomycetes from Moroccan phosphate mines. ***Applied Soil Ecology***, 38(1), 2008, p. 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2007.08.007>

JOG, R., PANDYA, M., NARESHKUMAR, G., & RAJKUMAR, S. Mechanism of phosphate solubilization and antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from wheat roots and rhizosphere and their application in improving plant growth. ***Microbiology (Reading, England)***, 160, 2014, p. 778–788. <https://doi.org/10.1099/mic.0.074146-0>

KOEUTH, T., VERSALOVIC, J., & LUPSKI, J. R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. ***Genome Research***, 5(4), 1995, p. 408–18. <https://doi.org/10.1101/gr.5.4.408>

LAKSHMANAN, Venkatachalam; SELVARAJ, Gopinath; BAIS, Harsh P. Functional Soil Microbiome: Belowground Solutions to an above ground problem. ***Plant Physiology***, vol. 166, pp. 689–700, 2014.

LEE, J. et al. Siderophore production by actinomycetes isolates from two soil sites in Western Australia. ***BioMetals***, v. 25, n. 2, 2012, p. 285–296.

LOPES, R. B. M. Montagem e análise do genoma parcial de *Bacillus thuringiensis* BAC3151 endofítico das folhas do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*). Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da **Universidade Federal de Viçosa**). 2015, p. 1-81.

MARIANO, R. de L. R.; SOUZA, E. B. de S. Manual de práticas em fitobacteriologia. EDUFRPE, 2016, p. 1-234.

MOMMER, L., HINSINGER, P., PRIGENT-COMBARET, C., & VISSER, E. J. W. Advances in the rhizosphere: stretching the interface of life. ***Plant and Soil***, 407(1–2), 2016, p. 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-3040-9>

MONTAÑEZA, A. et al. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects in vitro. ***Applied Soil Ecology***. vol. 58, 2012, p. 21– 28.

MOREIRA, F. M. de S; SIQUEIRA, J. O. ***Microbiologia e Bioquímica do solo***. 2 ed, UFLA, Lavras, Minas Gerais. 2006, p. 729.

OLIVEIRA, A. L. M. de, Segundo Urquiaga, & Baldani, J. I. Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. ***Embrapa Agrobiologia***, 2003, p. 40.

PHILIPPOT, L. et al. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. ***Nature reviews***. vol. 11, 2013, p. 789-799.

POLLI, A. et al. Aspectos da interação dos microrganismos endofíticos com plantas hospedeiras e sua aplicação no controle biológico de pragas na agricultura. **SaBios: Rev. Saúde e Biol.**, v.7, n.2, 2012, p.82-89.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2015. URL <http://www.Rproject.org/>

RADEMAKER, J. L. W.; DE BRUIJN, F. J. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. In: ANOLLES, G. G.; GRESSOHOFF, P. M. **DNA markers: protocols, applications e overviews**. New York: J. Willey e sons, 1997. p. 151-171.

RADEMAKER, J. L. W.; HOSTE, B.; LOUWS, F. J.; KERSTERS, K.; SWINGS, J.; VAUTERIN, L.; VAUTERIN, P.; BRUIJN, F. J. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, 2000, p. 665-677.

RYAN, R. P. et al. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiol Lett**. Vol. 278, 2008, p. 1-9.

SANTOS, S. et al. Siderophore Production by *Bacillus megaterium*: Effect of Growth Phase and Cultural Conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 1, 2014, p. 549-560. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s12010-013-0562-y>>.

SILVA, L. L. DA. Ferramentas moleculares para a caracterização de *Colletotrichum* spp. associados à antracnose da mandioca. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura). 2016, p. 1-94.

SOUZA, R. D.; MENDONÇA, E. A. F., SOARES, M. A.. Atividade antagônica a microrganismos patogênicos por bactérias endofíticas isoladas de *Echinodorus scaber* Rataj. **Summa Phytopathologica**. vol.41, n.3, 2015, p.229-232.

SOUZA, S. A. de. Diversidade de bactérias endofíticas em bananeira 'Prata-anã'. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, Universidade Estadual de Montes Claros). 2011, p. 1-116.

SUZUKI, T. et al. Genetic polymorphism and virulence of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duchesne). **Journal of General Plant Pathology**, v. 76, n. 4, p. 247-253, 2010.

STEFANI, F. O. P. et al. Culture-Dependent and -Independent Methods Capture Different Microbial Community Fractions in Hydrocarbon-Contaminated Soils. **PLoS One**. 2015, p. 1-16.

TADYCH, M., BERGEN, M. S., & WHITE, J. F. *Epichloë* spp. associated with grasses: new insights on life cycles, dissemination and evolution. *Mycologia*, 106(2), 2014, p.181-201. <https://doi.org/10.3852/106.2.181>

VAZ-MOREIRA, I. et al. Culture-dependent and culture-independent diversity surveys target different bacteria: a case study in a freshwater sample. **Antonie van Leeuwenhoek**, 2011, p. 245–257. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9583-0>.

VERSALOVIC, J., KOEUTH, T., & LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19(24), 1991, p.6823–6831. <https://doi.org/10.1093/nar/19.24.6823>

VERSALOVIC, J., SCHNEIDER, M., BRUIJN, F. J. DE, & LUPSKI, J. R. Genomic fingerprint of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*. 1994. <https://doi.org/n.a>.

WILSON, M. K. et al. Siderophores of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 348, n. 1, 2006, p. 320–325.

CAPÍTULO 3

Potencial biotecnológico da microbiota associada a *Ananas* spp. proveniente de ambiente natural e cultivado quanto à promoção do crescimento de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. 'BRS Imperial'

Potencial biotecnológico da microbiota associada a *Ananas* spp. proveniente de ambiente natural e cultivado quanto à promoção do crescimento de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. 'BRS Imperial'

Carlos Raimundo dos Santos Souza¹, Bruno Santos Louzado das Neves¹, Cintia Paula Feitosa Souza², Fernanda Vidigal Duarte Souza², Claudia Fortes Ferreira², Saulo Alves Santos de Oliveira²¹

RESUMO

O estudo de bactérias e fungos que compõem o microbioma rizosférico e endofítico do gênero *Ananas*, coletados em seu ambiente de ocorrência natural ou em ambiente de cultivo, apresentam um enorme potencial para a descoberta de ferramentas biotecnológicas de interesse agrícola, além da possibilidade de restabelecimento do equilíbrio dos agroecossistemas. Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo a análise da resposta de plantas micropropagadas da cultivar 'BRS Imperial' frente à inoculação de fungos e bactérias isolados de solo rizosférico e de tecidos de abacaxizeiros de ambiente natural e cultivado. Foram utilizados 25 tratamentos em delineamento inteiramente casualizado, dos quais sete receberam mix de bactérias de ambiente natural e sete de ambiente de cultivo, cinco tratamentos receberam mix de fungos de ambiente natural e cinco de ambiente de cultivo, além de plantas não inoculadas (controle). Os resultados revelaram a existência de bactérias e fungos com potencial de promoção de crescimento de plantas de abacaxi, principalmente aquelas provenientes de ambiente cultivado, uma vez que alguns tratamentos foram capazes de garantir uma alta taxa de sobrevivência das plantas (> 90%), e promover ganhos em diferentes parâmetros agrônomicos avaliados, como massa seca, massa fresca, tamanho das plantas, diâmetro da roseta e número de folhas.

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*. Microrganismos benéficos. Promoção de crescimento

¹Estudante, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Rua Rui Barbosa 710 44380-00, Cruz das Almas, Brasil. E-mail: carlos-raimundo@hotmail.com, brunoufrbneves@gmail.com, cintiapaula_2006@hotmail.com. ²Pesquisador A, Embrapa Mandioca e Fruticultura, Rua Embrapa s/n 44380-000, Cruz das Almas, Brasil. E-mail: fernanda.souza@embrapa.br, claudia.ferreira@embrapa.br, saulo.oliveira@embrapa.br.

ABSTRACT

The study of bacteria and fungi that compose the rhizospheric and endophytic microbiome of the genus *Ananas*, collected in their natural or cultivated environment, present an enormous potential for the discovery of biotechnological tools of agricultural interest, besides the possibility of restoration of the balance of agroecosystems. In this sense, the present study aimed to analyze the response of micropropagated plants of the BRS Imperial cultivar to the inoculation of fungi and bacteria isolated from rhizospheric soil and of natural and cultivated pineapple tissues. Twenty-five treatments were evaluated in a completely randomized design, being seven based on the mixture of bacteria from natural environment and seven from commercial fields, five treatments received mix of fungi from natural environment and five from commercial fields. The results showed that are fungi and bacteria with potential to promote growth in pineapples plants, especially those from commercial field environment, since that some treatments were able ensure high survive rates of the plants (> 90%) and promote gains on different agronomic traits such as dry and fresh matter, plant size, diameter of the rosette and number of leaves.

Keywords: In vitro culture. Beneficial microorganisms. Growth promotion

INTRODUÇÃO

O abacaxizeiro mantém diferentes relações com uma gama ampla de microrganismos, incluindo tanto os fitopatogênicos quanto aqueles que compõem o grupo de microrganismos benéficos, os quais podem estar no solo ou ocupando seus tecidos internos. Em plantas de abacaxizeiro, os benefícios das associações entre bactérias endofíticas e diazotróficas têm sido documentados, uma vez que estas provocam uma série de efeitos positivos sobre o vegetal, cujos principais são a promoção do crescimento da planta, e também podem acelerar o processo de germinação (WEBER et al, 2013). Além disso, auxiliam na solubilização de minerais, como fosfato e na produção de ácido indolacético e absorção destes pela planta, além de aumentos na disponibilização de nitrogênio (POLLI, 2012; RYAN et al., 2007).

