

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE MESTRADO**

**USO DE BACTÉRIAS BENÉFICAS PROVENIENTES DO  
MICROBIOMA ASSOCIADO À *Ananas comosus* L. Merril  
VISANDO PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS  
E SUPRESSÃO DE *Fusarium* spp.**

**Polyana Oliveira Santos da Silva**

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA  
OUTUBRO – 2022**

**USO DE BACTÉRIAS BENÉFICAS PROVENIENTES DO  
MICROBIOMA ASSOCIADO À *Ananas comosus* L. Merril  
VISANDO PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS E  
SUPRESSÃO DE *Fusarium* spp.**

**Polyana Oliveira Santos da Silva**

Bacharela em Biologia

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2020

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Agrárias (Área de Concentração: Agricultura Tropical).

**Orientador:** Prof. Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira

**Coorientadora:** Profa. Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA**

**OUTUBRO - 2022**

## FICHA CATALOGRÁFICA


S586u	<p>Silva, Polyana Oliveira Santos da. Uso de bactérias benéficas provenientes do microbioma associado à <i>Ananas comosus</i> L. Merrill visando promoção de crescimento de plantas e supressão de <i>Fusarium</i> spp. / Polyana Oliveira Santos da Silva._ Cruz das Almas, BA, 2022. 88f.; il.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Mestrado em Ciências Agrárias.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira. Coorientadora: Prof. Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza.</p> <p>1.Abacaxi – Crescimento. 2.Abacaxi – Bactérias promotoras de crescimento – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD: 634.774</p>
-------	--

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE MESTRADO**

**USO DE BACTÉRIAS BENÉFICAS PROVENIENTES DO  
MICROBIOMA ASSOCIADO À *Ananas comosus* L. Merrill  
VISANDO PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS E  
SUPRESSÃO DE *Fusarium* spp.**

Comissão examinadora da defesa de dissertação de  
Polyana Oliveira Santos da Silva

Aprovada em 31 de outubro de 2022

 Documento assinado digitalmente  
SAULO ALVES SANTOS DE OLIVEIRA  
Data: 21/12/2022 11:15:28-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira  
Embrapa Mandioca e Fruticultura  
Examinador Interno (Orientador)

Prof. Dr. Hermínio Souza Rocha  
Embrapa Mandioca e Fruticultura  
Examinador Externo

Cintia Paula Feitosa Souza  
Dra. Em Ciências Agrárias  
Examinadora Externa

À minha filha, que me faz almejar sempre mais, ao meu marido, que sempre me apoiou e não mede esforços para me auxiliar, aos meus pais, por toda assistência e educação proporcionada, às minhas irmãs e aos meus demais familiares.

Dedico

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Deus, pela minha vida e por me sustentar nos momentos difíceis...

Aos meus pais e irmãs, por todo o apoio fornecido.

Ao meu esposo, por todo carinho, auxílio e incentivo para que nunca desistisse dos meus sonhos.

Ao Dr. Saulo, que aceitou me orientar, sanando sempre dúvidas durante todo este período. Obrigada pela disponibilidade e paciência.

À Dra. Fernanda, que aceitou ser minha coorientadora, auxiliando sempre na obtenção de peças-chave para o bom andamento do trabalho.

À Dra. Cintia, por toda amizade, apoio e carinho durante esta jornada.

A todo o pessoal do Laboratório de Fitopatologia e Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Mandioca e Fruticultura, em especial ao Dr. Leandro e a Dra. Flávia, pela assistência durante o desenvolvimento das etapas laboratoriais.

A UFRB e a Embrapa Mandioca e Fruticultura pelo fornecimento de conhecimentos e estrutura, e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código de Financiamento 001 (DS/CAPES/UFRB - 88887.608329/2021-00), pela concessão da bolsa de estudos.

Meu muito obrigada!

# USO DE BACTÉRIAS BENÉFICAS PROVENIENTES DO MICROBIOMA ASSOCIADO À *Ananas comosus* L. Merrill VISANDO PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS E SUPRESSÃO DE *Fusarium* spp.

## RESUMO GERAL

O abacaxi é uma das frutas mais produzidas no Brasil, no entanto, apesar da sua propagação vegetativa, a produção de mudas é um dos grandes entraves para a cadeia, seja pelos custos envolvidos, pela possibilidade de disseminação de doenças sistêmicas ou pelo tempo necessário para obtenção de plantas com a qualidade necessária para plantio em campo. Visando a redução destes problemas, trabalhos recentes têm demonstrado o potencial de bactérias provenientes do microbioma associado de plantas na promoção de crescimento vegetal e no manejo de doenças. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de bactérias provenientes do microbioma de *Ananas* spp. quanto à capacidade de promoção de crescimento de abacaxizeiros, e estimar o impacto destas na supressão de *Fusarium* spp. Para tanto, foram realizados experimentos em diferentes etapas de cultivo: *in vitro*, em casa de vegetação e em vasos com a cultivar 'BRS Imperial'. Também foi realizado o cultivo em vasos para mudas da cv. 'Pérola'. As plantas foram avaliadas segundo diferentes parâmetros de crescimento como: altura da planta, número de folhas, vigor, diâmetro da roseta e comprimento e largura da folha 'D'. Também foram realizadas análises destrutivas para mensuração da massa fresca e seca da raiz e da parte aérea. Para avaliação do efeito de supressão de *Fusarium* spp. foram realizados testes de pareamento *in vitro* e também foi avaliado o efeito da inoculação do fungo em folhas destacadas e em mudas de abacaxizeiro cv. 'Pérola'. De acordo com os resultados, foi possível constatar que para mudas de abacaxizeiro cv. 'BRS Imperial' os tratamentos BAC406 e BAC222 promoveram incremento para todas as variáveis analisadas, para a fase *in vitro* e para o cultivo em vasos. Já para a aplicação dos microrganismos em casa de vegetação, o tratamento BAC222 se mostrou o mais efetivo. No que se refere a cv. 'Pérola', foi possível constatar que o tratamento BAC25 proporcionou incremento nos parâmetros de crescimento das mudas. Os isolados bacterianos testados exibiram potencial antagonista sob *Fusarium guttiforme* em experimento *in vitro*, com ênfase para os tratamentos BAC25 e BAC388, entretanto, estes tratamentos não foram capazes de reduzir a área da lesão do patógeno em folhas destacadas. Já para supressão de *F. guttiforme* em mudas, o tratamento BAC406 se mostrou promissor, reduzindo o avanço dos sintomas da doença nas plantas. Estudos como este demonstram, a importância do conhecimento acerca do microbioma associado de plantas, tornando possível identificar microrganismos capazes de promover o crescimento de plantas, e que tenham potencial para auxiliar no manejo de doenças. No entanto, estudos mais aprofundados devem ser realizados para uma melhor compreensão da relação entre os microrganismos e a cultura estudada.

**Palavras-chave:** Abacaxizeiro, Bactérias promotoras de crescimento vegetal, Fusariose.

# USE OF BENEFICIAL BACTERIA FROM THE MICROBIOME ASSOCIATED WITH *Ananas comosus* L. Merrill AIMING TO PROMOTE PLANT GROWTH AND SUPPRESSION OF *Fusarium* spp.

## GENERAL ABSTRACT

Pineapple is one of the most produced fruits in Brazil, however, despite its vegetative propagation, the production of seedlings is one of the major obstacles for the chain, either because of the costs involved, possibility of spreading systemic diseases or the time needed to obtaining plants with the necessary quality for planting in the field. Aiming at reducing these problems, recent studies have demonstrated the potential of bacteria from the associated microbiome of plants in promoting plant growth and in disease management. Therefore, the objective of this work was to evaluate the potential of bacteria from the microbiome of *Ananas* spp. regarding the ability of pineapple plants to promote growth, and to estimate their impact on the suppression of *Fusarium* spp. For this purpose, experiments were carried out at different stages of cultivation: *in vitro*, in a greenhouse and in pots with the 'BRS Imperial' cultivar. Cultivation in vases for seedlings of cv. 'Pérola'. The plants were evaluated according to different growth parameters such as: plant height, number of leaves, vigour, rosette diameter and length and width of the 'D' leaf. Destructive analyzes were also performed to measure fresh and dry mass of roots and shoots. For evaluation of the suppression effect of *Fusarium* spp. *in vitro* pairing tests were carried out and the effect of fungus inoculation on detached leaves and seedlings of pineapple cv. 'Pérola'. According to the results, it was possible to verify that for seedlings of pineapple cv. 'BRS Imperial' treatments BAC406 and BAC222 promoted increment for all analyzed variables, for the *in vitro* phase and for the cultivation in vases. As for the application of microorganisms in a greenhouse, the BAC222 treatment proved to be the most effective. With regard to cv. 'Pérola', it was possible to verify that the BAC25 treatment provided an increase in the growth parameters of the seedlings. The bacterial isolates tested showed antagonistic potential against *Fusarium guttiforme* in an *in vitro* experiment, with emphasis on the BAC25 and BAC388 treatments, however, these treatments were not able to reduce the area of the pathogen's lesion in detached leaves. As for the suppression of *F. guttiforme* in seedlings, the BAC406 treatment showed promise, reducing the progression of disease symptoms in plants. Studies like this demonstrate the importance of knowledge about the associated microbiome of plants, making it possible to identify microorganisms capable of promoting plant growth, and that have the potential to help in the management of diseases. However, further studies must be carried out for a better understanding of the relationship between the microorganisms and the studied culture.

**Keywords:** *Pineapple, Plant growth-promoting bacteria, Fusarium disease.*



## LISTA DE ABREVIATURAS

AACP	Área abaixo da curva de progresso
AACPALT	AACP para a variável altura da planta
AACP CFD	AACP para a variável comprimento da folha 'D'
AACPDIAMR	AACP para a variável diâmetro da roseta
AACP LFD	AACP para a variável largura da folha 'D'
AACPNF	AACP para a variável número de folhas
AACPVIG	AACP para a variável vigor
ALT	Altura da planta
CFD	Comprimento da folha 'D'
CLOR	AACP para a variável clorose
DEF	AACP para a variável deformações na morfologia da planta
DIAMC	Diâmetro do caule
DIAMR	Diâmetro da roseta
EXGM	AACP para a variável exsudação de goma
LCTV	Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais
LFD	Largura da folha 'D'
MF	AACP para a variável manchas foliares
MFPA	Massa fresca da parte aérea
MFR	Massa fresca da raiz
MSPA	Massa seca da parte aérea
MSR	Massa seca da raiz
NF	Número de folhas
SOB	Sobrevivência
VIG	Vigor

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	3
2.1. O abacaxizeiro .....	3
2.2. Bactérias promotoras de crescimento vegetal.....	5
2.3. Caracterização e manejo da fusariose do abacaxizeiro .....	7
<b>3. REFERÊNCIAS</b> .....	10
<b>CAPÍTULO 1 - Potencial de isolados bacterianos do microbioma funcional de <i>Ananas spp.</i> na promoção de crescimento de mudas de abacaxizeiro cv. ‘BRS Imperial’</b> .....	14
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	17
2.1. Avaliação do potencial de promoção de crescimento de isolados bacterianos .....	17
2.2. Validação de um sistema de produção <i>in vitro</i> de mudas de abacaxizeiro cv. ‘BRS Imperial’, a partir do processo de microbiolização .....	20
2.3. Validação de um sistema de produção de mudas de abacaxi cv. ‘BRS Imperial’ em casa de vegetação .....	22
2.4. Análises estatísticas.....	244
<b>3. RESULTADOS</b> .....	24
3.1. Avaliação do potencial de promoção de crescimento de isolados bacterianos .....	24
3.2. Validação de um sistema de produção <i>in vitro</i> de mudas de abacaxizeiro cv. ‘BRS Imperial’, a partir do processo de microbiolização .....	29
3.3. Validação de um sistema de produção de mudas de abacaxi cv. ‘BRS Imperial’ em casa de vegetação .....	36
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	40
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	44
<b>5. REFERÊNCIAS</b> .....	45
<b>CAPÍTULO 2 - Avaliação do potencial de isolados bacterianos oriundos do microbioma funcional de <i>Ananas spp.</i> na promoção de crescimento de mudas microbiolizadas de abacaxizeiro cv. ‘Pérola’ e supressão de <i>Fusarium spp.</i></b> .....	48
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	50
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	51
2.1. Validação da promoção de crescimento do abacaxizeiro cv. ‘Pérola’ por bactérias benéficas.....	51
2.2. Antagonismo de isolados bacterianos à <i>Fusarium spp.</i> .....	53

2.3. Avaliação do potencial de isolados bacterianos oriundos do microbioma de <i>Ananas</i> spp. na supressão de <i>Fusarium guttiforme</i> em folhas destacadas de abacaxizeiro cv. 'Pérola'.....	55
2.4. Avaliação do potencial de isolados bacterianos oriundos do microbioma de <i>Ananas</i> spp. na supressão de <i>Fusarium guttiforme</i> em mudas de abacaxizeiro cv. 'Pérola' em vasos.....	57
2.4. Análises estatísticas.....	59
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>59</b>
3.1. Validação da promoção de crescimento do abacaxizeiro cv. 'Pérola' por bactérias benéficas.....	59
3.2. Antagonismo de isolados bacterianos à <i>Fusarium</i> spp.. .....	62
3.3. Avaliação do potencial de isolados bacterianos oriundos do microbioma de <i>Ananas</i> spp. na supressão de <i>Fusarium guttiforme</i> em folhas destacadas de abacaxizeiro cv. 'Pérola'.....	65
3.4. Avaliação do potencial de isolados bacterianos oriundos do microbioma de <i>Ananas</i> spp. na supressão de <i>Fusarium guttiforme</i> em mudas de abacaxizeiro cv. 'Pérola' em vasos.....	65
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>69</b>
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>74</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>75</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A relação entre as comunidades microbianas com o ambiente e com outros organismos vivos tem sido alvo de estudos cada vez mais frequentes. É sabido que estas relações podem ser patogênicas, benéficas ou neutras (ANDREOTE; GUMIERE; DURRER, 2014). No entanto, por muito tempo os estudos focavam apenas na relação entre plantas e microrganismos patogênicos. Os quais eram manejados principalmente a partir do controle químico.

Com o desejo aumentado de produzir alimentos livres de resíduos químicos e mais saudáveis, a busca por alternativas menos danosas ao ambiente e à saúde humana forneceu oportunidade para que fossem realizados estudos acerca das relações benéficas entre microrganismos e plantas.

Diversas pesquisas têm mostrado o potencial de bactérias benéficas tanto no incremento de parâmetros de crescimento de plantas, quanto no aumento da produção vegetal (BALDOTTO *et al.*, 2010; MATSUO *et al.*, 2022; OLIVEIRA *et al.*, 2022; AHMAD; KHAN; SHAHZAD, 2022).

Além disso, o estudo da composição do microbioma também permite identificar microrganismos capazes de realizar o controle biológico de pragas e doenças em culturas com as quais estão associadas. Como observado em pesquisas realizadas por Garcia, Knaak e Fiuza (2015) e por Kazeroni *et al.* (2020).

Apesar do conhecimento acerca do microbioma ter aumentado, pouco se sabe sobre como os mecanismos vegetais permitem a associação com microrganismos específicos e como as atividades microbianas são influenciadas por potenciais agentes de biocontrole contra invasão de doenças causadas por patógenos em espécies do gênero *Ananas*, o que torna necessário uma busca para compreensão destes mecanismos na cultura estudada.

Nesse sentido, este trabalho é a continuidade das pesquisas desenvolvidos por Souza *et al.* (2019), onde foram quantificadas e comparadas a diversidade existente de microrganismos cultiváveis em solos obtidos de diferentes áreas de cultivo de abacaxizeiros: ambiente natural, ambiente de cultivo e ambiente de conservação *ex situ* – Banco de Germoplasma de Abacaxi. E das pesquisas desenvolvidas por Souza (2021), onde foram realizadas análises metagenômicas para compreensão da influência dos diferentes ambientes na composição e na abundância dos microrganismos que compõe o microbioma de *Ananas*. A autora também avaliou a

capacidade de promoção de crescimento destes microrganismos tanto em MIX quanto isoladamente, para mudas de abacaxizeiro cv. 'BRS Imperial, em diferentes etapas de cultivo.

Diante disso, o presente estudo complementa os conhecimentos acerca da interação dos isolados bacterianos associados com a cultura, a partir da avaliação do seu potencial na promoção de crescimento em mudas microbiolizadas de abacaxizeiros cv. 'BRS Imperial', em diferentes etapas de produção, visando redução do tempo de aclimatização, incremento nas taxas de sobrevivência e aumento de vigor, bem como busca avaliar o potencial de promoção de crescimento destes isolados em mudas microbiolizadas de abacaxizeiros cv. 'Pérola' e na supressão de *Fusarium* spp.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. O abacaxizeiro

O abacaxi (*Ananas comosus* L. Merril) é uma fruta típica de regiões tropicais e subtropicais pertencente ao gênero *Ananas*, o mais representativo da família *Bromeliaceae*, que é composta por 58 gêneros e aproximadamente 3.408 espécies (PÉREZ-LÓPEZ *et al.*, 2020).

A origem da cultura é atribuída principalmente à América do Sul, em especial aos países Brasil, Argentina e Paraguai. E por este motivo, nestes locais são encontradas a maior variabilidade genética do gênero e, conseqüentemente, grande parte das cultivares existentes (WALI, 2019; ALFONSO; PÉREZ; ÁLVAREZ, 2020).

A fruteira também pode ser cultivada em diversos lugares do mundo como a África, a Índia e a Indonésia, pois apresenta boa adaptabilidade à diferentes altitudes e condições climáticas, além de não exigir altas demandas hídricas durante seu desenvolvimento (ZIZKA *et al.*, 2019).

Esta adaptabilidade, em parte, se deve ao fato do abacaxizeiro, assim como a maioria das *Bromeliaceae*, possuir o metabolismo ácido das crassuláceas (CAM), que permite às plantas tolerar maiores condições de seca (BARTOLOMEU; PAULL; ROHRBACH, 2018). No entanto, pode ocorrer redução da produtividade, caso ocorram períodos prolongados de abstenção hídrica ou mudanças discrepantes de temperatura durante as fases de crescimento e formação do fruto (SANTANA *et al.*, 2001).

De acordo com Matos *et al.* (2014), a faixa ótima de temperatura para seu cultivo varia de 15,5 °C a 32,5 °C, no entanto, é indicado que esta amplitude térmica não ultrapasse 8 °C a 14 °C diários.

Quanto à luminosidade, a planta necessita de um mínimo diário de 6,8 a 8,2 horas de luz solar, e pode ser cultivada em diferentes tipos de solo, desde que apresentem boa drenagem, aeração, aporte de matéria orgânica e pH variando entre 4,5 e 5,5 (MATOS *et al.*, 2006).

No que se refere à sua produção, o Brasil ocupa o segundo lugar no ranking mundial, sendo a maioria da fruta produzida no país oriunda de regiões semiáridas dos estados da Paraíba, Pará e Minas Gerais (NUNES *et al.*, 2017). Estes estados

são responsáveis por 52% da produção nacional da fruta, a qual totalizou no ano de 2021, uma produção de 1.545.036 frutos, produzidos em 63.589 hectares, gerando um capital de mais de 2,5 milhões de reais para o país, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2021).

Os abacaxizeiros são plantas perenes, caracterizadas por possuírem caule completamente recoberto por folhas sobrepostas e dispostas em espiral, que formam um tipo de roseta densa (KRAUS, 1948). Geralmente as folhas são caracterizadas por possuírem uma base mais alargada que se estreita à medida que atinge o ápice, se encerrando com espinhos (BARTOLOMEU; PAULL; ROHRBACH, 2018).

Após 12 a 30 meses, dependendo da cultivar e das condições edafoclimáticas, ocorre o período de floração e a planta produz um único fruto carnoso e doce que se desenvolve em seu ápice, a partir de uma inflorescência (HASSAN; OTHMAN; SIRIPHANICH, 2011). Geralmente o fruto apresenta uma forma cilíndrica e é composto por 100 a 200 frutinhos fundidos entre si a partir de um eixo central (GIACOMELLI, 1981).

Quanto a produção de mudas, a fruteira exhibe fácil manejo de materiais propagativos, que podem ser obtidos por meio de brotamentos laterais, fracionamento do caule, ou pela da coroa (REINHARDT *et al.*, 2018).

No entanto, mudas originadas a partir de uma planta já existente na lavoura podem causar diversos prejuízos aos próximos cultivos que serão instalados. Podem atuar como agentes disseminadores de doenças, além de gerar uma redução progressiva na produção, tanto na quantidade quanto na qualidade dos frutos (MATOS *et al.*, 2018).

Das diversas cultivares de abacaxi existentes, as mais cultivadas quando a finalidade é a comercialização de frutos, são a cv. 'Smooth Cayenne' e a cv. 'Pérola'. Responsável pela maioria da produção mundial de abacaxi, a cv. 'Smooth Cayenne' é caracterizada por não apresentar espinhos ao longo dos bordos das folhas e produzir frutos que variam entre 1,5 a 2,5 kg, além de serem mais doces e ácidos que os frutos de outras cultivares (CABRAL e JUNGHANS, 2003), tornando-os mais desejados.

Já no Brasil, a cultivar mais produzida é a 'Pérola'. É caracterizada por apresentar espinhos ao longo do bordo das folhas, além de possuir porte e frutos menores que os da cv. 'Smooth Cayenne'. Possui polpa branca e é menos ácido do

que os frutos de outras cultivares, se tornando agradável ao paladar (REINHARDT e CUNHA, 1999).