Entretanto, tais efeitos podem não ser percebidos em plantas micropropagadas, nas quais bactérias e fungos benéficos habitantes do solo, epifíticos ou endofíticos, podem ser eliminados na fase de propagação *in vitro* (cultivo axênico), tornando as plantas mais sensíveis a estresses bióticos ou abióticos, ou com redução de vigor (POLLI, 2012). Com isso, o restabelecimento da microbiota de plantas ainda na fase de pré-aclimatização pode vir a ser uma estratégia para melhorar o desenvolvimento vegetal.

Diferentes trabalhos demonstraram que plantas inoculadas com bactérias como *Burkholderia* spp. e *Asaia bogorensis* apresentaram melhor desenvolvimento durante o período de aclimatização, acréscimos no rendimento do fruto, além de resultados satisfatórios no antagonismo ao *Fusarium* sp. (WEBER et al., 2013).

A ação de fungos com as mesmas funções das bactérias promotoras de crescimento vegetal também têm sido relatada. A colonização das raízes por fungos promotores de crescimento de plantas pode levar a resistência sistêmica e incrementos no desenvolvimento do vegetal (PIETERSE et al., 2014; MURALI et al., 2012). Indução de resistência sistêmica em plantas foi percebida após o uso de isolados de *Penicillium simplicissimum* GP17-2, que foi capaz de despertar

mecanismos de defesas múltiplas em *Arabidopsis thaliana* (HOSSAIN et al., 2007).

Tanto bactérias quanto fungos, benéficos ou não, podem ser encontrados em diversos ambientes, nesse sentido acredita-se que o ambiente natural seja um celeiro de microrganismos, fungos e bactérias, com atuação benéfica para o vegetal, pois neste ambiente os processos de co-evolução seriam bem melhor estabelecidos por haver menor influência das ações humanas sobre as relações planta-microrganismos (PHILIPPOT et al., 2012).

Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial biotecnológico de isolados bacterianos e fúngicos associados a *Ananas* spp., provenientes de ambiente de ocorrência natural e de cultivo comercial, na promoção do crescimento de mudas micropropagadas de abacaxi (cv. 'BRS Imperial').

MATERIAL E MÉTODOS

Foram adotados 25 tratamentos para avaliação das variáveis altura da planta, diâmetro do caule e da roseta, número de folhas, massa fresca e seca. Plantas sem inoculação constituíram o controle (Tabela 1).

Os isolados de bactérias foram reativados a partir do método em água destilada esterilizada, retirando-se 50 µL de água de cada isolado, os quais foram repicados em placas contendo meio Ágar Nutriente e incubados em BOD a 25 °C, por 24 h. Foram reativados 157 isolados, os quais foram subdivididos em quatorze grupos pela origem e amostra, sendo 11 isolados para cada subgrupo: Bactérias totais de solo de ambiente natural/cultivado, BPSs de solo de ambiente natural/cultivado, Actinobactérias de solo de ambiente natural/cultivado, BPEs de solo de ambiente natural/cultivado, Bactérias endofíticas de raiz de ambiente natural/cultivado, Bactérias endofíticas de caule de ambiente natural/cultivado e Bactérias endofíticas de folha de ambiente natural/cultivado (tabela 1).

Tabela 1 – Tratamentos para avaliação de parâmetros biométricos.

Tratamentos	
1. SE + BPS de solo de ambiente natural	14. SE + Actinobactérias de solo de ambiente de cultivo
2. SE + Actinobactérias de solo de ambiente natural	15. SE + BPE de solo de ambiente de cultivo
3. SE + BPE de solo de ambiente natural	16. SE + B.T de solo de ambiente de cultivo
4. SE + B.T de solo de ambiente natural	17. SE + Trichoderma de solo de ambiente de cultivo
5. SE + Trichoderma de solo de ambiente natural	18. SE + F.T de solo de ambiente de cultivo
6. SE + F.T de solo de ambiente natural	19. SE + B.R de ambiente de cultivo
7. SE + B.R de ambiente natural	20. SE + B.C de ambiente de cultivo
8. SE + B.C de ambiente natural	21. SE + B.F de ambiente de cultivo
9. SE + B.F de ambiente natural	22. SE + F.R de ambiente de cultivo
10. SE + F.R de ambiente natural	23. SE + F.C de ambiente de cultivo
11. SE + F.C de ambiente natural	24. SE + F.F de ambiente de cultivo
12. SE + F.F de ambiente natural	25. SE sem microrganismos + plantas (controle).
13. SE + BPS de solo de ambiente de cultivo	

SE (Substrato esterilizado); **BPS** (Bactérias produtoras de sideróforos); **BPE** (Bactérias produtoras de endósporos); **BT** (Bactérias totais); **FT** (Fungos totais); **BR** (Bactérias endofíticas de Raiz); **BC** (Bactérias endofíticas de caule); **BF** (Bactérias endofíticas de folha); **FR** (Fungos endofíticos de Raiz); **FC** (Fungos endofíticos de caule); **FF** (Fungos endofíticos de folha).

Com isso, foram produzidas suspensões bacterianas (mix de microrganismos), uma para cada subgrupo descrito acima. Após o período de incubação, 5 ml de solução salina ($MgCl_2$ a 10 mM) foram acrescentados em cada placa e as colônias raspadas com uso da alça de Drigalsky. Os líquidos obtidos de cada placa com diferentes isolados para os subgrupos constituíram os mix e foram reunidos em diferentes béqueres, para cada uma das quatorze suspensões, as quais tiveram as absorvâncias definidas e ajustadas para 0,1 ($\lambda = 550$ nm) que corresponde a 10^8 ufc/mL (SOUZA, 2011; CUNHA et al., 2006).

Para cada um dos dez tratamentos com fungos foram feitas suspensões de esporos com mix de isolados de ambiente natural e cultivado: *Trichoderma* spp. de ambiente natural/cultivado, fungos totais de ambiente natural/cultivado, fungos endofíticos de raiz de ambiente natural/cultivado, fungos endofíticos de caule de ambiente natural/cultivado e fungos endofíticos de folha de ambiente natural/cultivado (tabela 1). Para isso, selecionou-se um total de 124 isolados dos dois ambientes, sendo 12 fungos para cada um dos dez mix produzidos. Os fungos cresceram em placas de Petri contendo BDA incubados em BOD a 25 °C

durante 10 dias. Após este período adicionaram-se 10 mL de água destilada esterilizada à cada placa e o micélio raspado com uso de pincéis previamente desinfestados em hipoclorito a 1 %. Em seguida, as suspensões foram filtradas em camada dupla de gaze a fim de remover partes de micélio e/ou meio de cultura e reunidas em béqueres distintos para cada um dos tratamentos. Posteriormente, todas as suspensões foram ajustadas para concentração de 10^7 esporos.mL⁻¹ pela contagem de esporos em hemacitômetro do tipo Neubauer.

As suspensões com bactérias foram semeadas nos substratos esterilizados e as plantas foram inseridas três dias após a semeadura. Já para os tratamentos com fungos, as plantas foram inseridas no substrato dez dias após a semeadura. Feito isso, os tratamentos foram mantidos em pré-aclimatização a 22 °C e 12 horas de fotoperíodo, por 42 dias.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com 25 tratamentos e 24 repetições cada. Os dados obtidos foram comparados por meio da ANOVA, pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade, usando o *software* SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2008).

As plantas foram avaliadas a cada sete dias após a inoculação em um período de 42 dias, adotando-se as seguintes variáveis: (i) altura da planta: dada como a distância entre a inserção da planta no substrato e a folha recém-lançada da parte aérea; (ii) diâmetro da roseta em mm (DR); (iii) diâmetro do caule em mm; (iv) número de folhas; (v) massa fresca e seca em mg.

O diâmetro da roseta foi estabelecido como a distância entre folhas opostas com uso de um paquímetro. O diâmetro do caule (DC) de 1/3 das plantas foi obtido no final do experimento com uso de um paquímetro; o número de folhas (NF) foi determinado pela contagem desses órgãos.

A massa fresca e seca foi obtida após a fragmentação das plantas em sistema radicular e parte aérea, as quais foram primeiramente pesadas para determinar a massa fresca e posteriormente armazenadas em sacos de papel Kraft (DÔRES, 2007) em estufa a 80 °C por 48h (ATHAYDE, 2012) e novamente pesadas para obtenção dos valores de massa seca; (vi) percentuais de sobrevivência: o percentual de sobrevivência (S) foi definida como $S = \frac{M}{N} \cdot 100$, onde M = número de plantas vivas e N = número total de indivíduos dentro dos tratamentos.

RESULTADOS

Dentre os tratamentos descritos (Tabela 1), as Bactérias Endofíticas de Raiz de Ambiente de Cultivo (BERAC) e as Bactérias Endofíticas de Raiz de Ambiente Natural (BERAN), foram os que apresentaram os melhores resultados para médias das taxas de crescimento, alcançando médias de $0,028 \text{ mm.dia}^{-1}$ e $0,018 \text{ mm.dia}^{-1}$ respectivamente (Figura 1A).

Já entre os tratamentos que receberam mix de fungos tanto de ambiente de cultivo quanto de ocorrência natural, o de *Trichodermas* spp. de Solo de Ambiente de Cultivo (TSAC) foi agrupado exclusivamente com a maior taxa de crescimento $0,009 \text{ mm.dia}^{-1}$ (Figura 1B). Os demais tratamentos apresentaram crescimento negativo, caracterizado por definhamento das plantas. Destacando-se os de Fungos Endofíticos de Caule de Ambiente de Cultivo (FECAC) e Fungos Endofíticos de Caule de Ambiente Natural (FECAN) com as piores taxas médias de crescimento negativo, $-0,062 \text{ mm.dia}^{-1}$ e $-0,055 \text{ mm.dia}^{-1}$ respectivamente.

Além da promoção de crescimento, avaliou-se também os percentuais de sobrevivência das plantas em cada tratamento.

Sendo assim, os tratamentos com mix de bactérias provenientes tanto do ambiente natural quanto de cultivo alcançaram os maiores percentuais de sobrevivência quando comparados aos alcançados pelos tratamentos com fungos. Entretanto, o menor percentual de sobrevivência foi percebido no tratamento com as Bactérias Produtoras de Endósporos de Solo de Ambiente Natural (BPESAN), atingindo 78,26% (Figura 1C).

Em relação aos tratamentos com mix de fungos oriundos dos dois ambientes, aqueles em que foram empregados fungos de ambiente de cultivo apresentaram os maiores percentuais de sobrevivência. O tratamento com o menor percentual de sobrevivência foi o de *Trichoderma* de solo de ambiente natural (TSAN), com percentual de 13,04% (Figura 1D).

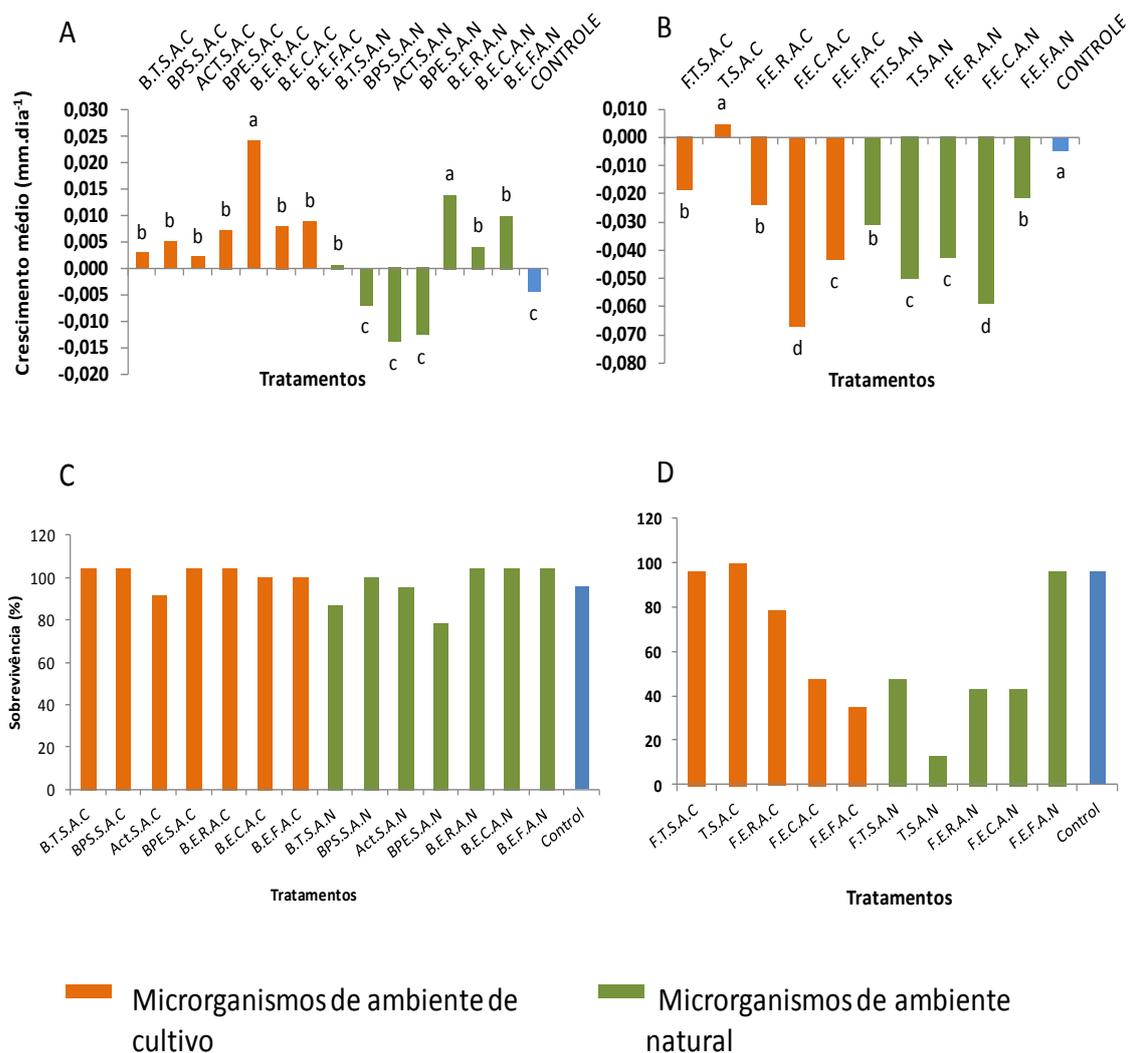


Figura 1 – Taxa média de crescimento (mm.dia⁻¹) e percentuais de sobrevivência para os tratamentos com bactérias e fungos dos ambientes natural e de cultivo. A - Taxa média de crescimento para os tratamentos com bactérias; B - Taxa média de crescimento para os tratamentos com fungos; C – Percentuais de sobrevivência para os tratamentos com bactérias; D - Percentuais de sobrevivência para os tratamentos com fungos. Médias seguidas por mesma letra pertencem ao mesmo grupo pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. B.T.S.A.C/N = Bactérias totais de solo de ambiente de cultivo/natural; B.P.S.S.A.C/N = Bactérias produtoras de sideróforos de solo de ambiente de cultivo/natural; A.C.T.S.A.C/N = Actinobactérias de solo de ambiente de cultivo/natural; B.P.E.S.A.C/N = Bactérias produtoras de endósporos de solo de ambiente de cultivo/natural; B.E.R.A.C/N = Bactérias endofíticas de raiz ambiente de cultivo/natural; B.E.C.A.C/N = Bactérias endofíticas de caule de Ambiente de cultivo/natural; B.E.F.A.C/N = Bactérias endofíticas de folha de ambiente de cultivo/natural, F.T.S.A.C/N = Fungos totais de solo de ambiente de cultivo/natural; T.S.A.C/N = Trichoderma de solo de ambiente de cultivo/natural; F.E.R.A.C/N = Fungos endofíticos de raiz de ambiente de cultivo/natural; F.E.C.A.C/N = Fungos endofíticos de caule de ambiente de cultivo/natural; F.E.F.A.C/N = Fungos endofíticos de folha de ambiente de cultivo/natural.

A análise da massa fresca da parte aérea das plantas indicou que as maiores médias foram observadas nos grupos de Bactérias Totais de Solo de Ambiente de Cultivo (BTSAC) e BPSSAC, com 0,65 mg e 0,68 mg respectivamente (Figura 2A). A tendência de maior média das plantas do tratamento com BPSSAC se manteve na análise da matéria seca (Figura 2B).