Outra cultivar que vem ganhando espaço na comercialização de frutos é a 'BRS Imperial'. Desenvolvida pela Embrapa Mandioca e Fruticultura em 2004, é um produto do cruzamento entre as cvs. 'Perolera' e 'Smooth Cayenne' e apresenta folhas verde escuras sem espinhos no bordo (CABRAL e MATOS, 2005). Produz frutos com altos teores de açúcares e uma intensa coloração amarelada, porém menores do que os da cv. 'Pérola' (VIANA *et al.*, 2013). Uma de suas características importantes é ser resistente à fusariose (CAETANO; VENTURA; BALBINO, 2015), no entanto, ainda possui elevado custo de aquisição de mudas, o que dificulta o cultivo em grande escala.

A maioria destas mudas são originadas a partir de biofábricas, pelo processo de micropropagação. Este método apresenta diversas vantagens, como rendimento e maturidade de frutos uniformes, além de reduzir a incidência de doenças em campo, uma vez que estes materiais são livres de doenças (REINHARDT e CUNHA, 1999) já que a propagação do material é realizada em ambiente estéril.

No entanto, o tempo de produção a partir deste método é lento, uma vez que após a formação das mudas, as mesmas passam por um período de aclimação, onde a planta é inserida em substrato ainda em laboratório, e posterior aclimatização, período correspondente à adaptação da planta ao ambiente de casa de vegetação, que pode durar até seis meses (QUISEN e ANGELO, 2008).

Visando uma redução do tempo de produção de mudas micropropagadas de abacaxizeiro, podem ser utilizadas bactérias promotoras de crescimento vegetal, uma vez que estes microrganismos podem promover incremento no crescimento destas mudas, assim como possuem capacidade para melhorar o vigor das mesmas para uma melhor adaptação ao plantio em campo.

## **2.2. Bactérias promotoras de crescimento vegetal**

A compreensão da relação entre os microrganismos e os benefícios provenientes da sua associação com as plantas, tem avançado nos últimos anos.



Estes microrganismos podem interagir com as plantas de diferentes formas e compor diferentes microbiomas (SOUZA *et al.*, 2019), como o rizosférico e o endofítico.

Conhecidos também como promotores de crescimento vegetal, a utilização destes agentes benéficos tem conquistado cada vez mais espaço em áreas de cultivo de plantas comerciais por apresentarem diversas estratégias que conferem benefícios para as plantas com as quais estão associadas, como a fixação de nitrogênio, elemento essencial para o desenvolvimento de algumas culturas. Bem como incremento no crescimento do vegetal, incitados a partir da liberação de substâncias por estes microrganismos, que induzem a síntese de reguladores vegetais pelas plantas (GAVILANES *et al.*, 2020).

Estes benefícios podem ser conferidos por meio da interação de bactérias ou fungos com as raízes das plantas, quando presentes na rizosfera, ou até mesmo pela liberação de substâncias no interior de seus tecidos, quando endofíticos (GUIMARÃES *et al.*, 2017).

As bactérias promotoras de crescimento vegetal não são patogênicas para as plantas e podem colonizar seus tecidos externa ou internamente atuando diretamente na promoção do crescimento vegetal em função de que ao estarem presentes no solo, elas têm a capacidade de liberar substâncias que podem induzir, a produção de auxinas pelas plantas, que é o regulador de crescimento responsável pela diferenciação e divisão celular (TAIZ e ZEIGER, 2013; MENDONÇA *et al.*, 2020).

Diante disso, diferentes estudos vêm sendo realizados visando a ampliação do conhecimento sobre o microbioma associado às plantas e suas interações benéficas. Ferreira e Bettiol (2019), demonstraram em seus estudos uma grande diversidade de grupos de bactérias com potencial benéfico para plantas cultivadas, as quais podem promover crescimento em diferentes fases de cultivo, desde a produção de mudas micropropagadas até a fase de campo.

Baldotto *et al.* (2010) avaliaram o potencial de 20 estirpes bacterianas como promotoras de crescimento para abacaxizeiro cv. 'Vitória', além de testarem seu potencial como antagonistas para *Fusarium guttiforme*. Com base nos resultados foi constatado que quatro delas possuíam capacidade para promover incremento nos parâmetros de crescimento avaliados. Além disso, também foi observada redução do tamanho da colônia fúngica.

Souza *et al.* (2019), em suas pesquisas quantificaram e compararam a diversidade existente de microrganismos cultiváveis em solos obtidos de diferentes áreas de cultivo e nos tecidos internos de plantas do gênero *Ananas* oriundas da Bahia, Mato Grosso e Rondônia, onde foram encontradas similaridades entre as composições de microrganismos existentes, independentemente do local de origem, indicando que a cultura requer praticamente a mesma composição microbiana. Também foi verificado que estes microrganismos possuem tanto potencial para solubilização dos nutrientes requeridos pelas plantas, quanto a capacidade de competição com microrganismos fitopatogênicos para a cultura, demonstrando uma íntima relação de equilíbrio microrganismo-planta.

Trabalhos realizados por Souza (2021), complementam a compreensão dos microrganismos associados ao gênero *Ananas*, onde foram realizadas análises metagenômicas para compreensão da influência dos diferentes ambientes na composição e na abundância dos microrganismos que compõe o microbioma. Este trabalho também buscou avaliar a capacidade destes microrganismos na promoção de crescimento de mudas de abacaxizeiro. Foram identificados 12 gêneros de bactérias com importância agrícola vivendo em associação com as plantas, sendo que alguns destes isolados apresentaram capacidade de promoção de crescimento para pelo menos duas das variáveis analisadas.

Apesar da compreensão do microbioma associado ao abacaxi ter avançado nos últimos anos e a cultura apresentar uma alta produção nacional, ainda ocorrem perdas significativas na produção em decorrência de estresses abióticos, como o estresse hídrico, e estresses bióticos, que podem ser causados por pragas e doenças.

Dentre as doenças que atingem a cultura do abacaxizeiro, a mais grave é a fusariose, causada pelo fungo *F. guttiforme* que limita a produção principalmente da cv. 'Pérola' (BEZERRA *et al.*, 2019; VIANA *et al.*, 2020).

### **2.3. Caracterização e manejo da fusariose do abacaxizeiro**

Também conhecida como gomose, esta doença se destaca pela frequência com que ocorre e pelos graves danos causados nas principais áreas produtoras do Brasil, gerando perdas significativas da produção da fruta em função de sua

capacidade de causar sintomas em qualquer parte da planta e em qualquer estágio do seu ciclo de vida (VERZIGNASSI *et al.*, 2006).

A fusariose do abacaxizeiro é uma doença caracterizada, principalmente, pelo aparecimento de exsudação de goma, que pode aparecer tanto nas mudas, quanto nas plantas e/ou nos frutos, podendo ser parciais ou totalmente afetados, adquirindo no estágio final de evolução da doença um aspecto mumificado (MELO *et al.*, 2016).

O agente causal desta doença é o fungo *Fusarium guttiforme*, que pertence ao gênero *Fusarium* da classe Sordariomycetes (NIRENBERG e O'DONNELL, 1998). Esta doença pode provocar perdas significativas na produção do fruto, nas fases de pré e pós-colheita, caso o período de desenvolvimento da fruta ocorra em períodos chuvosos (VILAPLANA; PÉREZ-REVELO; VALENCIA-CHAMORRO, 2018), podendo gerar perdas superiores a 90% da produção total em plantações exclusivas com a cultivar 'Pérola', uma das mais cultivadas no Brasil, e que se mostra susceptível a fusariose (CAETANO; VENTURA; BALBINO, 2015).

Seu manejo vem sendo realizado a partir da utilização de cultivares resistentes e de técnicas de manejo integradas que envolvem a aplicação de práticas culturais visando redução da quantidade de inóculo existente na área de cultivo, seguida da utilização de controle químico, que é aplicado no início do aparecimento da inflorescência (CAETANO; VENTURA; BALBINO, 2015; MELO *et al.*, 2016).

No entanto, apesar de se obter um resultado satisfatório, esta segunda etapa do método de controle pode ser bastante prejudicial ao meio ambiente e a saúde humana (MELO *et al.*, 2016), podendo favorecer inclusive o desenvolvimento de resistência dos patógenos, e contaminação de frutos, se utilizados de maneira inadequada.

Dentro desse contexto, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos buscando identificar agentes microbianos para manejo desta e de outras doenças, em razão de que a utilização de microrganismos benéficos possui um grande potencial para o controle de pragas e doenças (BEZERRA *et al.*, 2019).

Em função de possuírem capacidade para induzir resistência sistêmica a alguns fitopatógenos, os microrganismos benéficos podem atuar no controle biológico de pragas e doenças de plantas por meio da antibiose, processo pelo qual os metabólitos produzidos pelo organismo antagonista têm capacidade para reduzir ou eliminar a presença do patógeno (GABARDO, 2020).

Em relação a estudos com microrganismos benéficos visando controle biológico em plantas de abacaxi, Melo *et al.* (2016), investigaram o potencial de diferentes espécies de *Trichoderma* spp. no controle *in vitro* de *F. guttiforme*, e concluíram que o microrganismo testado apresentou eficácia no controle do fungo causador da fusariose, se mostrando um potencial agente de controle.

Já em estudos realizados por Gonçalves *et al.* (2017), foram avaliados *Bacillus subtilis* isolados de diferentes amostras de solos no controle *in vitro* de *Fusarium* sp. e foi observada uma inibição de 60% do crescimento do fungo, demonstrando que a bactéria em questão também se apresenta como um potencial agente de biocontrole para o fungo.

Desta maneira, é possível observar que o conhecimento acerca de agentes de biocontrole é de suma importância. Tendo em vista que sua utilização pode proporcionar uma produção agrícola mais econômica e sustentável, uma vez que muitos microrganismos endofíticos podem atuar como promotores de crescimento de plantas e/ou no controle de fitopatógenos, oferecendo o mínimo de risco ao meio ambiente.

Logo, tornam-se necessários estudos que visem compreender e validar como estes mecanismos agem, no que se refere à associação com microrganismos específicos e como estas atividades microbianas são influenciadas por potenciais agentes de biocontrole contra invasão de doenças causadas por patógenos em espécies do gênero *Ananas*.

Diante disso, o objetivo neste trabalho foi identificar bactérias provenientes do microbioma de *Ananas* spp. com capacidade para promoção de crescimento de abacaxizeiros, e estimar o impacto destas na supressão de *Fusarium* spp.

### 3. REFERÊNCIAS

- ALFONSO, D. R.; PÉREZ, M. I.; ÁLVAREZ, E. M. Los recursos fitogenéticos de piña (*Ananas comosus* var. *comosus* (L.) Merr.) en Cuba. **Revista de Investigaciones de La Universidad Le Cordon Bleu**, v. 6, n. 2, p. 27-40, 2019.
- AHMAD, M. A.; KHAN, Q. U; SHAHZAD, H. Response of Rhizobacterial strains and organic amendments on chickpea growth. **Brazilian Journal of Biology** [online]. 2022, v. 82. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.261908>. Acesso em 09 de ago. 2022.
- ANDREOTE, F. D, GUMIERE, T., DURRER, A. Exploring interactions of plant microbiomes. **Scientia Agricola**, v. 71, n. 6, p. 528-539, 2014.
- BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; OLIVARES, F. L.; VIANA, A. P.; SMITH, R. B. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 34, n. 2, p. 349-360, 2010.
- BARTOLOMEU, D. P; PAULL, R. E.; ROHRBACH, K. G. **The pineapple: Botany, production and uses**. Wallingford: Cabi International, 2018. 312p.
- BEZERRA, G. de A.; DIAS, V. M.; SANTOS, P. H. D. dos; AREDES, F. A. S.; SILVEIRA, S. F. da. Identificação e seleção de espécies de *Trichoderma* spp. endofíticos de bromélias de restingas como agentes de biocontrole da fusariose em frutos de abacaxi. **Summa Phytopathologica**, v. 45, n. 2, p. 172-178, 2019.
- CABRAL, J. R. S.; JUGHANS, D. T. **Variedades de abacaxi**. Cruz das Almas – BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. 4p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Comunicado técnico, 114).
- CABRAL, J. R. S.; MATOS, A. P. **Imperial, Nova Cultivar de Abacaxi**. Cruz das Almas – BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2005, 4p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Circular técnica, 63).
- CAETANO, L. C. S.; VENTURA, J. A.; BALBINO, J. M. S. Comportamento de genótipos de abacaxizeiro resistentes à fusariose em comparação a cultivares comerciais suscetíveis. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 2, p. 404-409, 2015.
- FERREIRA, T. C.; BETTIOL, W. Biocontrol of soilborne pathogens and growth promotion by *Bacillus* spp. in corn. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 15, n. 4, p. 337-356, 2019.
- GABARDO, G.; PRIA, M. D.; PRESTES, A. M. C.; SILVA, H. L. da. *Trichoderma asperellum* e *Bacillus subtilis* como antagonistas no crescimento de fungos fitopatogênicos *in vitro*. **Brazilian Journal Of Development**, v. 6, n. 8, p. 55870-55885, 2020.

GARCIA, T. V.; KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Bactérias endofíticas como agentes de controle biológico na orizicultura. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 82, n. 00, p. 1-9, 2015.

GAVILANES, F. Z.; ANDRADE, D. S.; SILVA, H. R. S. R.; ZAMORA, R. B. B.; PALACIOS, C. C. A cultura do milho: Nitrogênio e inoculação com bactérias promotoras de crescimento. **Revista Científica Multidisciplinária**, v. 3, n. 3, p. 17-26, 2020.

GONÇALVES, O. S.; ALMEIDA, T. C.; VILELA, C. S.; MACHADO, D. C. Prospecção de *Bacillus subtilis* como agente de biocontrole contra *Fusarium* sp. **Revista Mirante**, v. 10, n. 1, p.11, 2017.

GUIMARÃES, V. F.; BATTISTUS, A. G.; SOUZA, A. K. P. de; BULEGON, L. G.; OFFEMANN, L. C.; INAGAKI, A. M. **Bactérias promotoras de crescimento vegetal: da FBN à regulação hormonal, possibilitando novas aplicações**. In: Zambom, M. A.; Kuhn, O. J.; Silva, N. L. S. da.; Stangarlin, J. R.; Nunes, R. V.; Fülber, V. M.; Eyng, C. Ciências Agrárias: Ética do cuidado, legislação e tecnologia na agropecuária. Unioeste, 2017, p. 192-212.

GIACOMELLI, E. J.; P.Y, C. **Abacaxi no Brasil**. Campinas: Fundação Cargill, 1981, 101p.

HASSAN, A.; OTHMAN, Z.; SIRIPHANICH, J. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). **Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits**, p. 194-218, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção Agrícola - Lavoura Temporária**. Disponível em <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/abacaxi/br>> Acessado em: 10 de Junho de 2022.

MATOS, A. P. de; PÁDUA, T. R. P de; OLIVEIRA, F. O. P; CORDEIRO, Z. J. M.; PEREIRA, R. S. **Sistema orgânico de produção de mudas de abacaxi**. Cruz das Almas – BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2018, 11p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Circular técnica, 127).

MATOS, A. P. de; REINHARDT, D. H. R. C.; CUNHA, G. A. P. da; CABRAL, J. R. S.; SOUZA, L. F. S.; SANCHES, N. F.; ALMEIDA, O. A. de. **A cultura do abacaxi**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 98 p.

MATOS, A. P. de; VASCONCELOS, J. A. R.; SIMÃO, A. H. **Práticas de Cultivo para a Cultura do Abacaxi no Estado do Tocantins**. Cruz das Almas – BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2014. 36p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Documentos, 2011).

MATSUO, O.; ZUCARELI, C.; HORÁCIO, E. H.; ALVES, L. A. R.; SAAB, O. J. G. A. Co-inoculation of *Anabaena cylindrica* and *Azospirillum brasilense* during initial growth and chloroplast pigments of corn. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 26, n. 2, p. 97-102, 2022.

- MELO, L. G. L.; SILVA, E. K. C. S.; CAMPOS NETO, J. M.; LINS, S. R. O. RODRIGUES, A. A. C.; OLIVEIRA, S. M. A. de. Indutores de resistência abióticos no controle da fusariose do abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.51, n.10, p.1703-1709, 2016.
- MENDONÇA, J. J.; LIRA JUNIOR, M. A.; CARVALHO, E. X.; FRACETTO, G. G. M.; FRACETTO, F. J. C.; ALVES, M. J. G.; OLIVEIRA, J. P. Diversidade, mecanismos de atuação e potencial agrícola de bactérias promotoras de crescimento de plantas, usando milho como cultura exemplo. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 2, n. 25, p. 1-10, 2020.
- NIRENBERG, H.; O'DONNELL, K. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, v. 90, n. 3, p. 434-458, 1998.
- NUNES, J. S.; LINS, A. D. F.; GOMES, J. P.; SILVA, W. P. da; SILVA, F. B. da. Influência da temperatura de secagem nas propriedades físico-química de resíduos abacaxi. **Agropecuária Técnica**, v. 38, n. 1, p. 41-46, 2017.
- OLIVEIRA, O. H. de; CECCON, G.; CAPRISTO, D. P.; FACHINELLI, R.; GUIMARÃES, A. G. *Azospirillum brasilense* in corn grown single and intercropped with *Urochloa* in two contrasting soils. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** [online]. 2022, v. 5. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2022.v57.02729>>. Acesso em> 10 de ago. 2022
- PÉREZ-LÓPEZ, M.; FLORES-CRUZ, M.; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M.; HERNÁNDEZ, R. M. S.; GARCÍA-CONTRERAS, R.; PADILLA-CHACÓN, D.; CASTILLO-JUÁREZ, I. Anti-virulence activities of some *Tillandsia* species (*Bromeliaceae*). **Botanical Sciences**, v. 98, n. 1, p. 117-127, 2020.
- QUISEN, R. C.; ANGELO, P. C. S. **Manual de Procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental**. Manaus - AM: Embrapa Amazônia Ocidental, 2008. 48p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos, 61).
- REINHARDT, D. H. R. C.; BARTHOLOMEW, D. P.; SOUZA, F. V. D.; CARVALHO, A. C. P. P. de; PÁDUA, T. R. P. de; JUNGHANS, D. T.; MATOS, A. P. de. Advances in pineapple plant propagation. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, n. 6, 2018.
- SANTANA, L. L. A.; REINHARDT, D. H.; CUNHA, G. A. P.; CALDAS, R. C. Altas densidades de plantio na cultura do abacaxi cv. Smooth Cayenne, sob condições de sequeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 2, p. 353-358, 2001.
- SOUZA, C. R. S.; BARBOSA, A. C. O.; FERREIRA, C. F.; SOUZA, F. V. D.; ROCHA, L. S.; SOUZA, E. H. de; OLIVEIRA, S. A. S. de. Diversity of microorganisms associated to *Ananas* spp. from natural environment, cultivated and *ex situ* conservation areas. **Scientia Horticulturae**, v. 243, p. 544-551, 2019.
- SOUZA, C. P. F. **Estudo do microbioma associado ao gênero *Ananas***. 2021. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2021.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

VERZIGNASSI, J. R.; SANTOS, M. F.; MATOS, A. P. de; BENCHIMOL, R. L.; POLTRONIERI, L. S.; JESUS, A. L. e; SILVA, D. E. M. da. **Fusariose do Abacaxizeiro no Pará**. Belém – PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2006. 3p. (Embrapa Amazônia Oriental. Comunicado Técnico, 185).

VIANA, E. S.; SASAKI, F. F. C.; REIS, R. C.; JUNGHANS, D. T.; GUEDES, I. S. A.; SOUZA, E. G. Quality of fusariosis-resistant pineapple FRF 632, harvested at different maturity stages. **Revista Caatinga**, v. 33, n. 2, p. 541-549, 2020.

VIANA, E. S.; REIS, R. C.; JESUS, J. L. DE; JUNGHANS, D. T.; SOUZA, F. V. D. Caracterização físico-química de novos híbridos de abacaxi resistentes à fusariose. **Ciência Rural** [online], v. 43, n. 7, pp. 1155-1161, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0103-84782013005000075>>. Acesso em: 20 jul. 2022.

VILAPLANA, R.; PÉREZ-REVELO, K.; VALENCIA-CHAMORRO, S. Essential oils as an alternative postharvest treatment to control fusariosis, caused by *Fusarium verticillioides*, in fresh pineapples (*Ananas comosus*). **Scientia Horticulturae**, v. 238, p. 255-263, 2018.

WALI, N. Abacaxi (*Ananas comosus*). **Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements**. p. 367-373, 2019. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-812491-8.00050-3>>. Acesso em: 15 jun. 2022.

ZIZKA, A.; AZEVEDO, J.; LEME, E.; NEVES, B.; COSTA, A. F. da; CACERES, D.; ZIZKA, G. Biogeography and conservation status of the pineapple family (*Bromeliaceae*). **Diversity and Distributions**, v. 26, n. 2, p. 183-195, 2019.