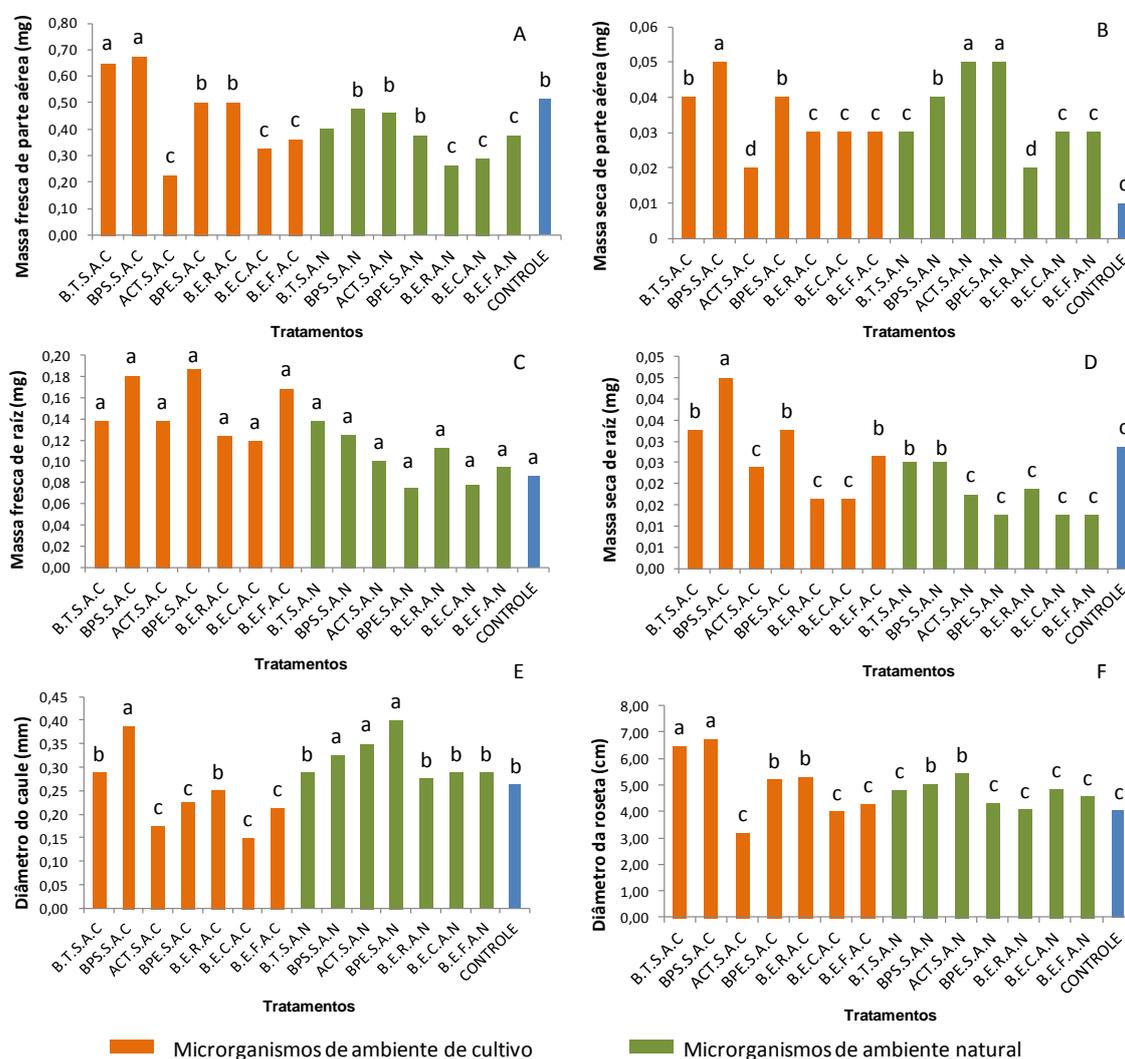


Figura 2 – Massa fresca e seca das plantas dos tratamentos com mix de bactérias. **A** – Massa fresca de parte aérea; **B** - Massa seca de parte aérea; **C** - Massa fresca de raiz; **D** - Massa seca de raiz; **E** – Diâmetro do caule; **F** - Diâmetro da roseta. Médias seguidas por mesma letra pertencem ao mesmo grupo pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. **BTSAC/N** = Bactérias totais de solo de ambiente de cultivo/natural; **BPSSAC/N** = Bactérias produtoras de sideróforos de solo de ambiente de cultivo/natural; **ACTSAC/N** = Actinobactérias de solo de ambiente de cultivo/natural; **BPESAC/N** = Bactérias produtoras de endósporos de solo de ambiente de cultivo/natural; **BERAC/N** = Bactérias endofíticas de raiz ambiente de cultivo/natural; **BECAC/N** = Bactérias endofíticas de caule de Ambiente de cultivo/natural; **BEFAC/N** = Bactérias endofíticas de folha de ambiente de cultivo/natural.

Quanto à matéria fresca do sistema radicular, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos (Figura 2C). Por outro lado, as plantas submetidas ao tratamento com Bactérias Produtoras de Sideróforos de Solo de Ambiente de Cultivo (BPSSAC) apresentaram a maior média de matéria seca de raiz, com 0,05 mg (Figura 2D).

A análise ampla dos dados, correlacionando-se todas as variáveis e os tratamentos adotados, evidencia o grupo 1, composto pelos tratamentos BPSSAC e BTSAC (Figura 3), como aquele com os melhores resultados para todas as variáveis analisadas. Seguido pelo grupo 2 (BPSSAN, ACTSAN, BPESAN), que mostrou as maiores diferenças estatísticas em relação ao grupo 1 principalmente nas variáveis sobrevivência, taxa de crescimento e matérias seca de raiz.

O grupo 3 apresentou os melhores resultados quanto à sobrevivência e crescimento, o que confirma a melhor taxa de crescimento para os tratamentos BERAC e BERAN na figura 1A. Entretanto, quanto às outras variáveis, os demais tratamentos não apresentaram diferenças estatísticas significativas em relação ao controle.

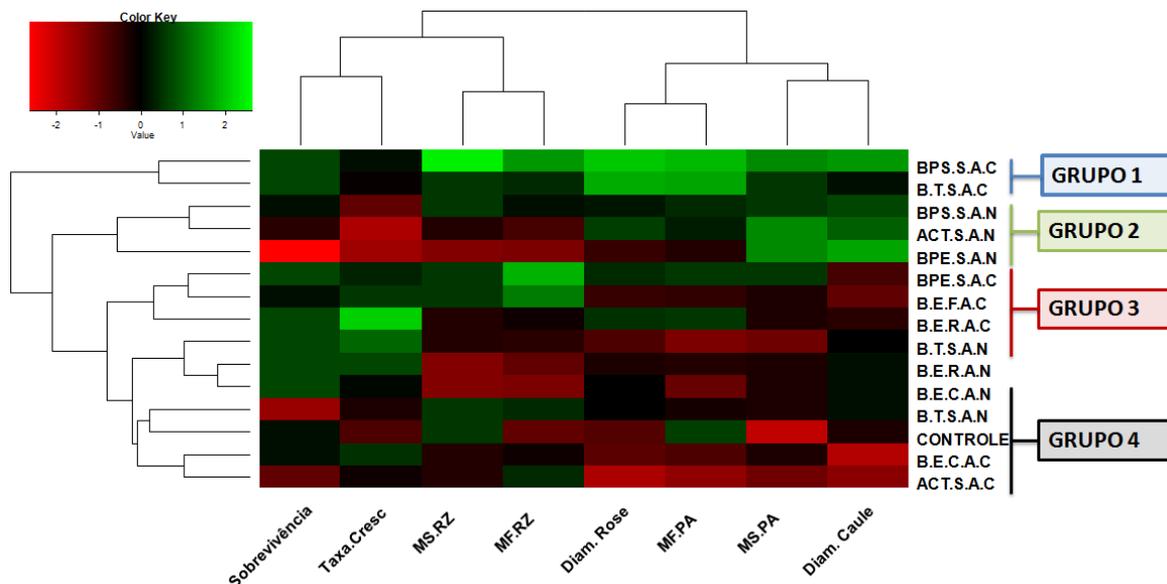


Figura 3: Representação gráfica (*heatmap*) das correlações entre todas as variáveis e os tratamentos com bactérias utilizados neste estudo. **Taxa.cresc** = taxas de crescimento; **MS.RZ** = Massa seca de raiz; **MF.RZ** = Massa fresca de raiz; **Diam. Rose** = Diâmetro da roseta; **MF.PA** = Massa fresca da parte aérea; **MS.PA** = Massa seca da parte aérea; **Diam.caule** = Diâmetro do caule. **BTSAC/N** = Bactérias totais de solo de ambiente de cultivo/natural; **BPSSAC/N** = Bactérias produtoras de sideróforos de solo de ambiente de cultivo/natural; **ACTSAC/N** = Actinobactérias de solo de ambiente de cultivo/natural; **BPESAC/N** = Bactérias produtoras de endósporos de solo de ambiente de cultivo/natural; **BERAC/N** = Bactérias endofíticas de raiz ambiente de cultivo/natural; **BECAC/N** = Bactérias endofíticas de caule de Ambiente de cultivo/natural; **BEFAC/N** = Bactérias endofíticas de folha de ambiente de cultivo/natural.

As mesmas variáveis também foram adotadas para os tratamentos com os fungos oriundos dos ambientes de cultivo e natural.

Os Fungos Totais de Solo de Ambiente de Cultivo (FTSAC), Trichoderma de Solo de Ambiente de Cultivo (TSAC), Fungos Endofíticos de Raiz de Ambiente de Cultivo (FERAC), sendo maioria, e Fungos Endofíticos de Folha de Ambiente Natural (FEFAN) compuseram o grupo com maiores médias para massa fresca da parte aérea, apresentando 0,23 mg, 0,23 mg, 0,20 mg e 0,33 mg respectivamente (Figura 4A), entretanto estes tratamentos não diferiram estatisticamente do controle.

A maior média para matéria seca foi exclusiva para o tratamento com FEFAN, com valor igual a 0,07 mg (Figura 4B).

Análise da massa fresca de raízes permitiu reunir os tratamentos com FTSAC e TSAC no mesmo grupo com as maiores massas, a saber 0,20 mg e 0,23 mg respectivamente (Figura 4C). TSAC apresentou a maior média quando se analisou a massa seca das raízes (Figura 4D).

A análise conjunta dos dados para os tratamentos com os fungos demonstrou que as variáveis mais significativas foram as taxas de crescimento e os percentuais de sobrevivência (Figura 5). O grupo que se destacou para ambas variáveis foi o grupo 1, composto pelos tratamentos FTSAC e TSAC, com os maiores percentuais de sobrevivência, associados também a altas taxas de crescimento, confirmando o que foi mostrado na figura 1D. Este grupo não se distanciou dos valores obtidos para o controle quanto à estas variáveis. No entanto, o tratamento TSAC obteve os melhores resultados para massa fresca e seca de raiz (Figura 5).

O grupo 3, composto apenas por Fungos endofíticos de Folha de Ambiente Natural (FEFAN), apresentou os melhores resultados para diâmetro da roseta e massa seca da parte aérea, além de resultados satisfatórios para taxa de crescimento, sobrevivência e massa fresca de parte aérea

Os grupos 4 e 5 apresentaram os piores resultados para todas as variáveis, com diferenças muito significativas em relação ao controle. Apenas o tratamento com FECAN, no grupo cinco, apresentou resultados satisfatórios para massa fresca da parte aérea.

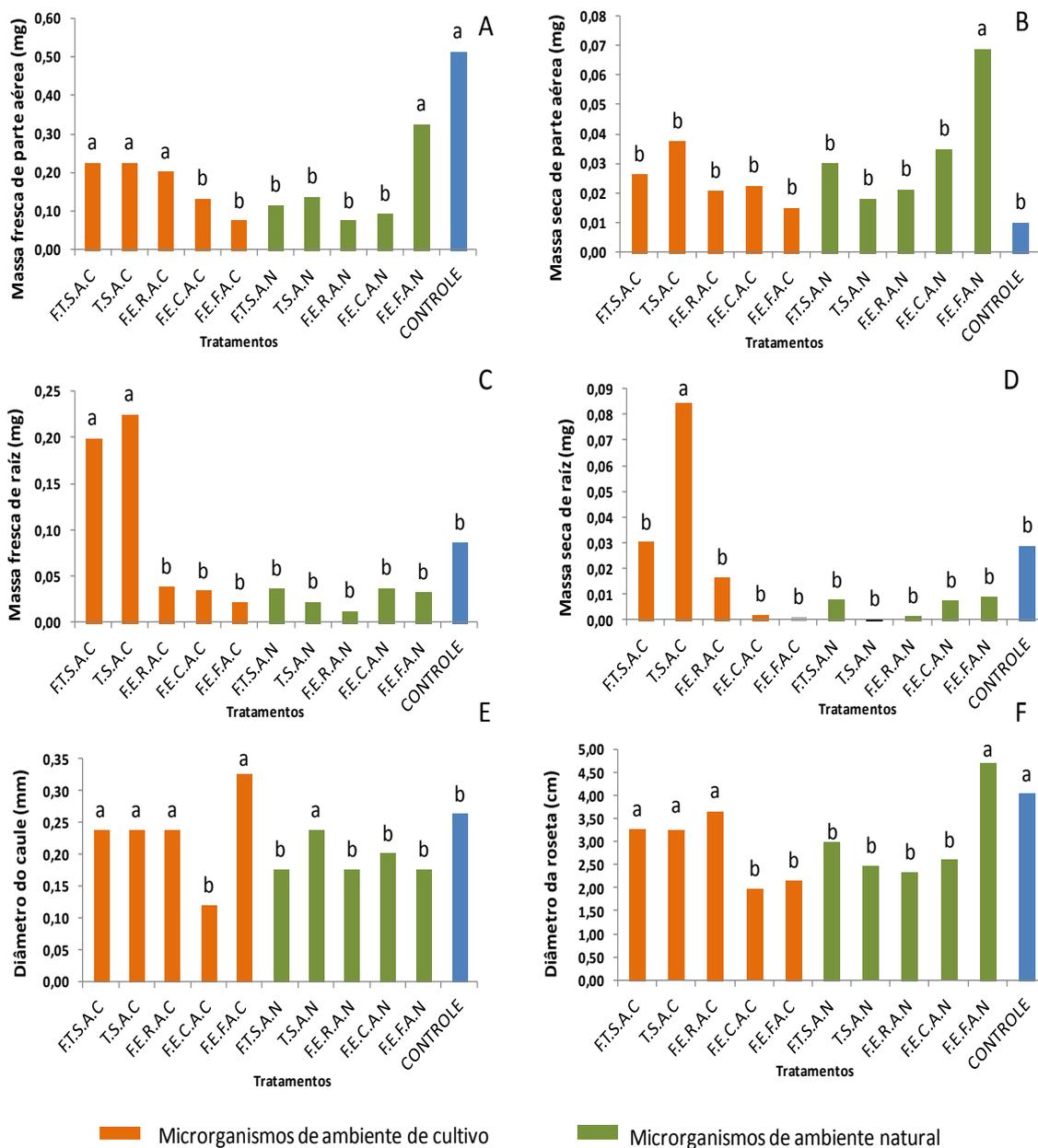


Figura 4 – Massa fresca e seca das plantas dos tratamentos com mix de fungos. **A** – Massa fresca de parte aérea; **B** - Massa seca de parte aérea; **C** - Massa fresca de raiz; **D** - Massa seca de raiz; **E** – Diâmetro do caule; **F** - Diâmetro da roseta. Médias seguidas por mesma letra pertencem ao mesmo grupo pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. **FTS.A.C/N** = Fungos totais de solo de ambiente de cultivo/natural; **TS.A.C/N** = *Trichoderma* de solo de ambiente de cultivo/natural; **FE.R.A.C/N** = Fungos endófitos de raiz de ambiente de cultivo/natural; **FE.C.A.C/N** = Fungos endófitos de caule de ambiente de cultivo/natural; **FE.F.A.C/N** = Fungos endófitos de folha de ambiente de cultivo/natural.

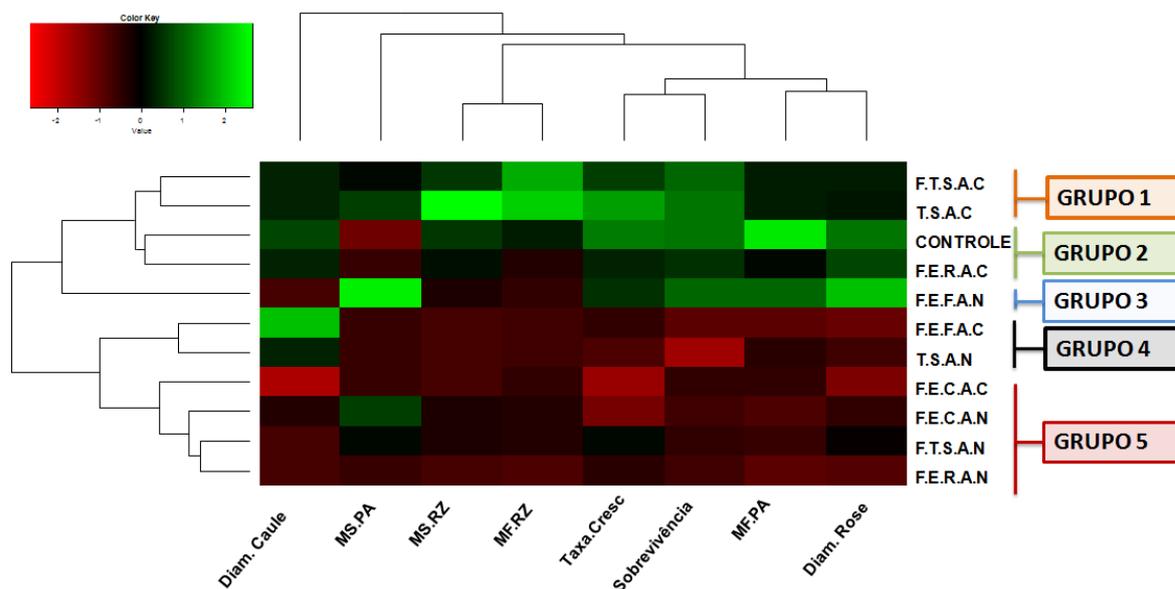


Figura 5: Representação gráfica (*heatmap*) das correlações entre todas as variáveis e os tratamentos com fungos utilizados neste estudo. **Diam.caule** = Diâmetro do caule; **MS.PA** = Massa seca da parte aérea; **MS.RZ** = Massa seca de raiz; **MF.RZ** = Massa fresca de raiz; **Taxa.cresc** = taxas de crescimento; **MF.PA** = Massa fresca da parte aérea; **Diam. Rose** = Diâmetro da roseta. **FTSAC/N** = Fungos totais de solo de ambiente de cultivo/natural; **TSAC/N** = Trichoderma de solo de ambiente de cultivo/natural; **FERAC/N** = Fungos endófitos de raiz de ambiente de cultivo/natural; **FECAC/N** = Fungos endófitos de caule de ambiente de cultivo/natural; **FEFAC/N** = Fungos endófitos de folha de ambiente de cultivo/natural.

DISCUSSÃO

Em relação à promoção de crescimento, foi observado que os melhores resultados foram obtidos pelos tratamentos onde se empregaram as bactérias provenientes do ambiente de cultivo. É sabido (PHILIPPOT et al., 2013) que há diferenças na estruturação das comunidades microbianas da rizosfera nos ambientes natural e de cultivo. A forma como os microrganismos interagem entre si e com as plantas nesses dois ambientes é diferente.

No ambiente natural, as interações benéficas levam mais tempo para serem estabelecidas, resultando em um processo de co-evolução mais demorado (PHILIPPOT et al., 2013), pois as plantas estão em seu habitat nativo.

A diversidade de plantas nos ecossistemas naturais é muito maior, o que dificulta o estabelecimento de relações benéficas duradouras entre as plantas e as comunidades microbianas, uma vez que em um momento pode-se ter um grupo de microrganismos interagindo com uma espécie vegetal e em outro instante, o mesmo grupo pode interagir com uma espécie vegetal completamente diferente da anterior, caracterizando um processo de inespecificidade destas relações.