## CAPÍTULO 1

### Potencial de isolados bacterianos do microbioma funcional de *Ananas* spp. na promoção de crescimento de mudas de abacaxizeiro cv. 'BRS Imperial'

#### Resumo

Desenvolvido pela Embrapa Mandioca e Fruticultura, o abacaxizeiro cv. 'BRS Imperial' tem demonstrado excelente aceitação no mercado. No entanto, as plantas apresentam crescimento lento, dificultando sua adoção e produção em larga escala. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi identificar bactérias provenientes do microbioma de *Ananas* spp. com capacidade para promoção de crescimento de abacaxizeiros em diferentes etapas de cultivo (*in vitro*, em casa de vegetação e em vasos), visando reduzir o tempo de produção das mesmas. Para a fase de cultivo *in vitro*, mudas de abacaxi cv. 'BRS Imperial' foram inseridas em tubos de ensaio contendo substrato comercial autoclavado e foram preparadas suspensões compostas por bactérias provenientes do microbioma de *Ananas* spp. ajustadas a uma concentração de  $1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias (UFC.mL<sup>-1</sup>) que foram aplicadas no substrato. As avaliações ocorreram semanalmente durante 42 dias, sendo as variáveis analisadas altura da planta, número de folhas e vigor. Ao final desse período, foram realizadas análises destrutivas de uma parcela das plantas, para mensuração do diâmetro do caule e massa fresca e seca da raiz e da parte aérea. As demais plantas foram conduzidas à casa de vegetação, as quais foram avaliadas nesta etapa até a finalização da aclimatização. Em paralelo, um novo ensaio foi implantado com base na microbiolização das plantas já na fase de casa de vegetação, seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente. Ao final da fase de aclimatização (casa de vegetação) foram realizadas análises destrutivas para todos os ensaios, visando a avaliação dos diferentes parâmetros de crescimento. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. De acordo com os resultados, foi possível constatar que os tratamentos BAC406 e BAC222 promoveram incremento para todas as variáveis analisadas, para a fase *in vitro* e para o cultivo em vasos. Já para a aplicação dos microrganismos em casa de vegetação, o tratamento BAC222 se mostrou o mais efetivo.

**Palavras-chave:** *Abacaxizeiro, Bactérias benéficas, Microbiolização, Microbioma.*

## Potential of bacterial isolates from the functional microbiome of *Ananas* spp. in promoting the growth of pineapple seedlings cv. 'BRS Imperial'

### Abstract

Developed by Embrapa Mandioca e Fruticultura, the pineapple cv. 'BRS Imperial' has shown excellent acceptance in the market. However, the plants have slow growth, making their adoption and production on a large scale difficult. Therefore, the objective of this work was to identify bacteria from the microbiome of *Ananas* spp. capable of promoting the growth of pineapple trees at different stages of cultivation (*in vitro*, in a greenhouse and in pots), in order to reduce their production time. For the *in vitro* cultivation phase, pineapple seedlings cv. 'BRS Imperial' were inserted into test tubes containing autoclaved commercial substrate and suspensions composed of bacteria from the microbiome of *Ananas* spp. adjusted to a concentration of  $1.5 \times 10^8$  colony forming units (CFU.mL<sup>-1</sup>) that were applied to the substrate. The evaluations took place weekly for 42 days, and the variables analyzed were plant height, number of leaves and vigour. At the end of this period, destructive analyzes of a portion of the plants were carried out to measure the stem diameter and fresh and dry mass of the root and shoot. The other plants were taken to the greenhouse, which were evaluated at this stage until the completion of acclimatization. In parallel, a new test was implemented based on the microbiolization of plants already in the greenhouse phase, following the same methodology described above. At the end of the acclimatization phase (greenhouse) destructive analyzes were carried out for all tests, aiming to evaluate the different growth parameters. The data obtained were subjected to analysis of variance and the means were grouped by the Scott-Knott test at 5% probability. According to the results, it was possible to verify that the BAC406 and BAC222 treatments promoted an increment for all the analyzed variables, for the *in vitro* phase and for the cultivation in vases. As for the application of microorganisms in a greenhouse, the BAC222 treatment proved to be the most effective.

**Keywords:** *Pineapple, Beneficial bacteria, Microbiolization, Microbiome.*

## 1. INTRODUÇÃO

O abacaxi é uma das frutas mais produzidas no Brasil, sendo responsável por cerca de 8% da produção nacional. Cultivado em diversos locais do país, atingiu uma produção de mais de 3,4 milhões de toneladas em 2020, segundo o Departamento de Economia Rural (DERAL, 2020).

A fruta pode ser cultivada tanto em produções comerciais como domésticas, e pode ser utilizado na produção de sucos e licores, e seus resíduos, na fabricação de ração animal (BARROS et al., 2020). No entanto, apesar desta vasta gama de utilidades, a produção de abacaxi pode apresentar grandes perdas em função de doenças, como a fusariose.

Tendo em vista a diminuição da incidência da doença e consequente perda na produção, a Embrapa Mandioca e Fruticultura lançou uma cultivar resistente denominada 'BRS Imperial'. No entanto, a cultivar apresenta crescimento lento (CABRAL e MATOS, 2009).

Visando a redução destes impactos, trabalhos recentes têm demonstrado o potencial de diferentes microrganismos provenientes do microbioma associado de plantas na promoção de crescimento vegetal. Como a capacidade de liberar substâncias na rizosfera da planta, que pode auxiliar no desenvolvimento vegetativo das mesmas e ainda conferir proteção contra organismos patogênicos que tenham as raízes como principal porta de entrada (SPOLAOR *et al.*, 2016; FERREIRA e BETTIOL, 2019; ALDONATE; JIMÉNEZ; ULLA, 2019; ESPINOZA; GASTÉLUM; RAMÍREZ, 2020).

Além disso, essas substâncias podem levar à indução da produção de reguladores vegetais que possuem importantes papéis no crescimento e diferenciação celular dos tecidos vegetais, podendo vir a proporcionar incremento em diversos parâmetros fisiológicos da planta, como altura, número de folhas, número de raízes e aumento da massa fresca e seca tanto da parte aérea quanto do sistema radicular (DOMINGUES *et al.*, 2020).

Conhecidos como promotores de crescimento vegetal, estes microrganismos constituem uma alternativa de baixo custo, no que se refere ao aumento de produtividade por hectare (BALBINOT; RODRIGUES; BOTELHO, 2020).

Diante disso, o objetivo no trabalho foi avaliar o potencial de promoção de crescimento de isolados bacterianos associados ao microbioma de *Ananas* spp., em mudas de abacaxizeiro 'BRS Imperial' em diferentes fases de cultivo por meio da avaliação de parâmetros de crescimento, visando redução do tempo de produção e de aclimatização e aumento de vigor.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Para validação do sistema de produção de mudas de abacaxi cv. 'BRS Imperial' microbiolizadas com bactérias associadas ao microbioma do gênero *Ananas*, foram avaliadas duas etapas de produção de mudas: *in vitro* e em casa de vegetação em diferentes ensaios.

As mudas utilizadas apresentavam uniformidade de idade e tamanho, e todas as etapas foram realizadas na Embrapa Mandioca e Fruticultura da cidade de Cruz das Almas.

O município está situado à 12°40'19" de Latitude Sul e 39°06'22" de Longitude Oeste de Greenwich, com elevação de 220 m acima do nível do mar e possui clima tropical quente e úmido, segundo a classificação de Köppen (1936), além de apresentar precipitação e temperatura média anuais de 1.249,7 mm e 24,5°C, respectivamente.

### 2.1. Avaliação do potencial de promoção de crescimento de isolados bacterianos

Este experimento é uma continuação das pesquisas desenvolvidas por Souza *et al.* (2019), e Souza (2021). Inicialmente foram identificados os microrganismos benéficos cultiváveis associados a *Ananas* spp. a partir da coleta de amostras de solo rizoplano, solo rizosférico e de pequenos fragmentos de raízes, caules, bainhas e folhas de abacaxizeiros provenientes de ambiente natural, de conservação *ex situ* (Banco Ativo de Germoplasma) e de cultivo comercial, nos estados da Bahia, Mato Grosso e Rondônia.

Foi realizada a quantificação do microbioma existente, e a partir da identificação à nível de gênero, foram testados tratamentos compostos por diferentes microrganismos em condições de cultivo *in vitro*.

Após avaliações, foram ranqueados os melhores tratamentos e foram selecionados 19 isolados bacterianos para experimentação de cultivo em vasos e avaliação do potencial de crescimento individual destes isolados.

Para tanto, mudas de abacaxizeiro 'BRS Imperial' foram transplantadas para vasos plásticos preenchidos com solo e substrato comercial Maxfertil na proporção 1:1 e 30 dias após o transplante, as suspensões bacterianas foram adicionadas ao substrato.

As suspensões foram preparadas a partir da reativação dos isolados, retirando-se uma alíquota de 100 µL de cada amostra mantida em estoque de glicerol a 30%, armazenadas em freezer a -20 °C.

À estas amostras individuais, foram adicionados 50 mL de caldo nutriente (preparado a partir de 1.000 mL de água destilada, 1,5 g de extrato de carne, 1,5 g de extrato de levedura, 5 g de NaCl e 5 g de peptona) que foram transferidos para Erlenmeyers com capacidade para 250 mL. Estes, foram vedados e levados à mesa agitadora para crescimento das colônias bacterianas sob agitação constante de 100 RPM por 24h, à temperatura ambiente.

Após o período de crescimento, a partir da adição de MgCl<sub>2</sub> a 10 Mm, cada suspensão obtida teve seu valor de absorvância ajustado para uma densidade ótica de (D.O.<sub>540</sub> = 1), que corresponde a 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>.

Para aplicação dos microrganismos, foram preparados 400 ml de cada suspensão bacteriana adicionando-se 3,6 L de MgCl<sub>2</sub> a 10 Mm, totalizando 4,0 L de cada tratamento. As suspensões foram então aplicadas no solo, onde foram inseridos 250 ml das mesmas, de acordo com os respectivos tratamentos.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído por 19 tratamentos, descritos na Tabela 1, sendo 18 isolados bacterianos e o CONTROLE, composto por plantas não tratadas, com 15 repetições cada, totalizando 285 unidades experimentais.

**Tabela 1.** Descrição dos isolados utilizados na condução do experimento.

<b>Tratamentos</b>	<b>Ambiente de colonização e origem</b>	<b>Identificação taxonômica a nível de gênero</b>
BAC25	Bactérias endofíticas de caule de ambiente de cultivo comercial	<i>Acinetobacter</i>
BAC26		-
BAC210		-
BAC219		<i>Enterobacter</i>
BAC267		<i>Acinetobacter</i>
BAC272		<i>Acinetobacter</i>
BAC298		<i>Citrobacter</i>
BAC381		<i>Acinetobacter</i>
BAC388		-
BAC406		<i>Acinetobacter</i>
BAC40	Bactérias de solo de ambiente de cultivo comercial	<i>Exiguobacterium</i>
BAC47		<i>Arthrobacter</i>
BAC54		<i>Acinetobacter</i>
BAC222		-
BAC223		<i>Bacillus spp.</i>
BAC226		<i>Enterobacter</i>
BAC400	--	
BAC45	Bactérias de solo de ambiente natural	<i>Acinetobacter</i>
CONTROLE	-----	-----

Fonte: Adaptado de Souza, 2021.

As plantas foram mantidas nos vasos ao ar livre durante o período de avaliações e o efeito de promoção de crescimento foi mensurado por meio da avaliação dos parâmetros de crescimento: altura da planta, diâmetro da roseta, número de folhas e comprimento e largura da folha 'D'.

Ao final deste período foram retiradas três plantas de cada tratamento para realização das avaliações destrutivas para mensuração da massa fresca e seca da raiz e da parte aérea (MFR, MSR, MFPA e MSPA, respectivamente) (mg), a partir da pesagem em balança de precisão do material fresco (mg) e posterior secagem em estufa de ventilação forçada a 60°C por 5 dias, seguida da pesagem do material seco para mensuração da massa da raiz e da parte aérea.

## 2.2. Validação de um sistema de produção *in vitro* de mudas de abacaxizeiro cv. 'BRS Imperial', a partir do processo de microbiolização

Para montagem do experimento, 600 mudas de abacaxizeiro cv. 'BRS Imperial', foram produzidas no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) da Embrapa Mandioca e Fruticultura.

Posteriormente, foram preparadas suspensões bacterianas a partir da reativação dos isolados, retirando-se uma alíquota de 100 µL de cada amostra mantida em estoque de glicerol a 30%, armazenadas em freezer a -20 °C.

À estas amostras individuais, foram adicionados 50 mL de caldo nutriente que foram transferidos para Erlenmeyers com capacidade para 250 mL. Estes, foram vedados e levados à mesa agitadora para crescimento das colônias bacterianas sob agitação constante de 100 RPM por 24h, à temperatura ambiente.

Após o período de crescimento, a partir da adição de MgCl<sub>2</sub> a 10 Mm, cada suspensão obtida teve seu valor de absorvância ajustado para uma densidade ótica de (D.O.<sub>540</sub> = 0,7), que corresponde a 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>.

As suspensões finais foram então preparadas a partir de 30 mL de cada suspensão ajustada anteriormente, às quais foram adicionados 270 mL de água destilada, totalizando 300 mL de cada tratamento.

Concomitantemente, foi realizada a autoclavagem de 6kg de substrato comercial Maxfertil durante 30 minutos, por duas vezes seguidas. Posteriormente, foram adicionados 10 g deste substrato, além de 4 mL de meio MS (MURASHIGE e SCOOG, 1962) sem sacarose, suplementado com BAP 0,20 mg/L<sup>-1</sup> a tubos de ensaio previamente autoclavados, que foram vedados com filme plástico PVC e novamente autoclavados por 20 minutos.

Em seguida, a cada tubo de ensaio foi aplicado diretamente no substrato 1 mL de cada suspensão bacteriana de acordo com os respectivos tratamentos.

Após três dias, as mudas de abacaxi cv. 'BRS Imperial' foram inseridas nos tubos que foram novamente vedados e as plantas foram mantidas em condição de cultivo *in vitro*.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído por 5 tratamentos, sendo os 3 isolados que apresentaram melhor desempenho na etapa

anterior: BAC25 (*Acinetobacter* sp.), BAC222 (não identificado), e BAC406 (*Acinetobacter calcoaceticus*), além de um MIX composto pela junção destes três isolados e o CONTROLE, composto por plantas não tratadas.

Cada tratamento foi composto por 120 repetições, totalizando 600 unidades experimentais, como mostra a Figura 1.

**Figura 1.** (A) Montagem do experimento. (B) Cultivo *in vitro* de mudas de abacaxi cv. 'BRS Imperial' microbiolizadas.



Fonte: Polyana Silva

O efeito da promoção de crescimento foi mensurado por meio da avaliação dos parâmetros de crescimento altura da planta (ALT) (cm) e número de folhas (NF), com auxílio de uma régua, e pela avaliação do vigor das plantas que foi mensurado a partir de uma escala de atribuição de notas que variaram de 0 a 4, onde:

- 0= Folhas e brotos totalmente mortos;
- 1= Morte de mais de 50% das folhas e brotos;
- 2= Morte de 30-50% das folhas e brotos;
- 3= Início do secamento e morte das folhas;
- 4= Folhas totalmente verdes.

A avaliação se deu a cada 7 dias, durante 42 dias. Após este período, foram retiradas 10 plantas de cada tratamento, para realização das avaliações destrutivas de mensuração do diâmetro do caule (DIAMC) (mm) e de massa fresca e seca da raiz e da parte aérea (MFR, MSR, MFPA e MSPA, respectivamente) (mg). Para tanto, foi realizada a pesagem em balança de precisão do material fresco e posterior secagem em estufa de ventilação forçada a 60°C por 72h, seguida da pesagem do material seco.



As demais mudas foram transplantadas para copos plásticos com capacidade para 300 mL, nos quais, as mesmas foram introduzidas juntamente com seu substrato e ocorreu o preenchimento do volume restante com o substrato comercial Maxfertil.

As plantas foram conduzidas à casa de vegetação para aclimatização e foram avaliadas a cada 15 dias, durante 150 dias, as variáveis: altura da planta (ALT) (cm), diâmetro da roseta (DIAMR) (cm) e número de folhas (NF).

Após este período, também foram retiradas 10 plantas de cada tratamento e se deu a realização das avaliações destrutivas de mensuração da massa fresca e seca da raiz e da parte aérea (MFR, MSR, MFPA e MSPA, respectivamente) (mg), como descrito anteriormente.

Já para os dados referentes ao vigor, foi calculado o Índice de Vigor das plantas a partir da fórmula de McKinney (1923):

$$IV = \left[ \frac{\sum(\text{grau da escala} * \text{frequência})}{\text{número total de unidades} * \text{grau máximo da escala}} \right] * 100$$

### **2.3. Validação de um sistema de produção de mudas de abacaxi cv. 'BRS Imperial' em casa de vegetação**

Para montagem do experimento, 1.000 mudas de abacaxizeiro cv. 'BRS Imperial' foram produzidas no LCTV da Embrapa Mandioca e Fruticultura. As mesmas foram transplantadas para copos plásticos com capacidade para 300 mL preenchidos com substrato comercial Maxfertil, e 15 dias após o transplante, foi realizada a aplicação das suspensões bacterianas no substrato.

Para tanto, como descrito anteriormente, foi realizada a reativação dos isolados bacterianos, e após o período de crescimento, cada suspensão também teve seu valor de absorvância ajustado para uma densidade ótica de (D.O.<sub>540</sub> = 0,7), que corresponde a 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>.

As suspensões finais foram então preparadas a partir de 200 mL de cada suspensão bacteriana ajustada, às quais foram adicionados 1,8 L de água destilada, totalizando 2 L de cada tratamento.

Estas soluções foram então aplicadas nos substratos de acordo com os respectivos tratamentos, onde foram inseridos 10 mL de cada suspensão bacteriana, como mostra a Figura 2.

**Figura 2.** (A) Microbiolização. (B) Mudas microbiolizadas de abacaxi cv. 'BRS Imperial' em casa de vegetação.



Fonte: Polyana Silva

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído por 5 tratamentos, sendo: BAC25 (*Acinetobacter* sp.), BAC222 (não identificado), e BAC406 (*Acinetobacter calcoaceticus*), além de um MIX composto pela junção destes três isolados e o CONTROLE, composto por plantas não tratadas, com 200 repetições cada, totalizando 1.000 unidades experimentais.

O efeito da promoção de crescimento foi mensurado pela avaliação dos parâmetros de crescimento: altura da planta (ALT) (cm), diâmetro da roseta (DIAMR) (cm), número de folhas (NF) e comprimento e largura da folha 'D' (CFD e LFD, respectivamente) (cm), com auxílio de uma régua.

A avaliação se deu a cada 15 dias, durante 150 dias. Após este período, foram retiradas 10 plantas de cada tratamento, para realização das avaliações destrutivas para mensuração da massa fresca e seca da raiz e da parte aérea (MFR, MSR, MFPA e MSPA, respectivamente) (mg).

Para tanto, foi realizada a pesagem em balança de precisão do material fresco e posterior secagem em estufa de ventilação forçada a 60°C por 72h seguida da pesagem do material seco.

## 2.4. Análises estatísticas

Devido os dados de altura (ALT), diâmetro da roseta (DIAMR), número de folhas (NF), comprimento da folha 'D' (CFD), largura da folha 'D' (LFD) e vigor terem sido obtidos periodicamente, foi calculada a área abaixo da curva de progresso (AACP) para estas variáveis de acordo com a fórmula adaptada de Campbell e Madden (1990):

$$AACP = \sum \left[ \left( \frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) * (t_{i+1} - t_i) \right]$$

Onde:  $y_i$  é o valor mensurado para a variável de interesse na observação  $i$ ; e  $y_{i+1}$   $y_i$  é o valor mensurado para a variável de interesse na observação subsequente  $i+1$ ; enquanto  $t_{i+1}$  é o tempo (dias) na avaliação subsequente  $i+1$ ; e  $t_i$  é o tempo (dias) no momento da observação  $i$ .

Todos os dados gerados foram submetidos à análise de variância e as médias foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, com o programa estatístico R (R Development Core Team, 2017). As médias não agrupadas pelo teste Scott-Knott, mas distantes entre si, foram testadas par-a-par quando às diferenças pelo teste 't' par a par.

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Avaliação do potencial de promoção de crescimento de isolados bacterianos

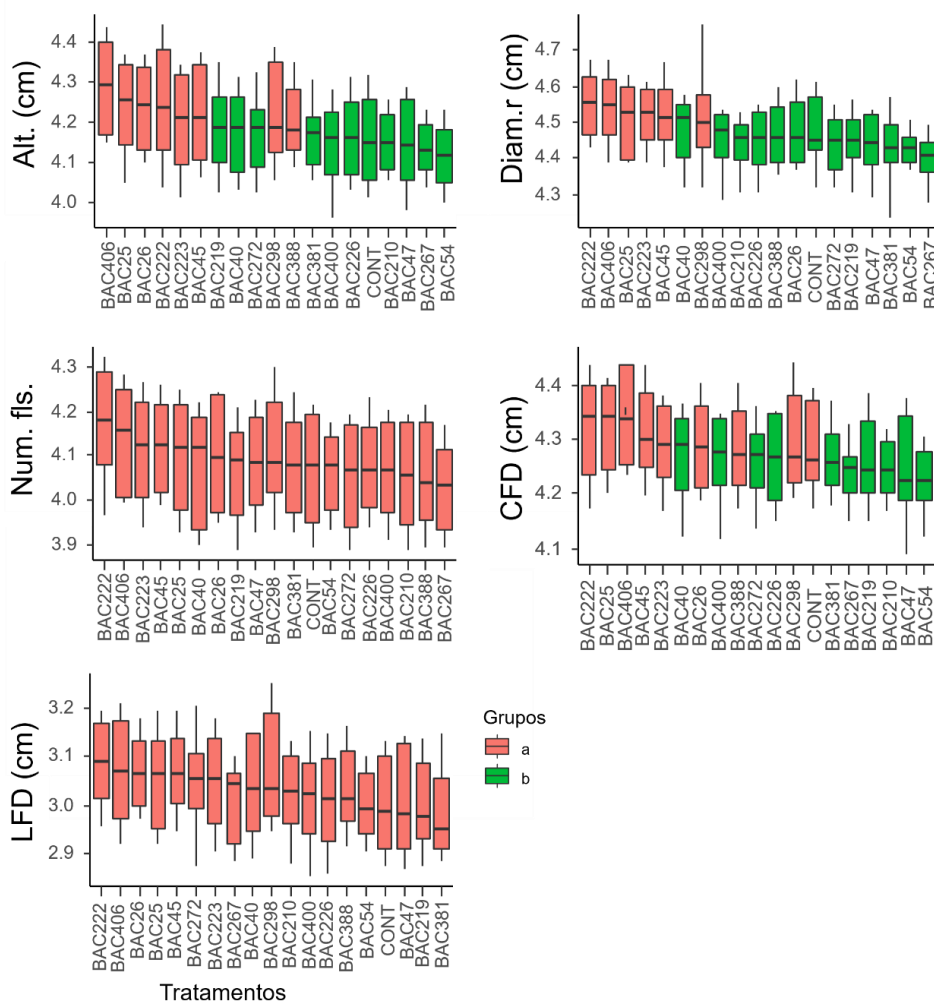
No presente estudo foram avaliados diferentes parâmetros de crescimento vegetal ao longo do tempo e foi calculada a área abaixo da curva de progresso para identificação dos isolados que apresentassem melhor desempenho no que se refere à promoção de crescimento de abacaxizeiro cv. 'BRS Imperial'.