O contrário é percebido nos agroecossistemas, onde a diversidade vegetal é menor, pois geralmente predomina-se o monocultivo, conseqüentemente a diversificação nas interações bióticas é menor. Atrelado A isso, tem-se a adequação de um tipo de solo, tornando este apropriado para o plantio de uma cultura especificamente, o que pode reduzir a diversidade microbiana neste solo.

Segundo Philippot et al. (2013), a microbiota rizosférica tem menos importância nos agroecossistemas que nos ecossistemas naturais, pelo emprego de fertilizantes e pesticidas. Sendo assim, as plantas dos ambientes de cultivo tendem a não requerer com intensidade a ajuda dos microrganismos a elas associados, pois isso demanda alto gasto de energia por elas.

Mas diferentemente das idéias dos autores citados, a microbiota associada às plantas no ambiente de cultivo tem sua importância quando se considera a seleção direcional daqueles benéficos, de forma não intencional, pois as práticas agrícolas, atrelado ao menor número de relações bióticas no ambiente de cultivo, contribuem para a seleção de microrganismos benéficos que já possuem interações bem estabelecidas com a cultura, permitindo que eles se sobressaiam em relação a outros.

No ambiente de cultivo, os microrganismos tendem a responder melhor às sinalizações das plantas, aos rizodepósitos e darão o *feedback* que o vegetal necessitar, como por exemplo quando os fitopatógenos quebrarem a resistência das plantas e à conferida pelos pesticidas. Além disso, muitos grupos microbianos que vivem em interação benéfica com as plantas são também capazes de promover seu crescimento. Todos esses benefícios compensam os gastos energéticos da planta para manter este tipo de interação.

O crescimento negativo verificado em alguns tratamentos foi caracterizado pelo definhamento das plantas, o que possivelmente está atrelado a certa patogenicidade de alguns isolados ou por reações das plantas à fatores abióticos,

uma vez que o experimento ocorreu *in vitro*, durante o período de pré-aclimatização. tais plantas não foram submetidas a qualquer prática que pudesse influenciar no principal objetivo do trabalho, testar capacidade de promoção de crescimento e inocuidade.

As BPSSAC, juntamente com ACTSAN e BPESAN, proporcionaram os melhores resultados quanto à massa seca da parte aérea, o que pode estar relacionado ao fato desses grupos serem representados por espécies que atuam em incrementos do desenvolvimento dos vegetais, como aumento da matéria seca e diâmetro do caule das plantas (ASHRAF et al., 2011; GIONGO et al., 2010). Entretanto os isolados que integraram estes grupos não promoveram o crescimento, como percebido no tratamento com BERAC, o que indica que este grupo possui algum(s) microrganismo(s) que atuam especificamente no aumento do crescimento das plantas.

O fato de os tratamentos com fungos relacionados ao solo (FTSAC, TSAC, FERAC) e FEFAN terem sido os que apresentaram as maiores médias para massa fresca de folhas e TSAC para massa fresca e seca de raízes, é um indicador de que estes fungos estiveram o mais próximo das raízes e possivelmente colonizando-as e aumentando seu rendimento. *Trichoderma* spp. e fungos endofíticos são comumente relatados na literatura como solubilizadores de importantes nutrientes para as plantas, o que reflete no desempenho das mesmas (CRIPPS-GUAZZONE et al., 2016; ROMÃO-DUMARESQ et al., 2016)

Os baixos percentuais de sobrevivência observados em alguns tratamentos, sobretudo aqueles de fungos do grupo 4 e 5 (Figura 5 – *heatmap*), está atrelado ao fato de que não se excluiu a possibilidade de durante os isolamentos ter ocorrido a seleção de alguns fitopatógenos. Os isolamentos ocorreram nos meios seletivos para os grupos de interesse, entretanto é sabido que o nicho de microrganismos benéficos é idêntico aos dos fitopatogênicos (LOPES, 2015; RYAN, 2008), ou seja, ambos compartilham os mesmos recursos e estão submetidos às mesmas condições ambientais.

Algumas espécies de *Trichoderma* são capazes de causar doenças em plantas (NICOSIA et al., 2015; SAMUELS et al., 2002), isso pode justificar o fato de os isolados de *Trichoderma* de Solo de Ambiente Natural (TSAN), pertencente ao grupo 4 (Figura 5) ter provocado a morte de plantas já que este grupo foi composto por fungos isolados do ambiente natural, o que permite inferir que estes

isolados nunca mantiveram associação com a cultivar utilizada no bioensaio, conseqüentemente podem ter causado reação de hipersensibilidade das plantas.

A análise dos dados evidenciou que microrganismos benéficos presentes em amostras de solo e raízes do ambiente de cultivo apresentaram os melhores resultados para todas as variáveis analisadas, indicando que essas amostras podem ser foco para a busca de populações microbianas benéficas em trabalhos futuros, com emprego em melhoramento vegetal, refletindo assim no agroecossistema.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, pelo PPGMA, à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, principalmente ao Centro Nacional de Pesquisa Mandioca e Fruticultura por prover meios para realização do projeto e ao Centro de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudo.

REFERÊNCIAS

- ASHRAF, M. A., RASOOL, M., & MIRZA, M. S. Nitrogen Fixation and Indole Acetic Acid Production Potential of Bacteria Isolated from Rhizosphere of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Advances in Biological Research**, 5(6), 2011, p. 348–355.
- ATHAYDE, M. O. Indução do enraizamento *ex vitro* em plantas de abacaxizeiro cv. vitória (*Ananas comosus* L. Merrill): processo fotossintético e medidas biométricas. Tese (Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. 2012, pg. 1-118.
- BARKA, E. A. et al. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 1, 2016, p. 1–43.
- CRIPPS-GUAZZONE, N. et al. Rhizosphere and endophytic colonisation of ryegrass and sweet corn roots by the isolate *Trichoderma atroviride* LU132 at different soil pHs. **New Zealand Plant Protection**, 69, 2016, p.78–85.
- CUNHA, J. de F. et al. Efeito “in vitro” de antibióticos e rizobactérias no controle de bactérias fitopatogênicas ao *Eucalyptus* spp. R. *Árvore*, Viçosa-MG, v.30, n.6, 2006, p.871-876.
- DÔRES, R. G. R. das. Análise morfológica e fitoquímica da Fava D’anta (*Dimorphandra mollis* Benth.). Tese (Pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa), Minas Gerais, 2007, pg. 1-396.
- FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras. vol. 6, 2008, p. 36-41.
- GIONGO, A. et al. Isolation and characterization of two plant growth-promoting bacteria from the rhizoplane of a legume (*Lupinus albescens*) in sandy soil. *Revista Brasileira de Ciência Do Solo*, 34(2), 2010, p. 361–369. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832010000200009>.
- HOSSAIN, M. M.; et al. The plant growth-promoting fungus *Penicillium simplicissimum* GP17-2 induces resistance in *Arabidopsis thaliana* by activation of multiple defense signals. **Plant and Cell Physiology**, v. 48, n. 12, 2007, p. 1724–1736.
- ISLAM, S.; AKANDA, A. M.; PROVA, A.; ISLAM, M. T.; HOSSAIN, M. M. Isolation and Identification of Plant Growth Promoting Rhizobacteria from Cucumber Rhizosphere and Their Effect on Plant Growth Promotion and Disease Suppression. **Frontiers in microbiology**, v. 6, n. February, 2015, p. 1360. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4735380&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

LOPES, R. Montagem e análise do genoma parcial de bacillus thuringiensis bac3151 endofítico das folhas do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris*). Dissertação (Mestrado em Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa - Mg), (2015).

MACHADO, D. F. M. et al. Trichoderma no brasil: o fungo e o bioagente. *Revista de Ciências Agrárias – Vol. 35, 2012, p.274-288.*

MURALI, M.; et al. Screening for plant growth promoting fungi and their ability for growth promotion and induction of resistance in pearl millet against downy mildew disease. **Journal of phytology**, v. 4, n. 5, 2012, p. 30–36.

NICOSIA, M. G. LI D., MOSCA, S., MERCURIO, R., & SCHENA, L. Dieback of *Pinus nigra* Seedlings Caused by a Strain of *Trichoderma viride*. **Plant Disease**, 99(1), 2015, p.44–49. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-14-0433-RE>

PHILIPPOT, L. et al. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature reviews**. vol. 11, 2013, pg. 789-799.

POLLI, A. et al. Aspectos da interação dos microrganismos endofíticos com plantas hospedeiras e sua aplicação no controle biológico de pragas na agricultura. *SaBios: Rev. Saúde e Biol.*, v.7, n.2, 2012, p.82-89.

ROMÃO-DUMARESQ, A. S. et al. Diversity of cultivated fungi associated with conventional and transgenic sugarcane and the interaction between endophytic trichoderma virens and the host plant. **PLoS ONE**, 11(7), 2016, p.1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158974>.

RYAN, R. P. et al. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiol Lett**. Vol. 278, 2008, p. 1–9.

SAMUELS, G. J. et al. Trichoderma species associated with the green mold epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. **Mycologia**, 94(1), 2002, p.146–70. <https://doi.org/10.2307/3761854>.