Os resultados demonstram que para a variável altura (Figura 3), os tratamentos BAC406, BAC25, BAC26, BAC222, BAC223, BAC45, BAC298 e BAC388 foram os que apresentaram maior incremento na variável analisada. Os

demais tratamentos, não diferiram significativamente do CONTROLE. Para a variável diâmetro da roseta (Figura 3), os tratamentos BAC222, BAC406, BAC25, BAC223, BAC45 e BAC295 foram capazes de promover incremento para a variável analisada, quando comparados ao CONTROLE.

No que se refere ao comprimento da folha 'D' (Figura 3), os tratamentos BAC222, BAC25, BAC406, BAC45, BAC223, BAC26, BAC388 e BAC298 não diferiram significativamente do CONTROLE. Os demais tratamentos causaram redução da variável. Quanto à largura da folha 'D' e ao número de folhas (Figura 3), é possível observar que não houve incremento, uma vez que não foi evidenciada diferença significativa entre os tratamentos.

**Figura 3.** Boxplot representativo para a área abaixo da curva de progresso para as variáveis: Altura (Alt.); Diâmetro da roseta (Diam.r); Número de folhas (Num. fls); Comprimento da folha 'D' (CFD) e Largura da folha 'D' (LFD) em função dos tratamentos, para mudas microbiolizadas de abacaxizeiros cv. 'BRS Imperial' cultivadas em vasos.



Para a massa fresca da parte aérea (Figura 4), os tratamentos que se mostraram mais promissores para ganho de massa foram BAC406, BAC222, BAC26, BAC298 e BAC223, seguidos dos tratamentos BAC45, BAC25 e BAC40, que apesar de exibirem menores médias, ainda foram capazes de diferir significativamente do CONTROLE e dos demais tratamentos.

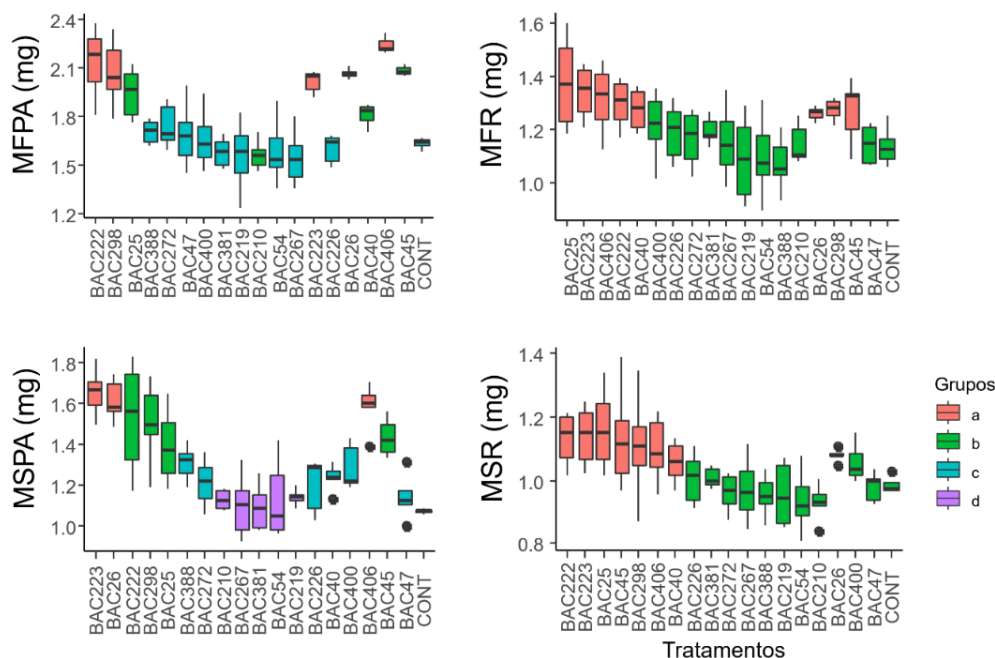
No que se refere à massa seca da parte aérea (Figura 4), os tratamentos BAC223, BAC406, BAC26, foram os responsáveis por um maior incremento para a variável analisada. Os tratamentos BAC222, BAC298, BAC45 e BAC25, apresentaram menores médias, no entanto também proporcionaram ganho de massa.

Os tratamentos BAC400, BAC388, BAC40, BAC226, BAC47, e BAC272 também foram capazes de gerar incremento para a variável analisada, quando comparados ao CONTROLE. Os demais tratamentos não diferiram significativamente do CONTROLE.

Em relação à massa fresca da raiz (Figura 4), os tratamentos BAC25, BAC223, BAC45, BAC406, BAC222, BAC40, BAC298 e BAC26 exibiram um maior ganho de massa, quando comparados ao CONTROLE.

Os demais tratamentos não foram capazes de promover um incremento para a variável, uma vez que não diferiram significativamente do CONTROLE. Quanto à massa seca da raiz (Figura 4), os tratamentos BAC25, BAC223, BAC222, BAC45, BAC298, BAC406, BAC26 e BAC40 foram os que apresentaram melhores resultados, enquanto os demais tratamentos não diferiram significativamente do CONTROLE.

**Figura 4.** Boxplot representativo das variáveis: Massa fresca da parte aérea (MFPA); Massa fresca da raiz (MFR), Massa seca da parte aérea (MSPA); Massa seca da raiz (MSR), em função dos tratamentos, para mudas microbiolizadas de abacaxizeiros cv. 'BRS Imperial' cultivadas em vasos.



Os resultados também mostram que não foi identificada nenhuma correlação negativa entre as variáveis analisadas (Figura 5.a), sendo identificadas correlações positivas e significativas entre a altura da planta e: comprimento da folha 'D' (0,96,  $p < 0,001$ ), diâmetro da roseta (0,93,  $p < 0,001$ ), largura da folha 'D' (0,88,  $p < 0,001$ ), número de folhas (0,93,  $p < 0,001$ ), e massa fresca da parte aérea (0,35,  $p < 0,001$ ). Também foram encontradas correlações positivas e significativas entre a massa seca da parte aérea e a massa fresca e seca da raiz (0,31,  $p < 0,01$ ), (0,25,  $p < 0,01$ ), (0,27,  $p < 0,01$ ), respectivamente.

Para o diâmetro da roseta foram encontradas correlações positivas e significativas ( $p < 0,001$ ), para todas as variáveis analisadas. Enquanto que para o número de folhas, foram encontradas correlações significativas com o comprimento e a largura da folha 'D' ( $p < 0,001$ ). Bem como entre a variável e a massa fresca da parte aérea e massa seca da raiz (0,28,  $p < 0,01$ ), (0,26,  $p < 0,01$ ), respectivamente, e em menor grau com a massa fresca da raiz e seca da parte aérea, (0,25,  $p < 0,05$ ), (0,23,  $p < 0,05$ ), respectivamente.

O comprimento da folha 'D' apresentou correlações positivas e altamente significativas com a largura da folha 'D' e massa fresca da parte aérea (0,88,  $p < 0,001$ ), (0,34,  $p < 0,001$ ), respectivamente. Houve uma correlação em menor grau com as demais variáveis.

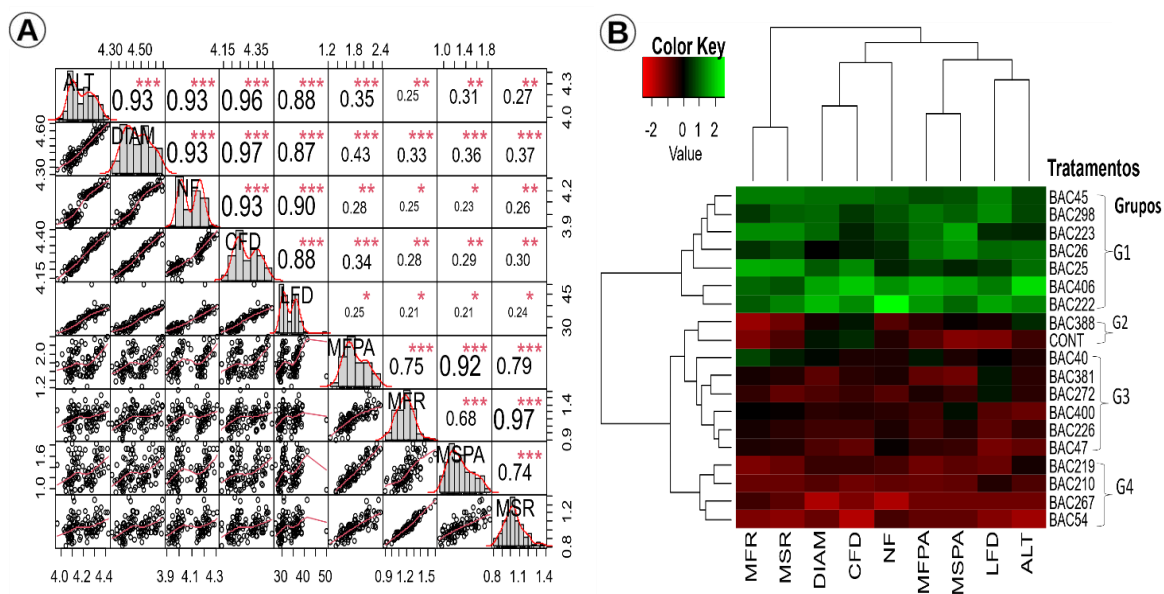
A largura da folha 'D' foi correlacionada significativamente com as demais ( $p < 0,05$ ). E as massas fresca e seca, tanto da parte aérea quanto das raízes, apresentaram correlações altamente significativas entre si ( $p < 0,001$ ).

Após a construção do heatmap (Figura 5.b), foi possível observar a formação de quatro grupos de acordo com as variáveis analisadas. O G1 foi formado pelos tratamentos BAC45, BAC298, BAC223, BAC26, BAC25, BAC406 e BAC222, que exibiram melhor desempenho, sendo capazes de promover incremento para a maioria das variáveis analisadas.

O G2 foi formado pelos tratamentos CONTROLE e BAC388 que não proporcionaram incremento efetivo para as variáveis analisadas.

Os tratamentos pertencentes aos demais grupos causaram redução nos parâmetros de crescimento avaliados.

**Figura 5.** (A.) Correlograma e (B.) Heatmap formados a partir da área abaixo da curva de progresso das variáveis Altura (ALT); Número de folhas (NF); Diâmetro da roseta (DIAM); Comprimento da folha 'D' (CFD); Largura da folha 'D' (LFD); Massa fresca da parte aérea (MFPA); Massa seca da parte aérea (MSPA); Massa fresca da raiz (MFR) e Massa seca da raiz (MSR) para mudas microbiolizadas de abacaxizeiros cv. 'BRS Imperial' cultivadas em vasos.



### **3.2. Validação de um sistema de produção *in vitro* de mudas de abacaxizeiro cv. 'BRS Imperial', a partir do processo de microbiolização**

A partir dos resultados obtidos no experimento anterior, foram selecionados os três tratamentos com melhor desempenho para continuação nos ensaios de avaliação do potencial dos isolados bacterianos como indutores de crescimento para abacaxizeiros, sendo eles: BAC25, BAC222 e BAC406. Além disso, também foi elaborado um MIX, composto pela junção desses três tratamentos, e o CONTROLE, composto por plantas não tratadas.

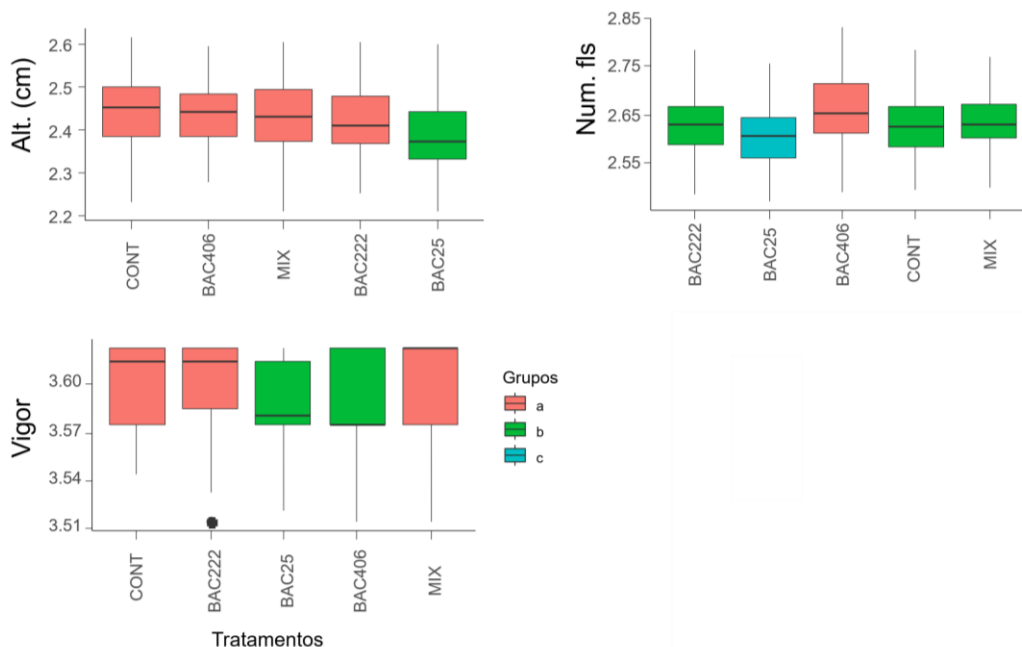
Com base na análise dos dados, foi possível observar que para a variável altura (Figura 6), os resultados apontam que os tratamentos BAC406, BAC222 e MIX não diferiram significativamente do CONTROLE. De maneira que não proporcionaram incremento para a variável analisada. O tratamento BAC25 causou redução para a variável analisada.

No que se refere ao número de folhas (Figura 6), é possível observar que o tratamento BAC406 foi o único que apresentou resultados satisfatórios de promoção para a variável analisada. Os tratamentos BAC222 e MIX não diferiram significativamente do CONTROLE. O tratamento BAC25 causou redução para a variável analisada.

Também foi avaliado o vigor das plantas (Figura 6), e para esta variável o tratamento BAC222 e MIX não diferiram significativamente do CONTROLE. Os demais, tratamentos causaram uma redução no vigor das plantas, que pôde ser observado a partir do secamento e morte de folhas e brotos.



**Figura 6.** Boxplot representativo para a área abaixo da curva de progresso para as variáveis Altura (Alt.); Número de folhas (Num. fls) e Vigor, em função dos tratamentos, para mudas microbiolizadas de abacaxizeiros cv. 'BRS Imperial' cultivadas *in vitro*.



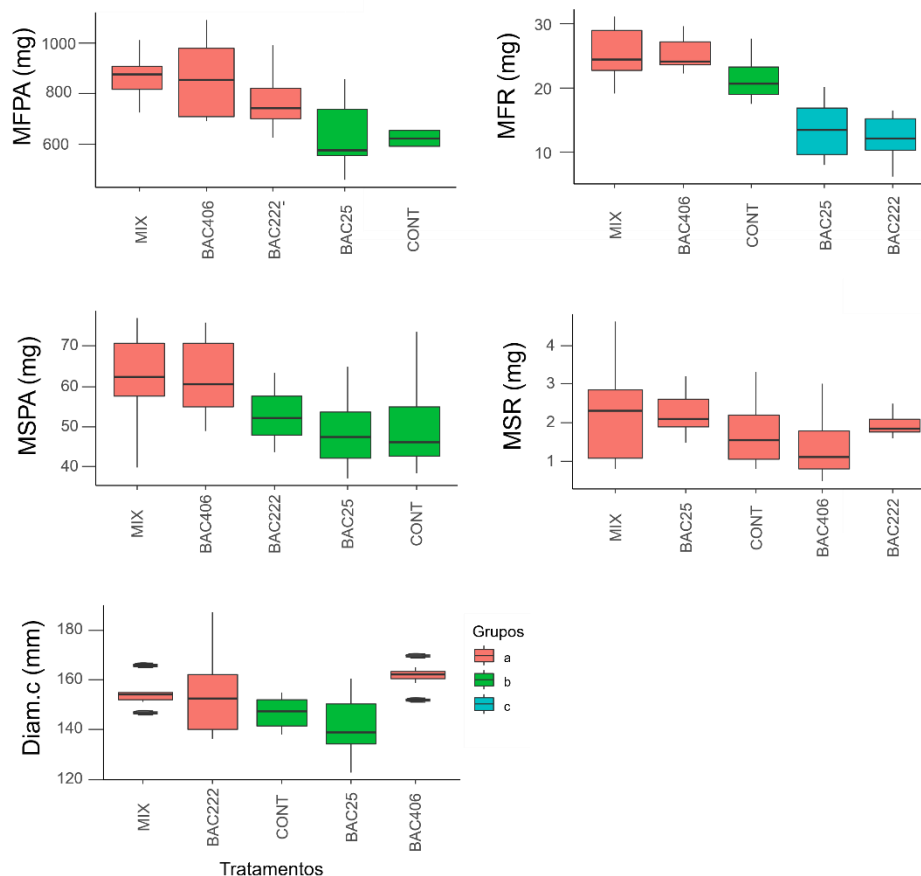
Para a massa fresca da parte aérea (Figura 7) os tratamentos MIX, BAC406 e BAC222 foram capazes de promover ganho de massa. Já o tratamento BAC25 não diferiu significativamente do CONTROLE.

No que se refere à massa fresca da raiz (Figura 7), os tratamentos BAC406 e MIX exibiram melhores resultados de promoção para a variável analisada, quando comparados ao CONTROLE. Já os tratamentos BAC222 e BAC25 causaram redução no peso da massa fresca do sistema radicular.

Para a massa seca da parte aérea (Figura 7), os tratamentos MIX e BAC406 foram capazes de causar aumento para a variável analisada. Os demais tratamentos não diferiram significativamente do CONTROLE.

Para a massa seca da raiz (Figura 7), todos os tratamentos não diferiram significativamente do CONTROLE. Já para o diâmetro do caule (Figura 7) os tratamentos BAC406, MIX e BAC222 causaram aumento para a variável analisada, quando comparados ao CONTROLE.

**Figura 7.** Boxplot representativo das variáveis: Massa fresca da parte aérea (MFPA); Massa fresca da raiz (MFR), Massa seca da parte aérea (MSPA); Massa seca da raiz (MSR); Diâmetro do caule (Diam.c), em função dos tratamentos, para mudas microbiolizadas de abacaxizeiros cv. 'BRS Imperial' cultivadas *in vitro*.



Análises de correlação (Figura 8.a) também foram realizadas, para que fosse possível compreender a relação entre as variáveis analisadas. Através desta análise pôde-se observar que a variável altura está significativamente correlacionada com o vigor das plantas (0,37,  $p < 0,01$ ) e em menor grau com a massa fresca da raiz e com o diâmetro do caule, (0,34,  $p < 0,05$ ), (0,28,  $p < 0,05$ ), respectivamente.

A variável número de folhas apresentou correlação apenas com a massa fresca da raiz (0,32,  $p < 0,05$ ). O vigor foi correlacionado apenas com a massa seca da parte aérea (-0,33,  $p < 0,05$ ), de maneira negativa.

A massa fresca da parte aérea foi correlacionada de maneira significativa com a massa seca da parte aérea (0,93,  $p < 0,001$ ) e com o diâmetro do caule (0,55,  $p < 0,001$ ), e em menor grau com a massa fresca da raiz (0,35,  $p < 0,01$ ).

A massa seca da parte aérea apresentou correlação com o diâmetro do caule (0,54,  $p < 0,001$ ) e com a massa fresca da raiz (0,32,  $p < 0,05$ ).

A massa fresca da raiz exibiu correlação com a massa seca da raiz (0,51,  $p < 0,001$ ). A massa seca da raiz e o diâmetro do caule não apresentaram correlações significativas entre si.