SOUZA, S. A. de. Diversidade de bactérias endofíticas em bananeira ‘Prata-anã’. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal no Semiárido, Universidade Estadual de Montes Claros). 2011, pg. 1-116.

WEBER, O. B.; VIDEIRA, S. S.; ARAÚJO, J. L. S. de. Identification of culturable endophytes in ‘Champaka’ pineapple grown in an organic system. **African Journal of Agricultural Research**. Vol. 8(26), 2013, p. 3422-3430. DOI: 10.5897/AJAR2012.2308.

ZHANG, S.; GAN, Y.; XU, B. Application of Plant-Growth-Promoting Fungi *Trichoderma longibrachiatum* T6 Enhances Tolerance of Wheat to Salt Stress through Improvement of Antioxidative Defense System and Gene Expression. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016, p. 1–11. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2016.01405/abstract>>.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As comparações entre os ambientes quanto a grupos específicos foi estabelecida e a densidade das populações microbianas nos ambientes estimada com a utilização de métodos dependentes de cultivo.

A maior densidade microbiana foi percebida no limite entre solo rizosférico e raízes, o que permite afirmar que esta zona é obviamente a que está sobre os efeitos dos exsudatos liberados pelas plantas as quais têm respostas diferentes a depender das condições edáficas, que por sua vez influenciam a composição das comunidades microbianas. Além disso, os dados indicaram que microrganismos do solo e de amostras de raízes promoveram o melhores resultados quanto a melhorias no desenvolvimento vegetal, sendo propensos para utilização futura.

As técnicas BOX-pcr e ERIC-pcr permitiram o agrupamento entre isolados oriundos de diferentes ambientes e amostras, indicando que apesar de estarem em ambientes dessemelhantes, os grupos estudados apresentam proximidade genética independente a qual ambiente pertença.

Por apresentarem peculiaridades que incrementam o desenvolvimento vegetal, torna-se viável a inoculação de microrganismos benéficos em plantas ainda na fase de produção *in vitro*, pois isso restabelece a microbiota benéfica associada ao vegetal, a qual muitas vezes é perdida durante a produção axênica de mudas. Isso refletirá em melhorias na qualidade das plantas e produção.

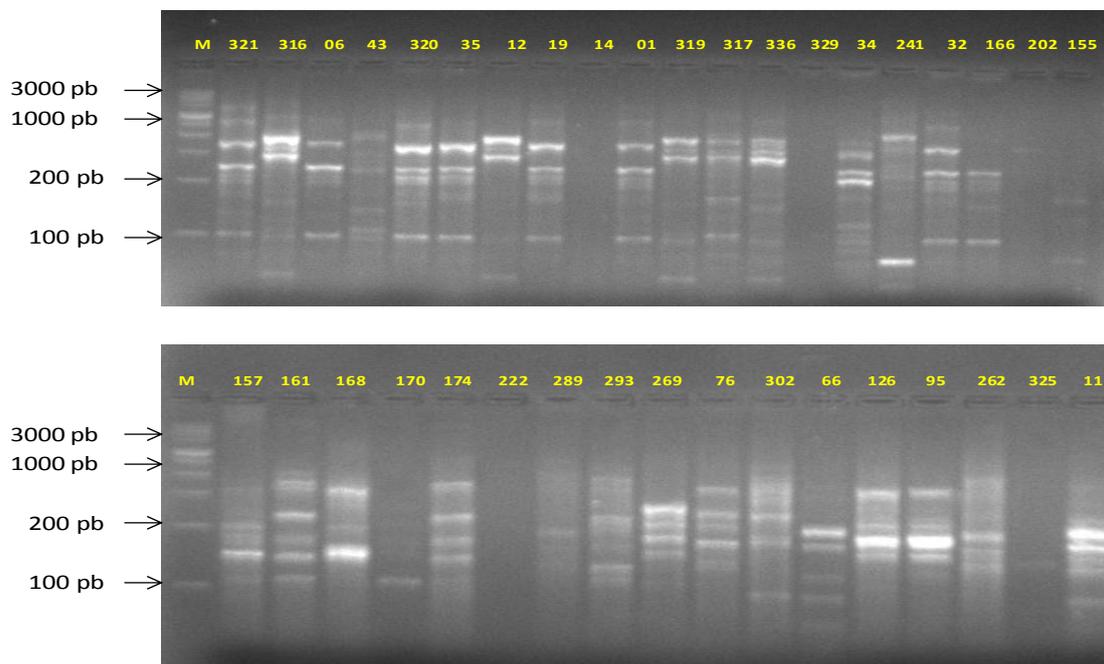
APÊNDICE A - Resultados Analíticos quanto a Macronutrientes.

Plantas	pH		P	K	Ca	Mg	Ca+Mg	Al	Na	H+Al	SB	CTC	V	M_O
	em água	em CaCl ₂												
BGA 839	5,1	--	6	0,3	0,96	0,51	1,47	0,50	0,06	7,15	1,83	8,98	20	39,00
BGA 840	5,0	--	4	0,3	0,99	0,72	1,71	0,60	0,04	6,60	2,01	8,61	23	34,00
BGA 842	4,9	--	2	0,1	0,24	0,10	0,34	0,90	0,01	6,38	0,40	6,78	6	17,00
BGA 843	4,7	--	3	0,1	0,26	0,13	0,39	1,00	0,01	9,57	0,51	10,1	5	55,00
BGA 844	4,7	--	1	0	0,33	0,08	0,41	1,00	0,01	5,50	0,44	5,94	7	38,00
BGA 855	4,8	--	11	0,5	2,90	0,27	3,17	0,80	0,02	14,5	3,64	18,2	20	92,00
BGA 858	5,3	--	3	0,3	2,16	0,68	2,84	0,20	0,13	7,04	3,25	10,3	32	52,00
PR1	4,6	--	24	0,2	1,81	0,25	2,06	0,20	0,10	2,09	2,40	4,49	53	13,00
PR2	5,0	--	37	0,2	2,45	0,31	2,76	0,20	0,03	2,53	3,01	5,54	54	16,00
PR3	4,9	--	41	0,2	2,23	0,21	2,44	0,20	0,08	2,86	2,74	5,60	49	17,00
BGA 139	6,2	--	393	0,5	5,91	1,42	7,33	0,00	0,51	1,43	8,30	9,73	85	30,00
BGA 123	6,1	--	120	0,2	12,4	1,44	13,87	0,00	0,13	2,09	14,2	16,2	87	57,00
BGA 324	5,6	--	85	0,2	2,19	0,61	2,80	0,00	0,07	2,31	3,09	5,40	57	--

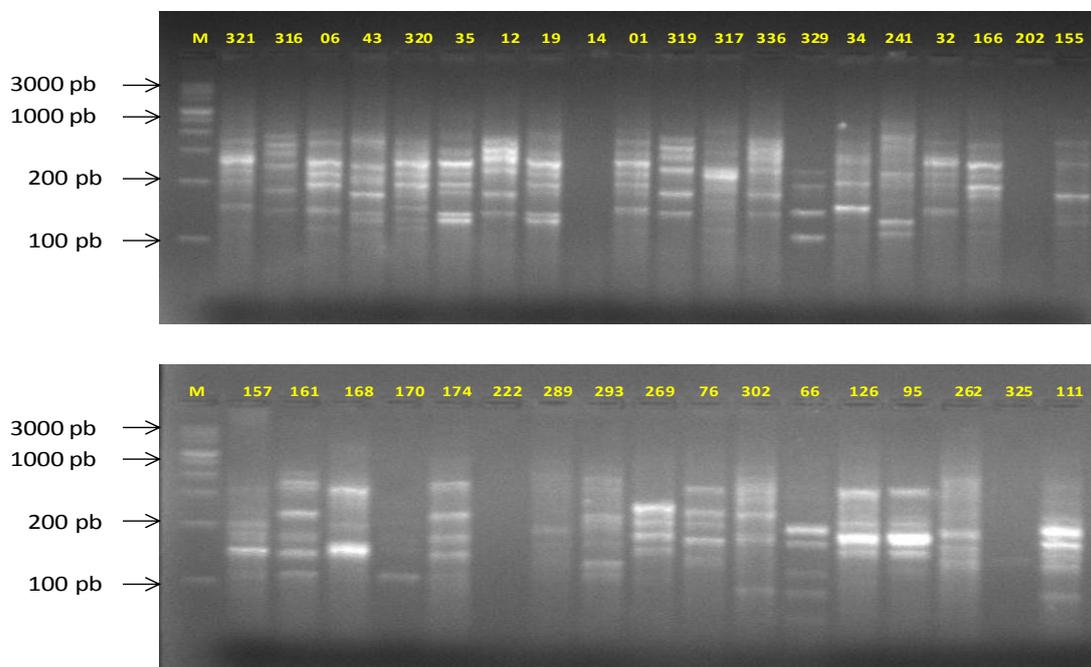
APÊNDICE B – Resultados das análises físicas do solo

Plantas	Composição granulométrica (g/kg) Dispersão com NaOH								Classificação textural
	Ar.muito grossa	Areia grossa	Areia média	Areia fina	Ar.muito fina	Areia total	Silte	Argila	
BGA 839	72	39	34	201	174	520	358	122	Franco
BGA 840	22	49	106	291	149	617	281	102	Franco argilo arenoso
BGA 842	1	24	205	513	140	883	56	61	Areia franca
BGA 843	8	6	67	141	24	246	179	575	Argila
BGA 844	0	14	116	568	127	825	53	122	Areia franca
BGA 855	360	240	57	55	11	723	153	124	Franco arenoso
BGA 858	41	128	114	293	61	637	121	242	Franco argilo arenoso
PR1	31	198	95	297	37	658	58	284	Franco argilo arenoso
PR2	33	173	113	249	21	589	106	305	Franco argilo arenoso
PR3	39	146	177	215	33	610	126	264	Franco argilo arenoso
BGA 123	23	170	314	193	52	752	55	193	Franco arenoso
BGA 139	27	220	169	307	41	764	64	172	Franco arenoso
BGA 324	23	208	316	166	44	757	82	161	Franco arenoso

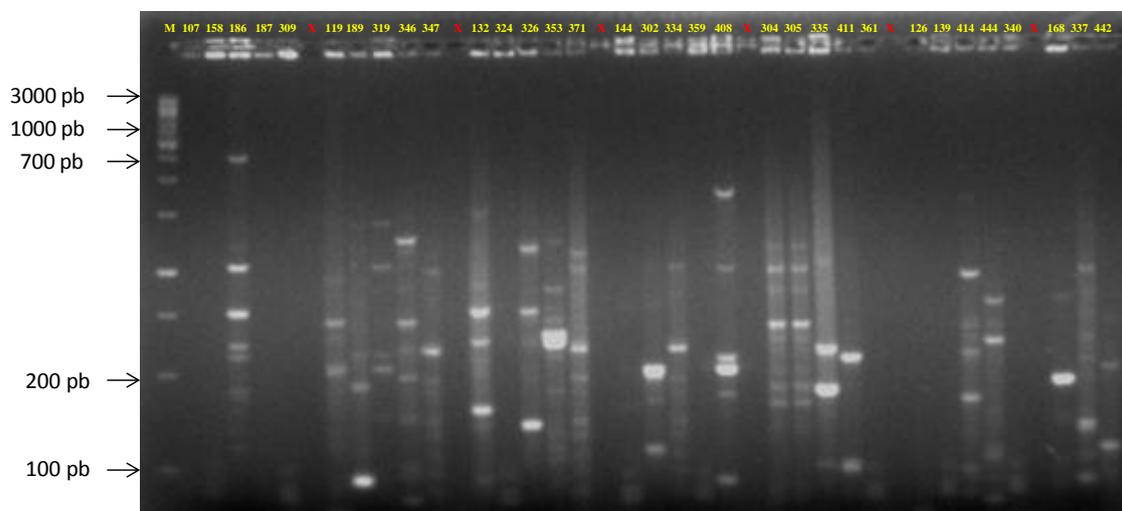
APÊNDICE C - Perfis de bandas obtidos pela técnica ERIC-PCR para 37 fungos isolados dos ambientes *ex situ*, de cultivo e natural. M1 – Marcador FERMENTAS 100pb DNA ladder; 321 à 32 – fungos isolados do ambiente *ex situ*; 166 à 222 – fungos isolados do ambiente de cultivo; 289 à 111 – fungos isolados do ambiente natural.



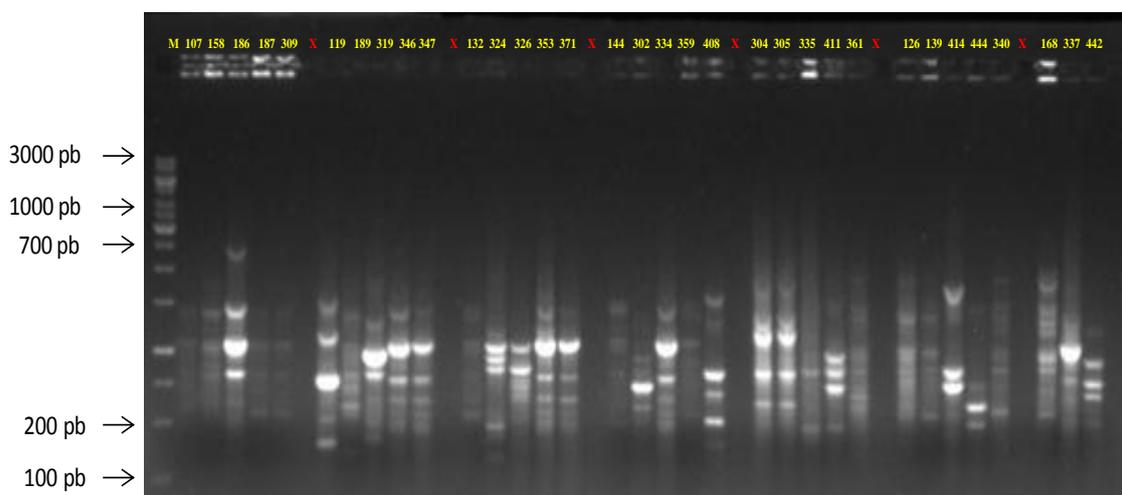
APÊNDICE D - Perfis de bandas obtidos pela técnica BOX-PCR para 37 fungos isolados dos ambientes *ex situ*, de cultivo e natural. M1 – Marcador FERMENTAS 100 pb DNA ladder; 321 à 32 – fungos isolados do ambiente *ex situ*; 166 à 222 – fungos isolados do ambiente de cultivo; 289 à 111 – fungos isolados do ambiente natural.



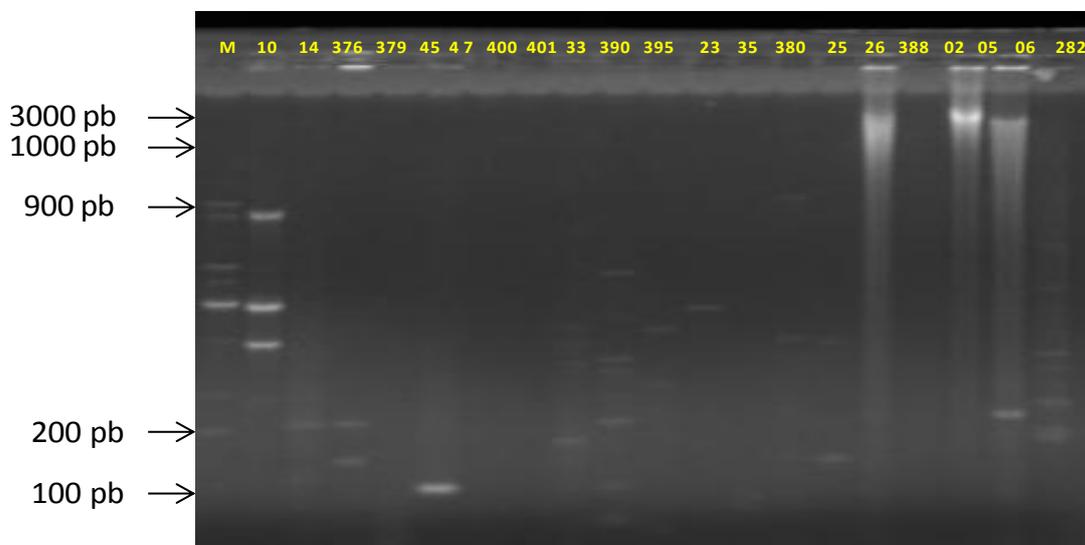
APÊNDICE E - Perfis de bandas obtidos pela técnica ERIC-PCR para 33 isolados bacteriano do ambiente natural. M1 – Marcador FERMENTAS 100 pb DNA ladder; x – intervalos entre os subgrupos; 107 à 309 – subgrupo BPESAN; 119 à 347 – subgrupo ACTSAN; 132 à 371 – subgrupo BPSSAN; 144 à 408 – subgrupo BTSAN; 304 à 361 – subgrupo BERAN; 126 à 340 – subgrupo BEFAN; 168 à 442 – subgrupo BECAN.



APÊNDICE F. Perfis de bandas obtidos pela técnica BOX-PCR para 33 isolados bacteriano do ambiente natural. M1 – Marcador FERMENTAS 100 pb DNA ladder; x – intervalos entre os subgrupos; 107 à 309 – subgrupo BPESAN; 119 à 347 – subgrupo ACTSAN; 132 à 371 – subgrupo BPSSAN; 144 à 408 – subgrupo BTSAN; 304 à 361 – subgrupo BERAN; 126 à 340 – subgrupo BEFAN; 168 à 442 – subgrupo BECAN.



APÊNDICE G - Perfis de bandas obtidos pela técnica ERIC-PCR para 21 isolados bacterianos do ambiente *ex situ*. M1 – Marcador FERMENTAS 100 pb DNA ladder; 10 à 379 – subgrupo BTSAX; 45 à 401 – subgrupo PSAEX; 33 à 395 – subgrupo ACTSAEX; 23 à 380 – subgrupo BERAEX; 25 à 388 – subgrupo BECAEX; 02 à 282 – subgrupo BPESAEX.



APÊNDICE H - Perfis de bandas obtidos pela técnica BOX-PCR para 21 isolados bacterianos do ambiente *ex situ*. M1 – Marcador FERMENTAS 100 pb DNA ladder; 10 à 379 – subgrupo BTSAX; 45 à 401 – subgrupo PSAEX; 33 à 395 – subgrupo ACTSAEX; 23 à 380 – subgrupo BERAEX; 25 à 388 – subgrupo BECAEX; 02 à 282 – subgrupo BPESAEX.