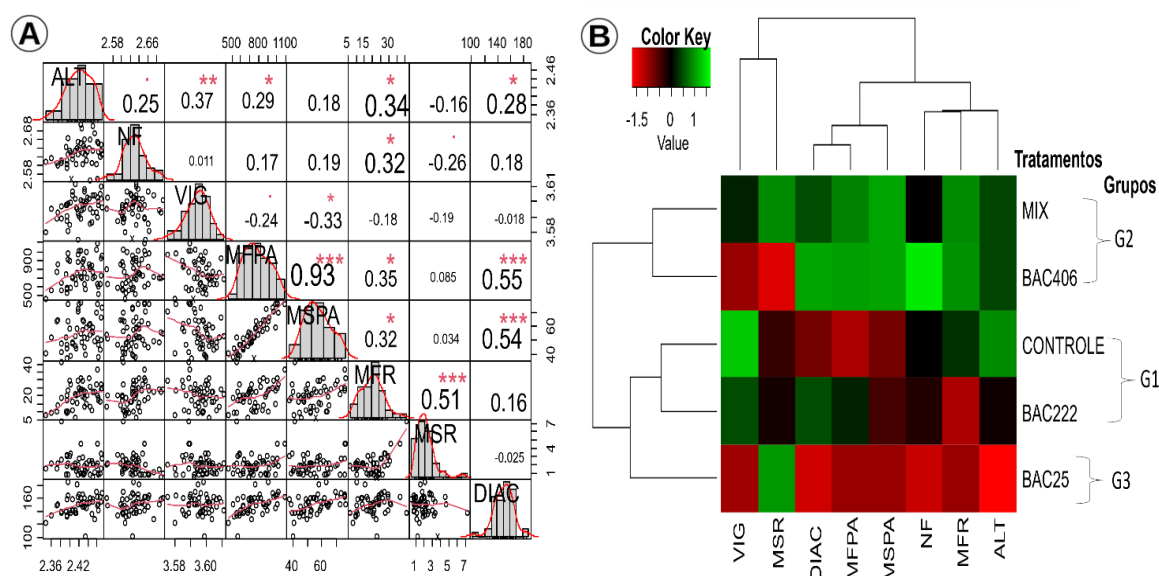
Para uma melhor compreensão dos tratamentos que proporcionaram maiores incrementos para as variáveis analisadas, foi construído um *heatmap* (Figura 8.b), o qual apontou a formação de três grupos.

O G2 foi formado pelos tratamentos BAC406 e MIX, que foram agrupados em função de apresentarem efeito de promoção para a maioria das variáveis analisadas.

O G1 foi formado pelos tratamentos BAC222 e CONTROLE que proporcionaram pouco ou nenhum incremento para as variáveis analisadas.

Já o G3 foi formado pelo tratamento BAC25, que foi o único a causar redução das variáveis analisadas, exceto para a massa seca da raiz.

**Figura 8.** Correlograma (A) e *Heatmap* (B) formados a partir da área abaixo da curva de progresso das variáveis: Altura (ALT); Número de folhas (NF); Vigor (VIG); Massa fresca da parte aérea (MFPA); Massa seca da parte aérea (MSPA); Massa fresca da raiz (MFR); Massa seca da raiz (MSR); Diâmetro do caule (DIAC) para mudas microbiolizadas de abacaxizeiros cv. 'BRS Imperial' cultivadas *in vitro*.

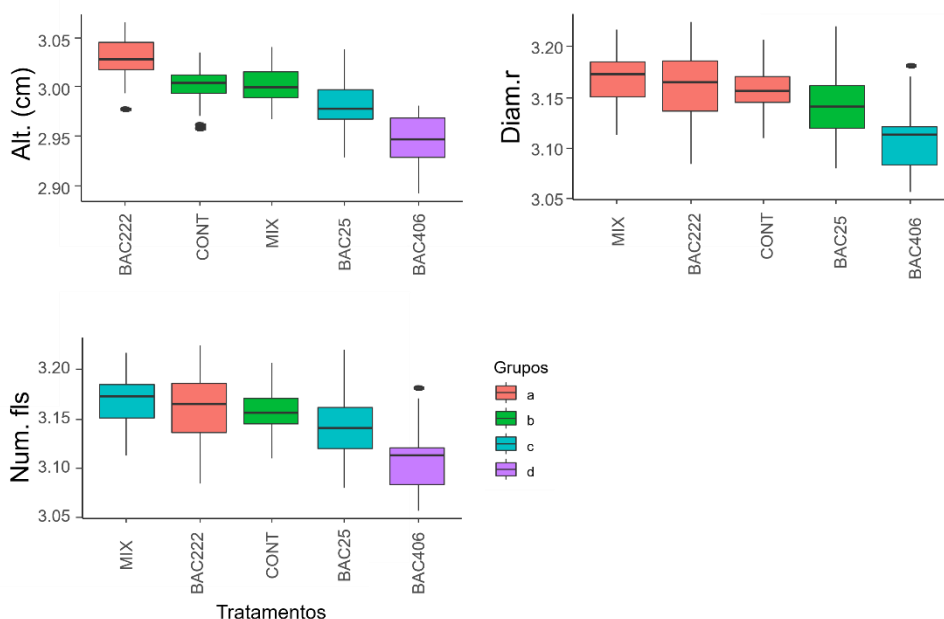


Após a avaliação das plantas na etapa de cultivo *in vitro*, as mesmas foram transportadas para casa de vegetação, onde foram transplantadas para copos plásticos e as avaliações continuaram por mais 150 dias, e de acordo com os resultados das avaliações nesta etapa, também foram construídos boxplots, *heatmap* e correlograma.

Para a variável altura (Figura 9), foi possível observar que após o transplante o único que manteve resultados satisfatórios de promoção de crescimento foi o tratamento BAC222. Enquanto isso, o MIX estabilizou o crescimento das plantas se igualando ao CONTROLE. Os tratamentos BAC25 e BAC406 apresentaram efeitos insatisfatórios, causando redução na variável.

Para a variável diâmetro da roseta (Figura 9), foi possível observar que não houve incremento significativo proporcionado pelos tratamentos BAC222 e MIX, uma vez que ambos não diferiram do CONTROLE. Os tratamentos BAC25 e BAC406 causaram redução para a variável analisada. No que se refere ao número de folhas (Figura 9), o tratamento BAC222 foi o que apresentou melhores resultados de incremento para a variável analisada, quando comparado ao CONTROLE. Os demais tratamentos causaram redução do número de folhas.

**Figura 9.** Boxplot representativo para a área abaixo da curva de progresso para as variáveis Altura (Alt.); Número de folhas (NF); Diâmetro da roseta (Diam.r), em função dos tratamentos, para mudas microbiolizadas de abacaxizeiros cv. 'BRS Imperial' cultivadas *in vitro*, após transplante para casa de vegetação.

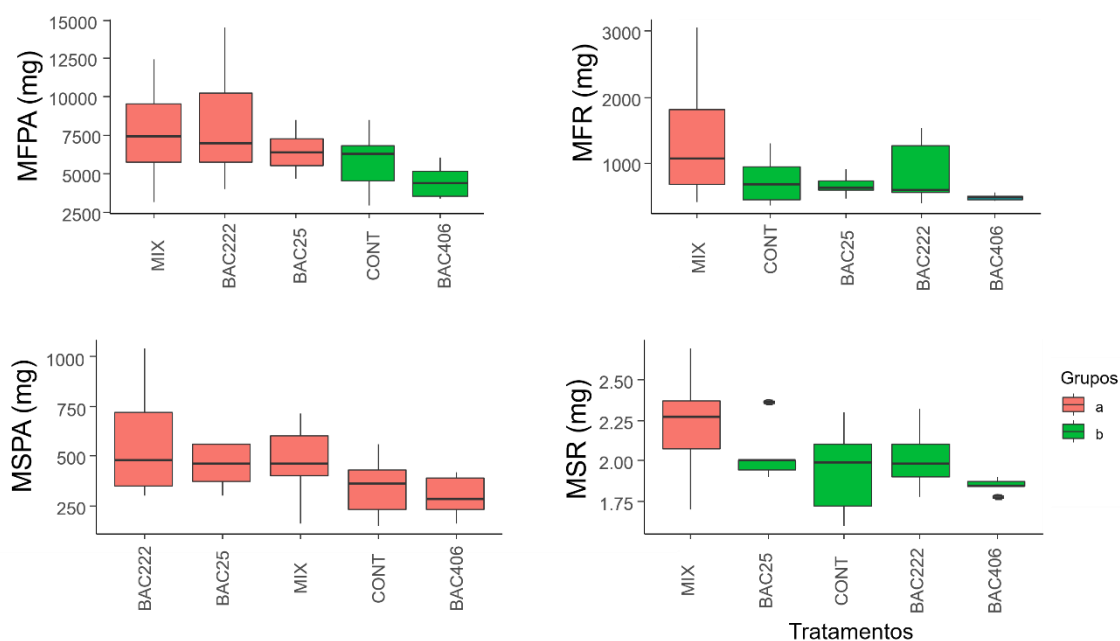


Para massa fresca da parte aérea (Figura 10), os tratamentos MIX, BAC222 e BAC25 promoveram aumento na variável analisada após as plantas serem conduzidas à casa de vegetação.

No que se refere à massa fresca da raiz (Figura 10), o MIX se mostrou o tratamento mais promissor, enquanto que os demais tratamentos não diferiram significativamente do CONTROLE. O mesmo foi observado para a massa seca da raiz (Figura 10).

Para a massa seca da parte aérea (Figura 10), não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos.

**Figura 10.** Boxplot representativo das variáveis: Massa fresca da parte aérea (MFPA); Massa fresca da raiz (MFR), Massa seca da parte aérea (MSPA); Massa seca da raiz (MSR), em função dos tratamentos, para mudas microbiolizadas de abacaxizeiros cv. 'BRS Imperial' cultivadas *in vitro*, após transplante para casa de vegetação.



As análises de correlação (Figura 11.a) realizadas para avaliação do grau de influência entre as variáveis após as mudas serem conduzidas a casa de vegetação, demonstraram que a variável altura está altamente correlacionada com o diâmetro da roseta (0,73,  $p < 0,001$ ) e com o número de folhas (0,81,  $p < 0,001$ ). A variável também possui correlações positivas e significativas com a massa fresca da parte aérea (0,39,  $p < 0,01$ ), e com a massa seca da parte aérea (0,31,  $p < 0,05$ ).

De acordo com os resultados, também é possível observar que o diâmetro da roseta possui correlações positivas com o número de folhas (0,53,  $p < 0,001$ ), e baixas correlações foram encontradas entre a variável e a massa fresca e seca da raiz (0,33,  $p < 0,05$ ), (0,37,  $p < 0,05$ ), respectivamente.

A variável número de folhas possui uma baixa correlação positiva com a massa fresca e seca da parte aérea (0,35,  $p < 0,05$ ). A massa fresca da parte aérea está correlacionada de maneira altamente significativa com a massa seca da parte aérea e com as massas fresca e seca da raiz (0,82,  $p < 0,001$ ), (0,74,  $p < 0,001$ ), (0,80,  $p < 0,001$ ), respectivamente.

A massa fresca da raiz apresentou correlações altamente significativas com a massa seca da raiz (0,95,  $p < 0,001$ ) e correlações significativas com a massa seca da parte aérea (0,37,  $p < 0,05$ ).

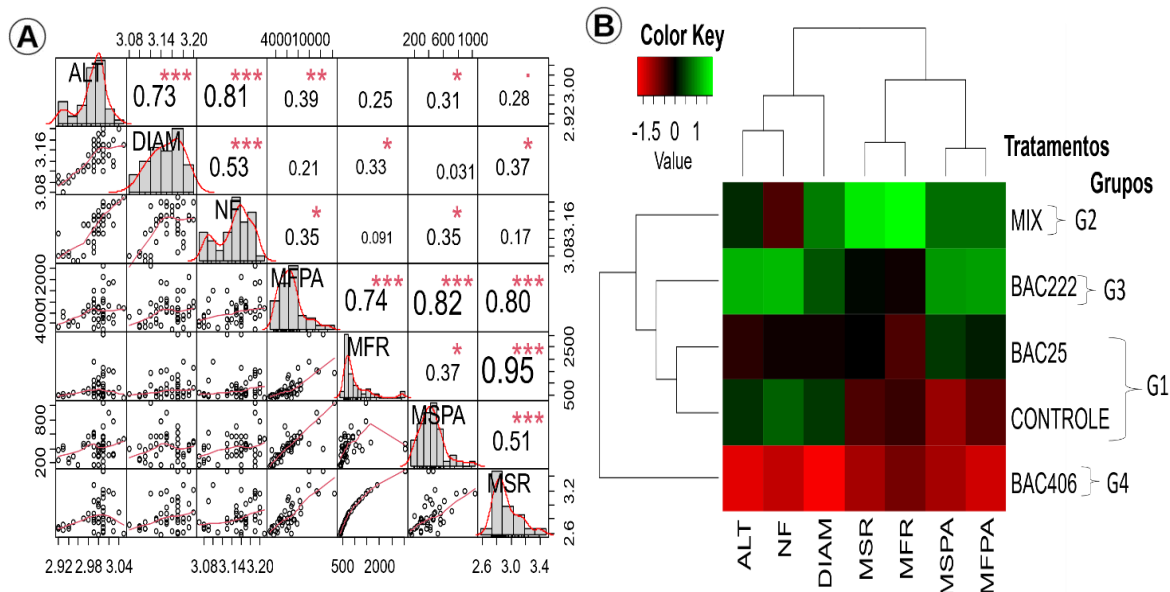
A massa seca da parte aérea esta correlacionada de maneira altamente significativa com a massa seca da raiz (0,58,  $p < 0,001$ ).

A verificação dos melhores tratamentos foi realizada a partir da construção do *heatmap* (Figura 11.b), onde foi possível observar a formação de quatro grupos. Sendo o G2 formado pelo MIX, que apresentou incremento para a maioria das variáveis analisadas, exceto para o número de folhas.

O G3 foi formado pelo tratamento BAC222, que foi capaz de promover incremento para a maioria das variáveis analisadas, exceto para a massa das raízes.

O G1 foi formado pelos tratamentos BAC25 e CONTROLE, que não promoveram incremento para a maioria das variáveis analisadas. Já o G4, foi formado apenas pelo tratamento BAC406, que foi o único a causar redução em todas as variáveis analisadas, após as plantas terem sido conduzidas à casa de vegetação.

**Figura 11.** Correlograma (A) e *Heatmap* (B) formados a partir da área abaixo da curva de progresso das variáveis: Altura (ALT); Número de folhas (NF); Diâmetro da roseta (DIAM); Massa fresca da parte aérea (MFPA); Massa seca da parte aérea (MSPA); Massa fresca da raiz (MFR); Massa seca da raiz (MSR), para mudas microbiolizadas de abacaxizeiros cv. 'BRS Imperial' cultivadas *in vitro*, após transplante para casa de vegetação.



### 3.3. Validação de um sistema de produção de mudas de abacaxi cv. 'BRS Imperial' em casa de vegetação

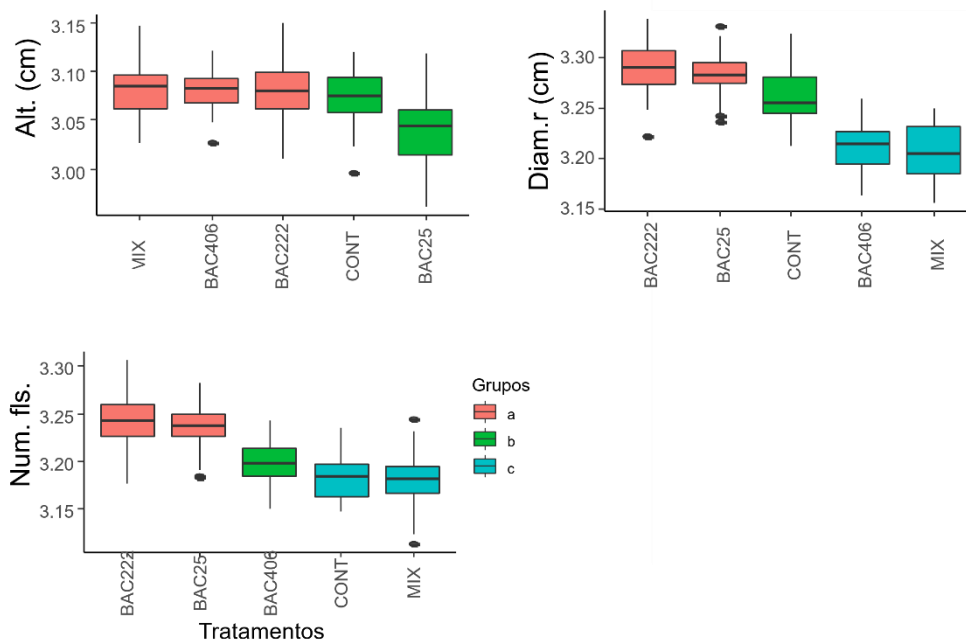
No presente estudo também foram avaliadas mudas de abacaxizeiro cv. 'BRS Imperial' em período de aclimatização em casa de vegetação que passaram pelo processo de microbiolização.

Com base nos resultados obtidos, é possível observar que para a variável altura (Figura 12) nesta fase de cultivo, os tratamentos MIX, BAC406 e BAC222, foram os que apresentaram melhores resultados de incremento.

Para a variável diâmetro da roseta (Figura 12), os tratamentos BAC222, BAC25 foram capazes de proporcionar incremento, quando comparados ao CONTROLE. Os tratamentos MIX e BAC406 reduziram o diâmetro da roseta.

No que se refere ao número de folhas (Figura 12), os tratamentos BAC222 e BAC25 apresentaram os melhores resultados de promoção, seguidos do tratamento BAC406, que apesar de apresentar menor média, também causou aumento significativo na variável.

**Figura 12.** Boxplot representativo para a área abaixo da curva de progresso para as variáveis Altura (Alt.); Número de folhas (NF); Diâmetro da roseta (Diam.r), em função dos tratamentos, para mudas microbiolizadas de abacaxizeiros cv. 'BRS Imperial' cultivadas em casa de vegetação.

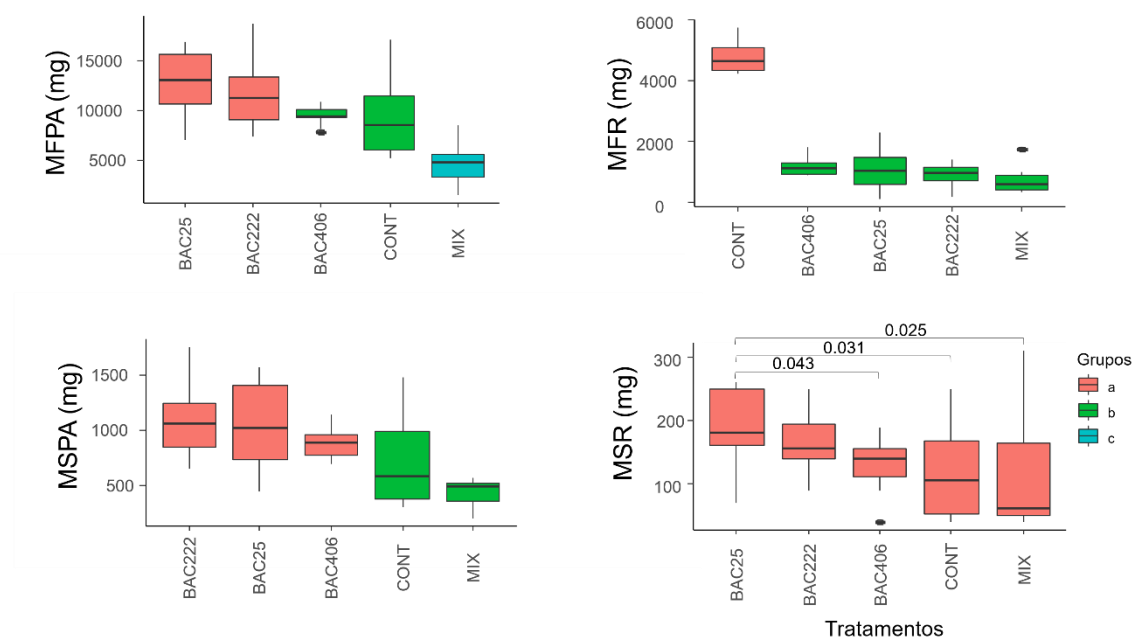


Para a massa fresca da parte aérea (Figura 13), os tratamentos BAC25 e BAC222 foram os mais promissores, gerando incremento na promoção de massa. O tratamento BAC406 não diferiu significativamente do CONTROLE e o MIX foi o único tratamento que causou redução para a variável analisada.

Todos os tratamentos causaram redução na massa fresca da raiz (Figura 16), quando comparados ao CONTROLE. No que se refere ao incremento na massa seca da parte aérea (Figura 13), os tratamentos BAC222, BAC25 e BAC406 apresentaram efeitos superiores de incremento para a variável analisada. Já para a massa seca da raiz (Figura 13), é possível observar que houve incremento proporcionado pelos tratamentos BAC25 e BAC222, ao comparar os tratamentos pelo teste 't' par a par.



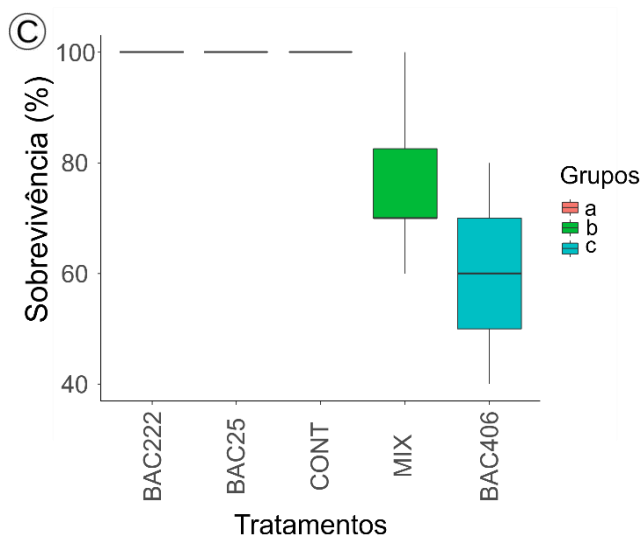
**Figura 13.** Boxplot representativo das variáveis: Massa fresca da parte aérea (MFPA); Massa fresca da raiz (MFR), Massa seca da parte aérea (MSPA); Massa seca da raiz (MSR), em função dos tratamentos, para mudas microbiolizadas de abacaxizeiros cv. 'BRS Imperial' cultivadas em casa de vegetação.



Com base nos resultados obtidos, também foi possível avaliar a correlação existente entre as variáveis analisadas (Figura 14.a), de maneira que foram encontradas correlações positivas e altamente significativas entre a variável altura e a massa fresca da parte aérea (0,48,  $p < 0,001$ ), e correlações significativas foram encontradas entre a variável e a massa seca da parte aérea (0,36,  $p < 0,01$ ). O diâmetro da roseta foi correlacionado de maneira positiva e altamente significativa com o número de folhas (0,73,  $p < 0,001$ ).

O número de folhas foi correlacionado de maneira significativamente negativa com a massa fresca da raiz (-0,38,  $p < 0,01$ ), indicando que estas são variáveis inversamente proporcionais. A massa fresca da parte aérea foi correlacionada de maneira altamente significativa e positiva com a massa seca da parte aérea (0,93,  $p < 0,001$ ). Não foram encontradas correlações significativas entre as demais variáveis.





#### 4. DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliado o potencial de promoção de crescimento de isolados bacterianos oriundos do microbioma funcional de *Ananas* spp., em diferentes etapas de cultivo para a cv. 'BRS Imperial'. Foram avaliados diferentes parâmetros de crescimento e foi calculada a área abaixo da curva de progresso para cada variável. A partir de então foi realizado o teste de Skott-Knott e foram elaboradas diferentes representações gráficas para uma melhor compreensão dos resultados.

Nesse sentido, foi possível observar que as plantas responderam de maneiras diferentes de acordo com os isolados utilizados. É sabido que os microrganismos podem interagir de diversas formas com as plantas, pois apresentam diferentes tipos de relações entre microrganismo e planta.

Dependendo das bactérias benéficas existentes no ambiente, podem ser incitados diversos efeitos nas plantas, que podem variar desde a promoção do crescimento vegetal até o auxílio na absorção e solubilização de nutrientes (OLIVEIRA *et al.*, 2021), proporcionando à planta um melhor desenvolvimento.

Para a etapa de cultivo em vasos, o tratamento que apresentou resultados mais satisfatórios de promoção de crescimento foi o BAC406, composto por um isolado bacteriano de solo, oriundo de ambiente de cultivo comercial, filogeneticamente relacionado à *Acinetobacter calcoaceticus*.

Bactérias do gênero *Acinetobacter*, são conhecidas por solubilizar fosfato, além de possuírem diversas características que auxiliam na promoção do crescimento vegetal, como a produção de ácido indol-3-acético e fixação biológica de nitrogênio (Silva *et al.*, 2021). Geralmente essas bactérias não são patogênicas, no entanto, existem algumas espécies capazes de provocar infecções hospitalares (BALDIN, 2021).

No presente trabalho, foi possível observar que após a aplicação deste isolado no solo, ocorreu incremento para todos os parâmetros de crescimento avaliados, principalmente para a altura da planta, comprimento da folha 'D' e massa fresca e seca da parte aérea, quando comparadas às plantas CONTROLE, tornando possível inferir que a bactéria se associou à planta, estabelecendo relações benéficas.

Resultados semelhantes foram encontrados em trabalhos realizados por Souza (2021), onde também foi verificada a promoção de crescimento em plantas de abacaxi cv. 'BRS Imperial' para todas as variáveis analisadas aos 90 dias por *Acinetobacter calcoaceticus*, indicando que o efeito de promoção de crescimento pode ser mantido ao longo do tempo.

Além do BAC406, outro tratamento que apresentou efeitos satisfatórios foi o BAC25, também composto por um isolado do gênero *Acinetobacter*, que foi capaz de promover incremento para todas as variáveis analisadas.

As plantas tratadas com estes isolados apresentaram incremento principalmente para as variáveis altura, desenvolvimento da folha 'D' e massa fresca e seca da parte aérea. É sabido que existem estreitas relações entre estas variáveis, uma vez que plantas maiores geralmente possuem mais massa fresca.

No que se refere à massa seca da parte aérea, também foi observado incremento, uma vez que ao proporcionar ganho de massa fresca da parte aérea, também haveria a possibilidade de incremento para a massa seca por *Acinetobacter calcoaceticus*.

Como as plantas tratadas com este isolado se encontravam maiores e com maior área foliar, é possível inferir que a atividade fotossintética da planta foi aumentada. Uma vez que a massa seca representa o produto da fotossíntese realizada pela planta durante seu ciclo de vida (TAIZ e ZEIGER, 2013).

Também foi possível observar que o tratamento proporcionou incremento para a folha 'D', tanto no comprimento, quanto na largura. A folha 'D' das plantas é caracterizada por ser a folha mais velha dentre as recém formadas, sendo capaz de fornecer dados sobre o estado de nutrição da planta em razão de ser a folha fisiologicamente mais ativa (REINHARDT e CUNHA, 1999).

Em estudos realizados por Flores *et al.* (2021) também foi possível verificar o potencial de promoção de crescimento de *Acinetobacter calcoaceticus* na produção de repolho. Onde as sementes apresentaram 100% de emergência. As plantas também exibiram maiores diâmetros e massa fresca, além de produzir o dobro de matéria seca. Demonstrando o potencial de isolados deste gênero em se associar às raízes, promovendo efeitos satisfatórios (VELÁZQUEZ *et al.* 2008).

Resultados observados por Rana *et al.* (2020), também estão de acordo com os encontrados neste estudo. Ao testar *Acinetobacter* sp. como promotora de crescimento para plantas de trigo, os autores verificaram que a bactéria foi capaz de promover incremento nas variáveis altura da planta e massa seca e fresca tanto da parte aérea quanto das raízes das plantas. Além disso, foi verificado também que *Acinetobacter* sp. foi capaz de aumentar a solubilização de fosfatos e produção de ácido indolacético pelas plantas (AIA), que é um dos reguladores responsáveis pelo crescimento vegetal (TAIZ e ZEIGER, 2013).

Bonfim *et al.* (2020) também verificaram o potencial de promoção de crescimento incitado por *Acinetobacter* sp. obtidas a partir da rizosfera de plantas de milho no desenvolvimento inicial de raízes, onde foi observado um incremento de 235%, quando comparadas às plântulas CONTROLE. Estudos realizados por Silva *et al.* (2021) também constataram um aumento na parte aérea de mudas de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro*, inoculadas com *Acinetobacter* sp.

Outros tratamentos também se mostraram promissores no que se refere ao incremento dos parâmetros avaliados, como o BAC45 (*Acinetobacter* sp.), BAC298 (*Citrobacter* sp.) e BAC223 (*Bacillus* sp.) que também foram capazes de proporcionar incremento para a maioria das variáveis analisadas, no entanto, em menores proporções.

Como base nos resultados da aplicação dos microrganismos no substrato de mudas de abacaxizeiro cv 'BRS Imperial' em vasos, foi realizada a seleção dos três tratamentos que apresentaram melhores resultados de promoção de

crescimento, para dar prosseguimento aos demais ensaios. Nesse sentido, foram escolhidos os tratamentos BAC406, BAC222 E BAC25. Também foi realizado o preparo de um MIX, composto pela junção destes três isolados.

Quanto a fase de cultivo *in vitro*, foi observado que os tratamentos MIX e BAC406 apresentaram melhores resultados de promoção de crescimento.

É sabido que a utilização de combinações de microrganismos se mostra uma alternativa viável, em função de que são liberadas diferentes substâncias nas plantas (LOPES *et al.*, 2019). No entanto, ao elaborar combinações de microrganismos, são despendidos maior tempo de confecção, bem como são necessários mais insumos, aumentando conseqüentemente o custo.

Visando essa redução, foi possível verificar que o efeito dos isolados aplicados em MIX se assemelha aos resultados obtidos com o BAC222, ao conduzir as mudas cultivadas *in vitro* para a casa de vegetação. E neste sentido, é possível constatar que *Acinetobacter sp.* pode ser utilizado para efeito de promoção de crescimento de abacaxizeiros cv. 'BRS Imperial' em casa de vegetação.

No que se refere a aplicação dos isolados diretamente em casa de vegetação, o tratamento BAC222 se mostrou o mais promissor, seguido do BAC25. Além disso, os tratamentos também apresentaram percentuais de sobrevivência de 100%.

Apesar do tratamento BAC222 não possuir identificação até o presente momento, é importante salientar que torna-se necessária sua identificação, uma vez que o mesmo demonstrou potencial de promoção em várias das etapas avaliadas.

Nesse sentido, estudos como este e os supracitados, demonstram a importância da aplicação de microrganismos com capacidade para promoção de crescimento em plantas, elucidando que esta aplicação pode gerar inúmeros benefícios em seu desenvolvimento, aumentando inclusive, a absorção de nutrientes, proporcionando um melhor desenvolvimento na planta.

No entanto, torna-se necessário estudos que elucidem a relação entre os isolados e a cultura do abacaxizeiro, de maneira que possa haver uma melhor compreensão das interações e seus impactos para cada um dos parâmetros de crescimento avaliados nas diferentes etapas de cultivo.

## 5. CONCLUSÕES

- Os tratamentos BAC406 e BAC222 promoveram incremento em todas as variáveis analisadas, para a fase de cultivo em vasos.
- O tratamento BAC406 se mostrou o tratamento mais promissor em condições de cultivo *in vitro*.
- O tratamento BAC222 se mostrou o mais efetivo em casa de vegetação.

## 6. REFERÊNCIAS

ALDONATE, M. L.; JIMÉNEZ, P.; ULLA, E. L. Caracterización de rizobacterias nativas y su efecto en la promoción de crecimiento de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en condiciones controladas. **Revista Agronómica del Noroeste Argentino**, v. 39, n. 2, p. 89-98, 2019.

BALBINOT, W. G; RODRIGUES, S.; BOTELHO, R. G. Isolates of *Bacillus* sp. from garlic: effect on corn development and plant growth-promoting mechanisms. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 44, e0200043, 2020.

BALDIN, D. T. S. **Comunidade bacteriana endofítica associada a *Pinus caribaea* Morelet var. hondurensis e seu potencial na promoção do crescimento de *Pinus* spp.** 2021. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2021.

BARROS, S. S.; PESSOA JUNIOR, W. A. G.; SÁ, I. S. C.; TAKENO, M. L.; NOBRE, F. X.; PINHEIRO, W.; MANZATO, L.; IGLAUER, S.; FREITAS, F. A. de. Pineapple (*Ananas comosus*) leaves ash as a solid base catalyst for biodiesel synthesis. **Bioresource Technology**, v. 312, p. 123569, 2020.

CABRAL, J.R.S.; MATOS, A.P. Imperial, a new pineapple cultivar resistant to fusariose. **Acta Horticulturae**, v. 822, p. 47-50, 2009.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology**. New York: John Wiley & Sons, 1990. 532 p.

REINHARDT, D.H.R.C.; CUNHA, G.A.P. Métodos de propagação. In: CUNHA, G.A.P.; CABRAL, J.R.S.; SOUZA, L.F. da S. **O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia**. Brasília: Embrapa, 1999. 408 p.

DEPARTAMENTO DE ECONOMIA RURAL (DERAL). Disponível em: [http://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/arquivos\\_restritos/files/documento/2020-01/fruticultura\\_2020.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2020-01/fruticultura_2020.pdf)> Acessado em: 05 fev. 2022

DOMINGUES, S. C. O.; CARVALHO, M. A. C. de; RABELO, H. O.; MOREIRA, E. S.; SCATOLA, L. F.; DAVID, G. Q. Microrganismos como promotores de crescimento em cultivares de alface. **Nativa**, v. 9, n. 2, p. 100-105, 2021.

ESPINOZA, L. R. M.; GASTÉLUM, F. R.; RAMÍREZ, C. J. D. Diversity of endophytic bacteria associated with tomato plants (*Solanum lycopersicum*). **Mexican Journal of Phytopathology**, v. 38, n.2, p. 307-319, 2020.

FERREIRA, T. C.; BETTIOL, W. Biocontrol of soilborne pathogens and growth promotion by *Bacillus* spp. in corn. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 15, n. 4, p. 337-356, 2019.



FLORES, A.; MARGARITA, I.; ESPINOSA, V.; MONTIEL, D. C., MENDOZA, R. M.; NIEVES, M. Desarrollo e produção do colo (*Brassica oleracea* var. Royal vantage) bajo diferentes presiones osmóticas y biofertilizada com consórcios bacterianos. **Terra Latinoamericana**, v. 39, p. 1-12, 2021.

KÖPPEN, W. **Das geographische System der Klimate**. In: KÖPPEN, W.; GEIGER, R. (Eds): Handbuch der Klimatologie, Bd. 1, Teil C, 1936.

LOPES, E. A. P.; SILVA, A. D. A. da; SANTO, A. C. E. MERGULHÃO; SILVA, E. V. N. da; SANTIAGO, A. D.; FIGUEIREDO, M. V. B. Co-inoculation of growth promoting bacteria and *glomus clarum* in micropropagated cassava. **Revista Caatinga**, v. 32, n. 01, pp. 152-166, 2019.

MCKINNEY, H. H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, v. 26, n. 5, p. 195-218, 1923.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Plant Physiology**, v. 15, n. 43, p. 473-49, 1962.

OLIVEIRA, D. A. de; FERREIRA, S. C.; CARRERA, D. L. R; SERRÃO, C. P.; CALLEGARI, D. M.; BARROS, N. L. F.; COELHO, F. M.; SOUZA, C. R. B de. Caracterização de bactérias *Pseudomonas* de *Piper tuberculatum* quanto à produção de compostos potencialmente bioestimulantes para o crescimento vegetal. **Acta Amazonica**, v. 51, n. 1, p. 10-19, 2021.

QUISEN, R. C.; ANGELO, P. C. S. **Manual de Procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental**. Manaus - AM: Embrapa Amazônia Ocidental, 2008. 48p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos, 61).

RANA, K. L.; KOUR, D.; KAUR, T.; SHEIKH, I.; YADAV, A. N.; KUMAR, V.; SUMAN, A.; DHALIWAL, H. S. Endophytic microbes from diverse wheat genotypes and their potential biotechnological applications in plant growth promotion and nutrient uptake. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 90, n. 5, p. 969-979, 2020.

R Development Core Team (2017). **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acessado em: 10 de agosto de 2022.

SILVA, J. C. da; SANTOS, L. D. S.; FARIA, P. S. A.; SILVA, F. G.; NETO, A. R.; MARTINS, P. F.; SELARI, P. J. R. G. Multifunctional characteristics of *Acinetobacter lwoffii* Bac109 for growth promotion and colonization in micropropagated sugarcane. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 51, 2021.

SOUZA, C. R. S.; BARBOSA, A. C. O.; FERREIRA, C. F.; SOUZA, F. V. D.; ROCHA, L. S.; SOUZA, E. H. de; OLIVEIRA, S. A. S. de. Diversity of microorganisms associated to *Ananas* spp. from natural environment, cultivated and *ex situ* conservation areas. **Scientia Horticulturae**, v. 243, p. 544-551, 2019.

SOUZA, C. P. F. **Estudo do microbioma associado ao gênero *Ananas***. 2021. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2021.

SPOLAOR, L. T.; GONÇALVES, L. S. A.; SANTOS, O. J. A. P. dos; OLIVEIRA, A. L. M. de; SCAPIM, C. A.; BERTAGNA, F. A. B.; KUKI, M. C. Plant growth-promoting bacteria associated with nitrogen fertilization at topdressing in popcorn agronomic performance. **Bragantia**, v. 75, n. 1, p. 33-40, 2016.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

VELÁZQUEZ, E.; ROJAS, M.; LORITE, M. J.; RIVAS, R.; ZURDO-PIÑEIRO, J. L.; HEYDRICH, M.; BEDMAR, E. J. Genetic diversity of endophytic bacteria which could be find in the apoplastic sap of the medullary parenchym of the stem of healthy sugarcane plants. **Journal of Basic Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 118-124, 2008.

## CAPÍTULO 2

### **Avaliação do potencial de isolados bacterianos oriundos do microbioma funcional de *Ananas spp.* na promoção de crescimento de mudas microbiolizadas de abacaxizeiro cv. 'Pérola' e supressão de *Fusarium spp.***

#### **Resumo**

O Brasil é um dos maiores produtores de abacaxi no mundo, sendo a cultivar 'Pérola' uma das mais produzidas. Apesar da grande demanda comercial, perdas significativas na produção podem ser geradas durante seu cultivo, por ser susceptível a fusariose. Visando a redução de doenças, trabalhos recentes têm demonstrado o potencial de bactérias provenientes do microbioma associado de plantas no manejo de doenças e também para promoção de crescimento vegetal. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi validar o potencial de bactérias provenientes do microbioma de *Ananas spp.* como promotoras de crescimento de abacaxizeiros cv. 'Pérola', e estimar o impacto destas na supressão de *Fusarium spp.* Para tanto, foram preparadas suspensões compostas por bactérias provenientes do microbioma de *Ananas spp.* ajustadas a uma concentração de  $1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias (UFC.mL<sup>-1</sup>) que foram aplicadas no substrato de mudas cultivadas em vasos. As avaliações ocorreram a cada 30 dias, durante 90 dias e foram avaliados os parâmetros de crescimento: altura da planta, número de folhas, diâmetro da roseta e comprimento e largura da folha 'D'. Para avaliação da supressão de *Fusarium spp.* foram realizados testes de pareamento *in vitro*, onde o fungo foi cultivado em placas de Petri juntamente com os isolados bacterianos testados para verificação do potencial antagonista. Para tanto foram testados 18 isolados bacterianos X *F. guttiforme* e os mesmos isolados X *F. proliferatum*. Também foram realizados experimentos para verificação da supressão de *F. guttiforme* em folhas destacadas e em mudas cultivadas em vasos de abacaxizeiro cv. 'Pérola'. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. De acordo com os resultados, foi possível constatar que o tratamento BAC25 se mostrou promissor na promoção de crescimento para a cultivar. Para os experimentos de supressão de *Fusarium*, o tratamento BAC406 demonstrou maior potencial antagonista para *F. proliferatum*, enquanto que os tratamentos BAC25 e BAC388 apresentaram maior efeito antagonista para *F. guttiforme*. Os tratamentos testados não foram capazes de reduzir a área da lesão causada por *F. guttiforme* em folhas destacadas. Já para supressão de *F. guttiforme* em mudas da cv. 'Pérola' cultivada em vasos, o tratamento BAC406 se mostrou promissor, reduzindo o avanço dos sintomas da doença nas plantas.

**Palavras-chave:** *Abacaxizeiro*, *Bactérias benéficas*, *Fusariose*.

**Evaluation of the potential of bacterial isolates from the functional microbiome of *Ananas* spp. in promoting the growth of microbiolized seedlings of pineapple cv. 'Pérola' and suppression of *Fusarium* spp.**

**Abstract**

Brazil is one of the largest pineapple producers in the world, with the 'Pérola' cultivar being one of the most produced. Despite the great commercial demand, significant losses in production can be generated during its cultivation, as it is susceptible to fusariosis. Aiming at reducing diseases, recent work has demonstrated the potential of bacteria from the associated microbiome of plants in disease management and also for promoting plant growth. Therefore, the objective of this work was to validate the potential of bacteria from the microbiome of *Ananas* spp. as growth promoters of pineapple cv. 'Pérola', and estimate their impact on the suppression of *Fusarium* spp. For this purpose, suspensions composed of bacteria from the microbiome of *Ananas* spp. adjusted to a concentration of  $1.5 \times 10^8$  colony forming units (CFU.mL<sup>-1</sup>) that were applied to the substrate of seedlings grown in pots. The evaluations took place every 30 days, for 90 days, and the growth parameters were evaluated: plant height, number of leaves, rosette diameter and length and width of the 'D' leaf. For evaluation of suppression of *Fusarium* spp. *in vitro* pairing tests were performed, where the fungus was cultivated in Petri dishes along with the bacterial isolates tested to verify the antagonistic potential. For that, 18 bacterial isolates X *F. guttiforme* and the same isolates X *F. proliferatum* were tested. Experiments were also carried out to verify the suppression of *F. guttiforme* in detached leaves and seedlings grown in pots of pineapple cv. 'Pérola'. The data obtained were subjected to analysis of variance and the means were grouped by the Scott-Knott test at 5% probability. According to the results, it was possible to verify that the BAC25 treatment was promising in promoting growth for the cultivar. For the *Fusarium* suppression experiments, the BAC406 treatment showed a greater antagonistic potential for *F. proliferatum*, while the BAC25 and BAC388 treatments showed a greater antagonistic effect for *F. guttiforme*. The tested treatments were not able to reduce the area of the lesion caused by *F. guttiforme* in detached leaves. As for suppression of *F. guttiforme* in seedlings of cv. 'Pérola' grown in pots, the BAC406 treatment showed promise, reducing the progression of disease symptoms in plants.

**Keywords:** *Pineapple, Beneficial bacteria, Fusariosis.*

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa o terceiro lugar no ranking mundial de produção de frutas, produzindo cerca de 40 milhões de toneladas, ficando atrás apenas da China e da Índia (DERAL, 2020).

Quanto à produção nacional, cerca de 3,5 milhões de toneladas é de abacaxi, sendo os estados do Pará, Paraíba e Minas Gerais os maiores produtores, fornecendo cerca de 53% da produtividade nacional do fruto (IBGE, 2021).

Ainda no âmbito nacional a cv. 'Pérola' é a mais comercializada, principalmente na região Nordeste, onde é responsável por 85% da produção (REINHARDT *et al.*, 2017). Os frutos dessa cultivar são doces e apresentam menos acidez do que outras cultivares, o que garante o interesse do mercado consumidor (CABRAL e JUNGHANS, 2003).

Além disso, a planta possui a capacidade de produzir frutos em uma densidade de 35.710 plantas por hectare (PÁDUA *et al.*, 2016). No entanto, um dos pontos negativos desta cultura é a susceptibilidade a algumas doenças que podem reduzir drasticamente sua produção e comercialização. Dentre estas doenças, a que gera mais perdas é a fusariose do abacaxizeiro.

A doença é causada pelo fungo *Fusarium guttiforme* (BEZERRA *et al.*, 2019). O fungo penetra na planta a partir de ferimentos causados por insetos ou por ferimentos naturais existentes nas mudas, além disso também pode utilizar como porta de entrada ductos nectários durante a antese e sua disseminação é realizada principalmente pelo vento e por insetos (KIMATI *et al.*, 1997).

No Brasil, a doença foi atribuída erroneamente a *F. moniliforme* Sheldon var. *subglutinans*, no entanto, com o avanço das pesquisas, descobriu-se que a doença possuía outro agente causal, descrito posteriormente como *F. guttiforme* (NIRENBERG e O'DONNELL, 1998).

O fungo apresenta especificidade para abacaxizeiros e a doença é caracterizada por apresentar exsudação de goma, que pode aparecer em qualquer estágio de desenvolvimento da planta, sendo expelida a partir das folhas, do caule e/ou dos frutos, que podem adquirir um aspecto mumificado no estágio final de

evolução da doença (MELO *et al.*, 2016), podendo gerar perdas superiores a 90% (CAETANO; VENTURA; BALBINO, 2015).

Essa elevada perda na produção ocorre principalmente pelo motivo que ao exsudar goma, a planta perde água e nutrientes na tentativa de se proteger englobando o patógeno (PENTEADO *et al.*, 2011).

Apesar da exsudação de goma ser um sintoma característico da doença, outros podem ser observados, como clorose, morte do ápice e consequente morte da planta, curvatura no talo e outras alterações morfológicas que alteram a arquitetura da planta (VENTURA e ZAMBOLIM, 2002).

Visando reduzir esses impactos, estudos recentes têm demonstrado o potencial de diferentes microrganismos provenientes do microbioma associado de plantas no controle biológico e promoção de crescimento vegetal devido sua capacidade de liberar substâncias na rizosfera da planta (SPOLAOR *et al.*, 2016; FERREIRA e BETTIOL, 2019; ALDONATE; JIMÉNEZ; ULLA, 2019; ESPINOZA; GASTÉLUM; RAMÍREZ, 2020).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi validar o potencial de bactérias provenientes do microbioma de *Ananas* spp. como promotoras de crescimento de abacaxizeiros cv. 'Pérola', e estimar o impacto destas na supressão de *Fusarium* spp.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Validação da promoção de crescimento do abacaxizeiro cv. 'Pérola' por bactérias benéficas**

Neste experimento foi avaliado o potencial efeito de promoção de crescimento dos isolados bacterianos para a cultivar 'Pérola'. Para tanto foram utilizados os 3 isolados que apresentaram melhor desempenho na etapa 1, do Capítulo 1 (BAC25, BAC222 e BAC406).

Mudas de abacaxizeiro cultivar 'Pérola' que estavam em período de aclimatização foram cedidas pelo Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) da Embrapa Mandioca e Fruticultura. Foi realizado o transplante para vasos plásticos com capacidade para 2L, preenchidos com solo e substrato comercial Maxfertil na proporção 1:1.

Trinta dias após o transplante, as suspensões bacterianas foram adicionadas ao substrato. Para tanto, as mesmas foram preparadas a partir da reativação dos isolados, retirando-se uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  de cada amostra mantida em estoque de glicerol a 30%, armazenadas em freezer a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

À estas amostras individuais, foram adicionados 50 mL de caldo nutriente que foram transferidos para Erlenmeyers com capacidade para 250 mL. Estes foram vedados e levados à mesa agitadora para crescimento das colônias bacterianas sob agitação constante de 100 RPM por 24h, à temperatura ambiente.

Após o período de crescimento, a partir da adição de  $\text{MgCl}_2$  a 10 Mm, cada suspensão obtida teve seu valor de absorvância ajustado para uma densidade ótica de ( $\text{D.O.}_{540} = 0,7$ ), que corresponde a  $10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ .

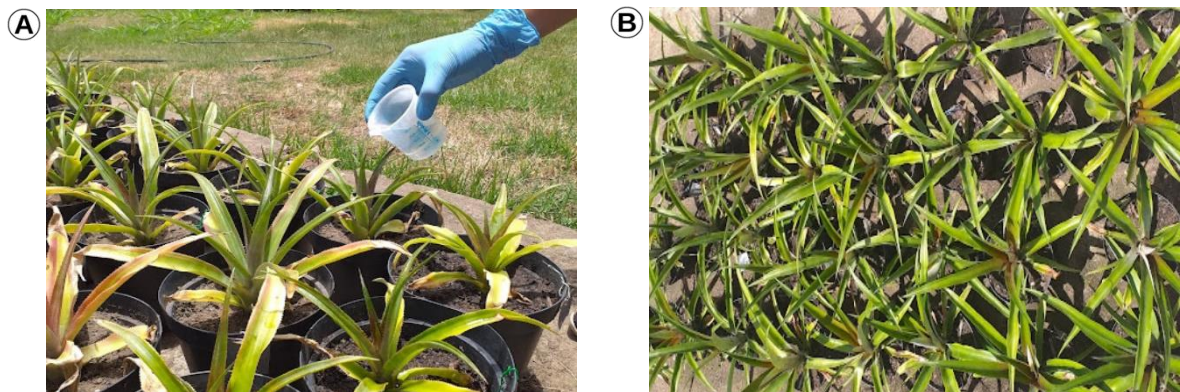
As suspensões finais foram então preparadas a partir de 300 mL de cada suspensão ajustada anteriormente, às quais foram adicionados 200 mL de  $\text{MgCl}_2$  a 10 Mm e 2,5 L de água destilada, totalizando 3 L de cada tratamento.

Estas suspensões foram então aplicadas no solo de acordo com os respectivos tratamentos, onde foram aplicados 90 ml de cada suspensão.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído por 5 tratamentos, sendo: BAC25 (*Acinetobacter* sp.), BAC222 (não identificado), e BAC406 (*Acinetobacter calcoaceticus*), além de um MIX composto pela junção destes três isolados e o CONTROLE, composto por plantas não tratadas.

Cada tratamento foi composto por 32 repetições, totalizando 160 unidades experimentais, como mostra a Figura 1.

**Figura 1.** (A) Microbiolização. (B) Mudas microbiolizadas de abacaxi cv. 'Pérola' em vasos.



Fonte: Polyana Silva

As plantas foram mantidas nos vasos ao ar livre durante o período de avaliação, que se deu a cada 30 dias, durante 90 dias. O potencial de promoção de crescimento foi avaliado a partir da mensuração das variáveis: altura da planta (ALT) (cm), número de folhas (NF), diâmetro da roseta (DIAMR) (cm) e comprimento e largura da folha 'D' (CFD e LFD, respectivamente) (cm).

## 2.2. Antagonismo de isolados bacterianos à *Fusarium* spp.

Para avaliação do potencial de antagonismo, foram utilizados 18 isolados bacterianos associados ao microbioma do gênero *Ananas*, descritos na Tabela 1, além dos fungos *Fusarium guttiforme* e *Fusarium proliferatum*.

**Tabela 1.** Descrição dos isolados utilizados na condução do experimento.

Tratamentos	Ambiente de colonização e origem	Identificação taxonômica a nível de gênero
BAC25	Bactérias endofíticas de caule de ambiente de cultivo comercial	<i>Acinetobacter</i>
BAC26		-
BAC210		-
BAC219		<i>Enterobacter</i>
BAC267		<i>Acinetobacter</i>
BAC272		<i>Acinetobacter</i>
BAC298		<i>Citrobacter</i>
BAC381		<i>Acinetobacter</i>
BAC388		-
BAC406		<i>Acinetobacter</i>
BAC40		Bactérias de solo de ambiente de cultivo comercial
BAC47	<i>Arthrobacter</i>	
BAC54	<i>Acinetobacter</i>	
BAC222	-	
BAC223	<i>Bacillus spp.</i>	
BAC226	<i>Enterobacter</i>	
BAC400	--	
BAC45	Bactérias de solo de ambiente natural	<i>Acinetobacter</i>
CONTROLE	-----	-----

Fonte: Adaptado de Souza, 2021.



Todos os microrganismos foram obtidos a partir da coleção microbiológica do Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Mandioca e Fruticultura e foi realizada a técnica de cultura pareada, para cada um dos 18 isolados bacterianos X o fungo.

Os fungos foram repicados em placas de Petri com meio de cultura batata dextrose ágar (BDA), em triplicata, e incubados em estufa tipo BOD à 25 °C, por 7 dias, para crescimento micelial e uso nos ensaios. Já os isolados bacterianos foram reativados retirando-se uma alíquota 100 µL de cada amostra mantida em estoque de glicerol a 30%, armazenadas em freezer a -20 °C.

À estas amostras individuais, foram adicionados 50 mL de caldo nutriente que foram transferidos para Erlenmeyers com capacidade para 250 mL. Estes foram vedados e levados à mesa agitadora para crescimento das colônias bacterianas sob agitação constante de 100 RPM por 24h, à temperatura ambiente.

Após o período de crescimento, a partir da adição de MgCl<sub>2</sub> a 10 Mm, cada suspensão obtida teve seu valor de absorvância ajustado para uma densidade ótica de (D.O.<sub>540</sub> = 0,7), que corresponde a 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>.

Para a montagem do experimento, sete dias após a incubação dos fungos foram preparadas placas de Petri com meio de cultura BDA, nas quais foram adicionadas um disco de 6mm de diâmetro de micélio fúngico no centro das placas de Petri.

As placas foram vedadas e incubadas em estufa BOD por 24 horas à 25 °C. Em seguida, em quatro pontos equidistantes a 1,5 cm das extremidades da placa foram inseridos discos de papel filtro com 6mm de diâmetro, onde foram adicionados 3 µL da suspensão preparada de cada isolado bacteriano estudado, de acordo com os tratamentos (Figura 2.a).

As placas foram novamente incubadas em estufas BOD à 28 °C, e as avaliações ocorreram quando o tratamento CONTROLE atingiu a borda da placa.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por dois sub-experimentos: isolados bacterianos X *Fusarium guttiforme* e isolados bacterianos x *Fusarium proliferatum*.

Cada sub-experimento foi composto por 19 tratamentos, sendo 18 isolados bacterianos e o CONTROLE, onde foi utilizado apenas o fungo, com 10 repetições cada, constituindo 190 unidades experimentais.

O potencial de antagonismo, em cada sub-experimento, foi avaliado a partir do cálculo da área da colônia, realizada a partir da mensuração do seu diâmetro em dois sentidos opostos de acordo com a fórmula:

$$A = \left( \pi * \left( \frac{D1 * D2}{4} \right) \right)$$

Onde: A= área da colônia e D1 e D2 = diâmetro da colônia em dois sentidos opostos. Também foi avaliado o percentual de inibição, que foi calculado a partir da fórmula:

$$\%ICM = \left[ C - \frac{T}{C} \right] * 100$$

Onde: %ICM= porcentagem de inibição; C= crescimento radial da testemunha; T= crescimento radial do tratamento.

### **2.3. Avaliação do potencial de isolados bacterianos oriundos do microbioma de *Ananas* spp. na supressão de *Fusarium guttiforme* em folhas destacadas de abacaxizeiro cv. 'Pérola'**

Para montagem do experimento, inicialmente o fungo *F. guttiforme* foi repicado em placas de Petri com meio de cultura batata dextrose ágar (BDA), em triplicata, e incubados em estufa tipo BOD à 25 °C, por 7 dias, para crescimento micelial.

Cinco dias após a repicagem do fungo, 12 folhas destacadas oriundas de abacaxizeiros cv. 'Pérola' sem sintomas de fusariose foram coletadas em áreas de cultivo na Embrapa Mandioca e Fruticultura e foram levadas a laboratório, lavadas em água corrente, desinfestadas em hipoclorito de sódio a 5,0% e enxaguadas com água destilada estéril.

Em seguida, as folhas foram separadas em duplas, para composição das repetições de cada tratamento. Foram preparadas suspensões bacterianas, de modo que a multiplicação e ajuste de concentração foram realizados como descrito nos experimentos anteriores.

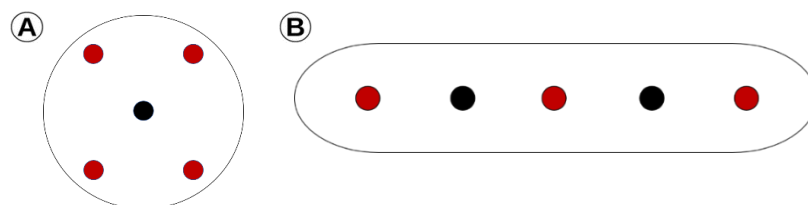
As folhas foram então imersas nessas suspensões bacterianas de acordo com os respectivos tratamentos, por três minutos e foram depositadas em bandejas plásticas sob papel filtro, ambos esterilizados.

As bandejas foram introduzidas em sacos de polietileno transparente, e transferidas para estufas tipo B.O.D. à 28 °C por 48 horas. Também foram adicionados chumaços de algodão umedecidos com água destilada estéril, para suprir a necessidade de umidade, formando uma câmara úmida.

Após este período, foi realizado o método de inoculação do palito infestado (CAMARGO; BARACHO, 1977). Para tanto, após o período de crescimento das colônias fúngicas, foram adicionados 50 mL de água destilada esterilizada às placas de Petri, para raspagem do micélio e a suspensão foi filtrada em camada dupla de gaze.

Em seguida, foi realizado o ajuste de concentração em hemacitômetro, tipo Neubauer para  $10^5$  macroconídios/mL (MATOS; CABRAL, 1988). Foram realizados 5 ferimentos ao longo das folhas, distribuídos a partir 2 cm da base da folha e até 2 cm do ápice, e a suspensão fúngica foi inoculada alternadamente entre os ferimentos, conforme Figura 2.b.

**Figura 2.** (A) Esquema do pareamento *in vitro* de isolados bacterianos X *Fusarium* spp. Círculos vermelhos representam os locais onde houve aplicação das bactérias e círculo preto representa o local onde houve aplicação do fungo. (B) Esquema da inoculação de *Fusarium guttiforme* em folhas destacadas de abacaxizeiro cv. 'Pérola'. Círculos vermelhos representam os locais onde houve inoculação e círculos pretos representam os locais onde não houve inoculação.



Foram depositados discos de meio de cultura BDA sob os ferimentos e as folhas foram novamente incubadas em estufa tipo B.O.D. à 25 graus, por 15 dias, em fotoperíodo de 12 horas claro/escuro.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído por 6 tratamentos, sendo: BAC25 (*Acinetobacter* sp.) + *F. guttiforme*, BAC222 (não

identificado) + *F. guttiforme*, BAC406 (*Acinetobacter calcoaceticus*) + *F. guttiforme*, MIX (composto pela junção destes três isolados) + *F. guttiforme*, o CONTROLE POSITIVO composto por folhas não tratadas + *F. guttiforme* e o CONTROLE NEGATIVO composto por folhas não tratadas e não inoculadas. Cada tratamento foi composto por 2 repetições, totalizando 12 unidades experimentais.

A área da lesão foi avaliada 15 dias após a adição do fungo nas folhas destacadas e foi calculada a partir da mensuração do diâmetro da mesma em dois sentidos opostos de acordo com a fórmula citada anteriormente.

#### **2.4. Avaliação do potencial de isolados bacterianos oriundos do microbioma de *Ananas* spp. na supressão de *Fusarium guttiforme* em mudas de abacaxizeiro cv. 'Pérola' em vasos**

Mudas de abacaxizeiro cv. 'Pérola', oriundas da etapa de validação do potencial de isolados bacterianos como promotores de crescimento em vasos foram inoculadas com *F. guttiforme*, após 90 dias, para avaliação do potencial efeito de supressão do fungo nas plantas.

Para tanto, inicialmente o fungo foi repicado em placas de Petri com meio de cultura batata dextrose ágar (BDA), em triplicata, e incubado em estufa tipo BOD à 25 °C, por 7 dias.

Após o período de crescimento das colônias fúngicas, foram adicionados 50 mL de água destilada esterilizada às placas de Petri, para raspagem do micélio e a suspensão foi filtrada em camada dupla de gaze.

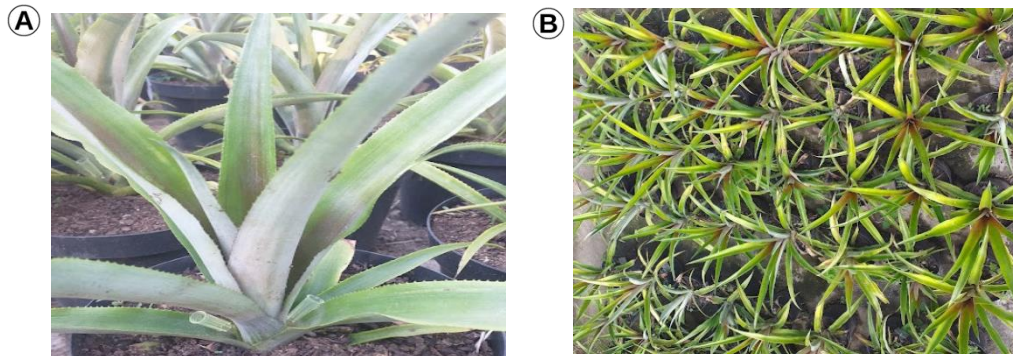
Em seguida, foi realizado o ajuste de concentração em hemacitômetro, tipo Neubauer para  $10^5$  macroconídios/mL (MATOS; CABRAL, 1988).

A inoculação do fungo nas plantas foi realizada a partir da fixação de duas ponteiras de plástico esterilizadas preenchidas com 100 µL da suspensão fúngica ajustada. As mesmas foram inseridas em lados opostos, em um ângulo de 45° na base do caule das plantas, como mostra a Figura 3 (A).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, constituído por 5 tratamentos, sendo: BAC25 (*Acinetobacter* sp.) + *F. guttiforme*, BAC222 (não

identificado) + *F. guttiforme*, BAC406 (*Acinetobacter calcoaceticus*) + *F. guttiforme*, MIX (composto pela junção destes três isolados) + *F. guttiforme* e o CONTROLE, composto por plantas não tratadas + *F. guttiforme*. Cada tratamento foi composto por 20 repetições, totalizando 100 unidades experimentais, como mostra a Figura 3 (B).

**Figura 3.** (A) Inoculação do fungo. (B) Mudas inoculadas de abacaxi cv. 'Pérola' em vasos.



Fonte: Polyana Silva

As plantas foram mantidas nos vasos ao ar livre durante o período de avaliação, que se deu semanalmente, durante 90 dias. Foi avaliada a evolução dos sintomas de acordo com a presença de: clorose, deformações nas plantas, manchas foliares, vigor e exsudação de goma.

A severidade da doença foi mensurada a partir de uma escala de atribuição de notas para cada sintoma, que variaram de 0 a 4, onde:

- 0= Planta totalmente morta;
- 1= Mais de 50% da planta apresenta o sintoma;
- 2= De 30-50% da planta apresenta o sintoma;
- 3= Início do aparecimento do sintoma;
- 4= Plantas saudáveis.

Em seguida, visando a análise dos dados obtidos a partir da escala arbitrária anteriormente citada os dados foram utilizados para estimativa do índice de doença de McKinney (1923) com base na fórmula:

$$SEV = \left[ \frac{\sum(\text{grau da escala} * \text{frequência})}{\text{número total de unidades} * \text{grau máximo da escala}} \right] * 100$$

## 2.4. Análises estatísticas

Devido os dados terem sido obtidos periodicamente, foi calculada a área abaixo da curva de progresso (AACP) de acordo com a fórmula adaptada de Campbell e Madden (1990):

$$AACP = \sum \left[ \left( \frac{y_i + y_{i+1}}{2} \right) * (t_{i+1} - t_i) \right]$$

Onde:  $y_i$  é o valor mensurado para a variável de interesse na observação  $i$ ; e  $y_{i+1}$   $y_i$  é o valor mensurado para a variável de interesse na observação subsequente  $i+1$ ; enquanto  $t_{i+1}$  é o tempo (dias) na avaliação subsequente  $i+1$ ; e  $t_i$  é o tempo (dias) no momento da observação  $i$ .

Todos os dados gerados foram submetidos à análise de variância e as médias foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, com o programa estatístico R (R Development Core Team, 2017). As médias não agrupadas pelo teste Scott-Knott, mas distantes entre si, foram testadas par-a-par quando às diferenças pelo teste 't' par a par.

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Validação da promoção de crescimento do abacaxizeiro cv. 'Pérola' por bactérias benéficas

O potencial de crescimento de bactérias benéficas associadas ao microbioma de *Ananas* spp. foi testado para a cv. 'Pérola'. As plantas foram cultivadas ao ar livre e foram realizadas avaliações mensais para mensuração de diferentes parâmetros de crescimento.

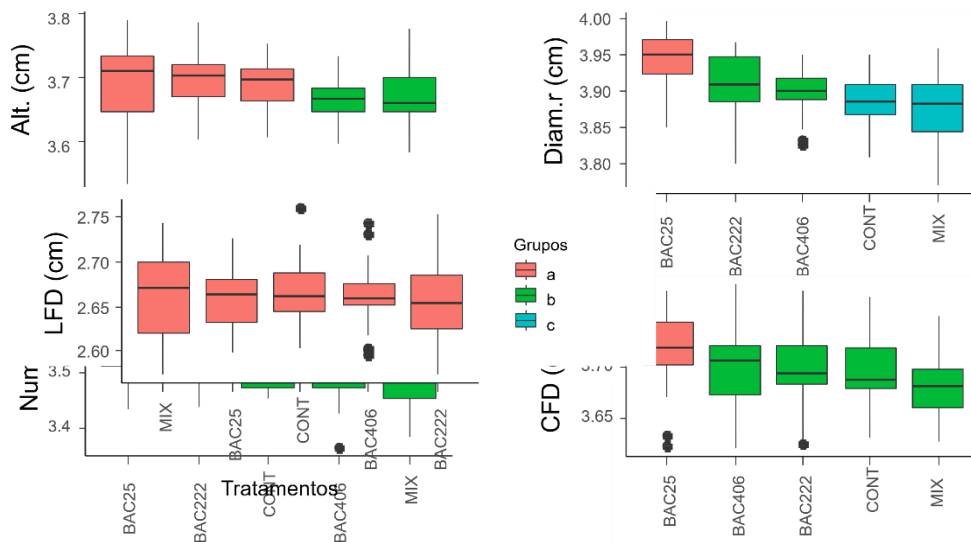
Após análises estatísticas, foi possível constatar que para a variável altura (Figura 4) não houve incremento significativo, uma vez que os tratamentos não diferiram do controle.

Para diâmetro da roseta (Figura 4), o tratamento BAC25 foi o que apresentou melhores resultados de promoção para a variável. Seguido dos tratamentos BAC222

e BAC406, que apesar de exibirem menores médias, também foram capazes de promover aumento da variável.

Quanto ao número de folhas (Figura 4), os tratamentos BAC25 e BAC222 promoveram incremento na variável. Já para o comprimento da folha 'D' (Figura 4), apenas o tratamento BAC25 se mostrou efetivo. Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos para a largura da folha 'D' (Figura 4).

**Figura 4.** Boxplot representativo para a área abaixo da curva de progresso para as variáveis: Altura; Diâmetro da roseta; Número de folhas; Comprimento da folha 'D' e Largura da folha 'D' em função dos tratamentos, para mudas microbiolizadas de abacaxizeiros cv. 'Pérola' cultivadas em vasos.



Para uma melhor compreensão da interação existente entre as variáveis estudadas, foi realizada a análise de correlação para a área abaixo da curva de progresso dos parâmetros de crescimento: altura da planta, comprimento da folha 'D', diâmetro da roseta, largura da folha 'D' e número de folhas, que pode ser observada na Figura 5.a.

Ao analisar a correlação existente entre as variáveis, foi possível observar que a altura da planta apresenta correlação positiva e altamente significativa com o diâmetro da roseta, o número de folhas e o comprimento da folha 'D' (0,57,  $p < 0,001$ ), (0,42,  $p < 0,001$ ), (0,78,  $p < 0,001$ ), respectivamente. Correlações significativas foram encontradas entre a variável analisada e a largura da folha 'D' (0,20,  $p < 0,05$ ).

O diâmetro da roseta apresentou correlações positivas e altamente significativas com o número de folhas (0,71,  $p < 0,001$ ) e com o comprimento da folha

'D' (0,83,  $p < 0,001$ ). A variável número de folhas apresentou correlações positivas e altamente significativas com o comprimento da folha 'D' (0,53,  $p < 0,001$ ).

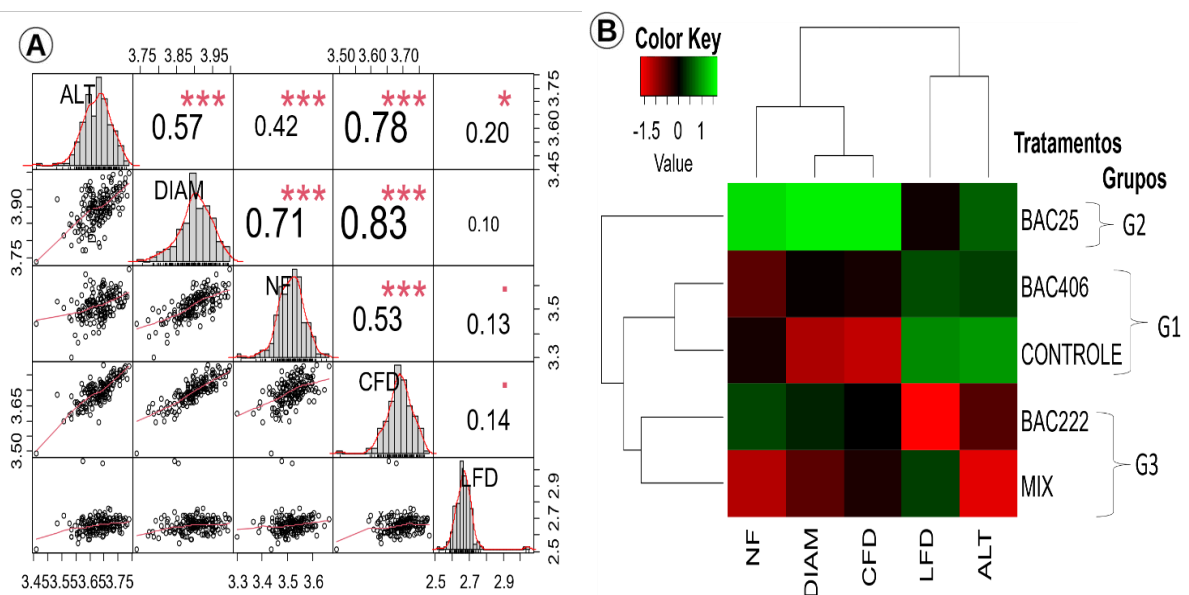
O comprimento e a largura da folha 'D' estão correlacionados em menor grau entre si. Não foram encontradas correlações negativas entre as variáveis analisadas, indicando que elas são proporcionais entre si.

Diferentes resultados foram obtidos para diferentes variáveis analisadas, e diante disso, foi construído um *heatmap* (Figura 5.b) para uma melhor compreensão da influência dos tratamentos sobre o crescimento das plantas. A partir desta análise foi possível observar a formação de três grupos.

O G2 foi formado pelo tratamento BAC25, que foi capaz de proporcionar incremento para a maioria das variáveis analisadas.

O G1 foi formado pelos tratamentos BAC406 e CONTROLE, que não proporcionaram incremento ou reduziram as médias das variáveis analisadas, no entanto, apresentaram incremento para a altura e a largura da folha 'D'. Já o G3, foi formado pelos tratamentos BAC222 e MIX, que causaram redução para a maioria das variáveis analisadas.

**Figura 5.** Correlograma (A) e *Heatmap* (B) formados a partir da área abaixo da curva de progresso das variáveis: Altura (ALT); Número de folhas (NF); Diâmetro da roseta (DIAM); Comprimento da folha 'D' (CFD); Largura da folha 'D' (LFD); em função dos tratamentos, para mudas microbiolizadas de abacaxizeiros cv. 'Pérola' cultivadas em vasos.





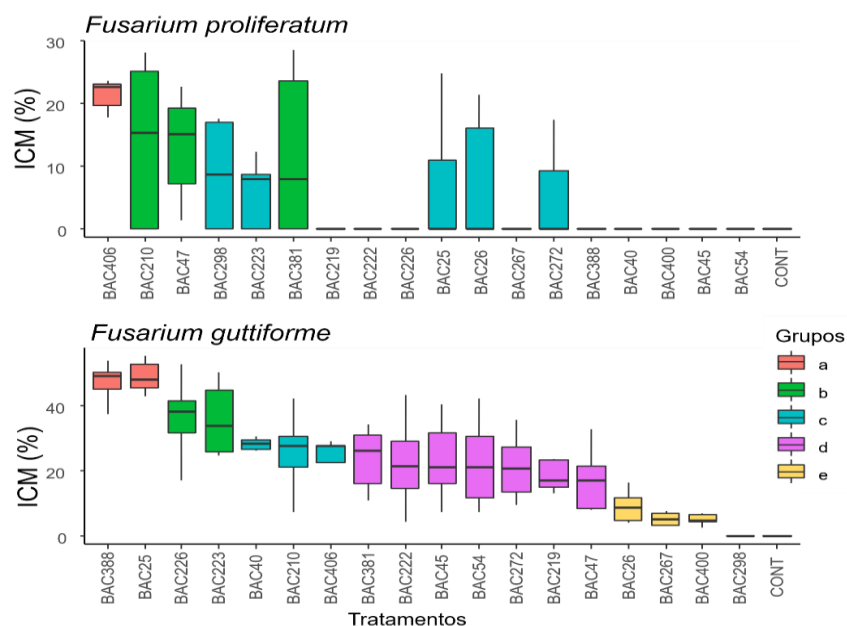
### 3.2. Antagonismo de isolados bacterianos à *Fusarium* spp.

Ao realizar o teste de pareamento *in vitro* de 18 isolados bacterianos associados ao microbioma de *Ananas spp.* frente duas espécies diferentes de *Fusarium*, foi possível verificar um comportamento diferente no que se refere à inibição do crescimento dos fungos.

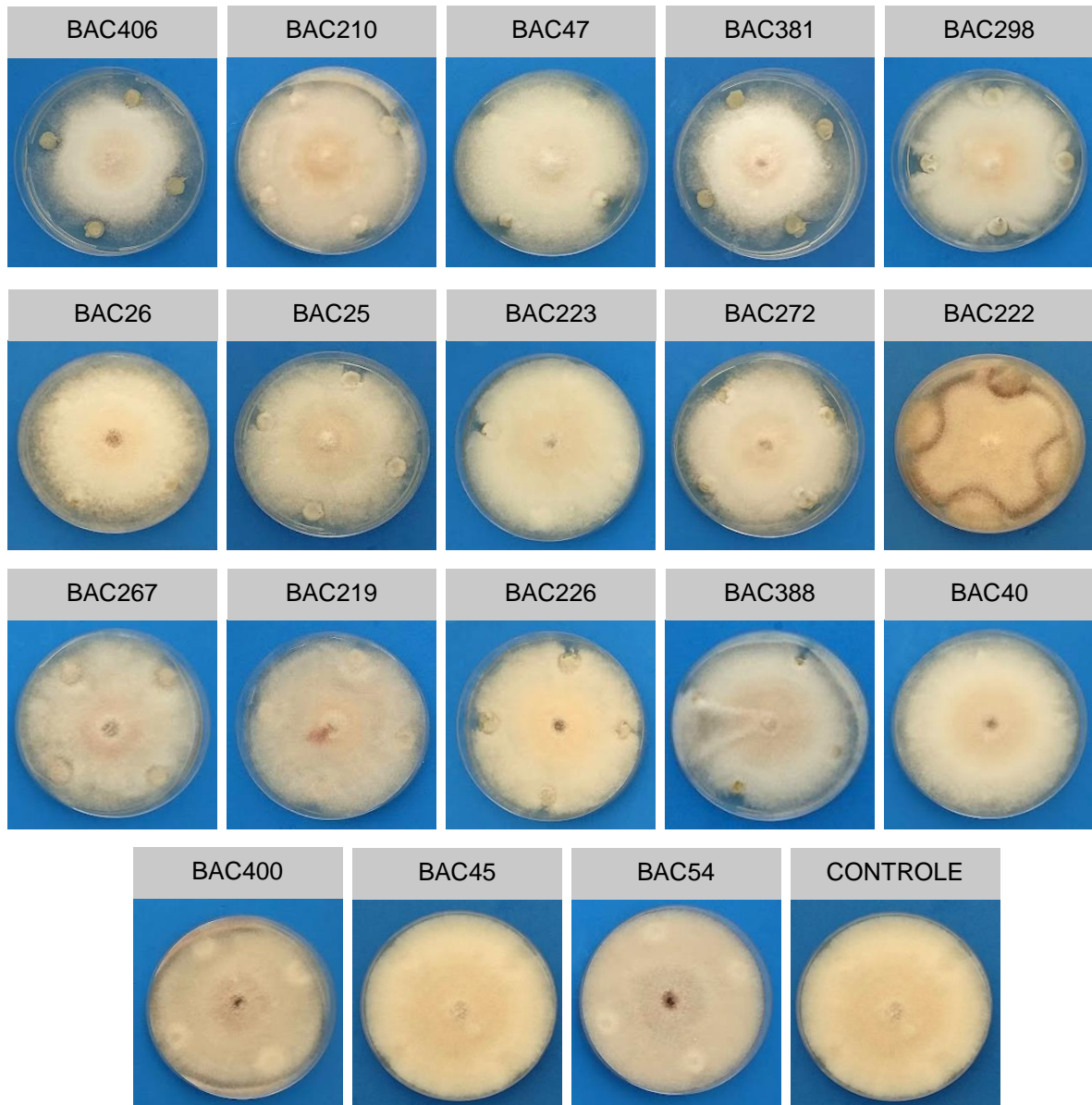
Para *Fusarium proliferatum* (Figura 6 e Figura 7), foi possível verificar um percentual máximo de inibição do crescimento micelial de 22%, incitado pelo tratamento BAC406, o qual se mostrou o mais promissor na redução do crescimento micelial. Os tratamentos BAC210, BAC47, BAC381, BAC298, BAC26 apresentaram um menor potencial de inibição do fungo, que variou entre 7% a 14%.

Os tratamentos, BAC25, BAC223 e BAC272 apresentaram menores valores de porcentagens de inibição, que variaram entre 3% a 6%. Já os demais tratamentos apresentaram uma porcentagem de inibição muito próxima de 0, se igualando estatisticamente ao CONTROLE.

**Figura 6.** Porcentagem de inibição do crescimento micelial de: *Fusarium proliferatum* e *Fusarium guttiforme*, após o pareamento *in vitro* com diferentes isolados bacterianos oriundos do microbioma funcional de *Ananas spp.*, em função dos tratamentos.



**Figura 7.** Atividade antagonista *in vitro* de diferentes isolados bacterianos frente *Fusarium proliferatum*.



Fonte: Polyana Silva

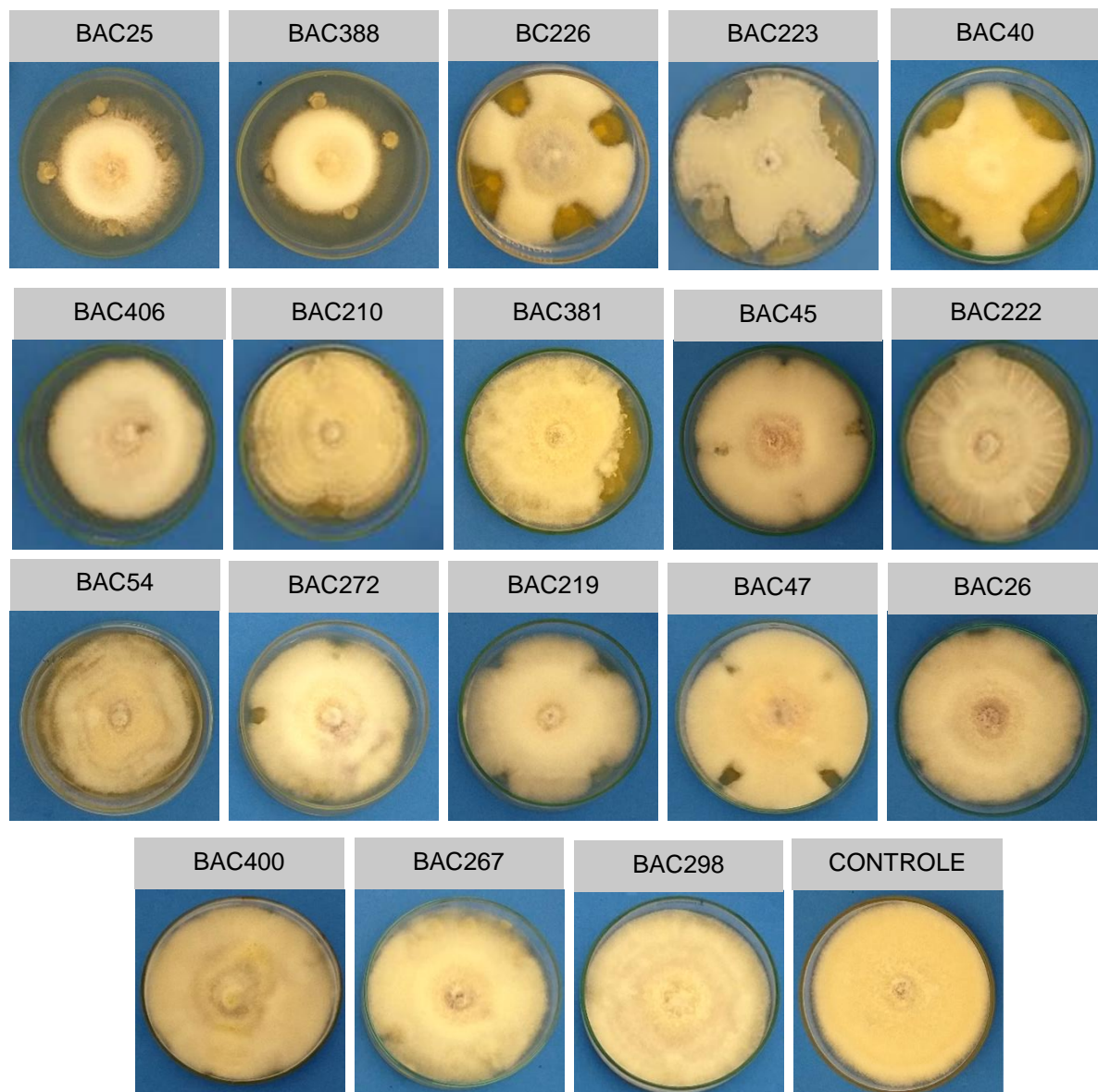
Já para *Fusarium guttiforme* (Figura 6 e Figura 8), os isolados bacterianos apresentaram efeito superior na inibição do crescimento micelial. Sendo que os tratamentos BAC25 e BAC388 se mostraram os mais promissores, incitando um percentual de inibição do crescimento micelial de 49% e 47%, respectivamente.

Seguidos dos tratamentos BAC226 e BAC223 que apresentaram percentuais médios de inibição de 36%. Os tratamentos BAC40, BAC406 e BAC210 também

foram capazes de reduzir o crescimento micelial, no entanto, com menores médias, que variaram de 25% a 35%.

Os tratamentos BAC381, BAC45, BA222, BAC54, BAC272, BAC219 e BAC47 também reduziram o crescimento de *F. guttiforme*, com médias que variaram entre 18% a 25%. Os demais tratamentos, não diferiram significativamente do CONTROLE.

**Figura 8.** Atividade antagonista *in vitro* de diferentes isolados bacterianos frente *Fusarium guttiforme*.

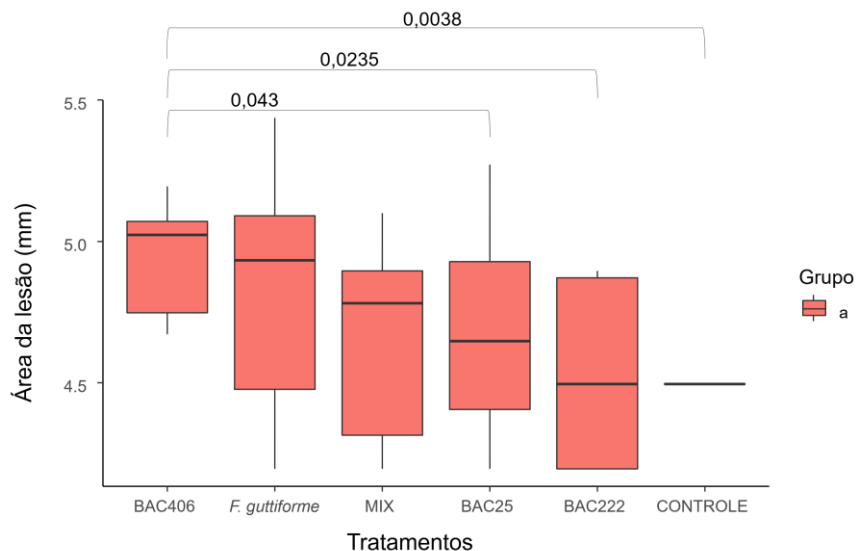


Fonte: Polyana Silva

### 3.3. Avaliação do potencial de isolados bacterianos oriundos do microbioma de *Ananas* spp. na supressão de *Fusarium guttiforme* em folhas destacadas de abacaxizeiro cv. 'Pérola'

Ao avaliar o diâmetro da lesão em folhas destacadas de abacaxizeiro cv. 'Pérola', é possível observar que houve redução da variável proporcionada pelos tratamentos BAC25 e BAC222, ao comparar os tratamentos pelo teste 't' par a par. (Figura 9).

**Figura 9.** Boxplot representativo para o diâmetro de lesões causadas por *Fusarium guttiforme* em folhas destacadas de abacaxizeiro cv. 'Pérola', em função dos tratamentos.



### 3.4. Avaliação do potencial de isolados bacterianos oriundos do microbioma de *Ananas* spp. na supressão de *Fusarium guttiforme* em mudas de abacaxizeiro cv. 'Pérola' em vasos

O potencial de supressão dos isolados também foi testado *in planta*, uma vez que o fungo foi inoculado na base do caule das mudas de abacaxizeiros tratadas com os diferentes isolados.

Todas as plantas apresentaram clorose (Figura 10). Os tratamentos BAC406, MIX e CONTROLE não diferiram significativamente entre si, demonstrando que os isolados não foram capazes de reduzir o avanço do sintoma.

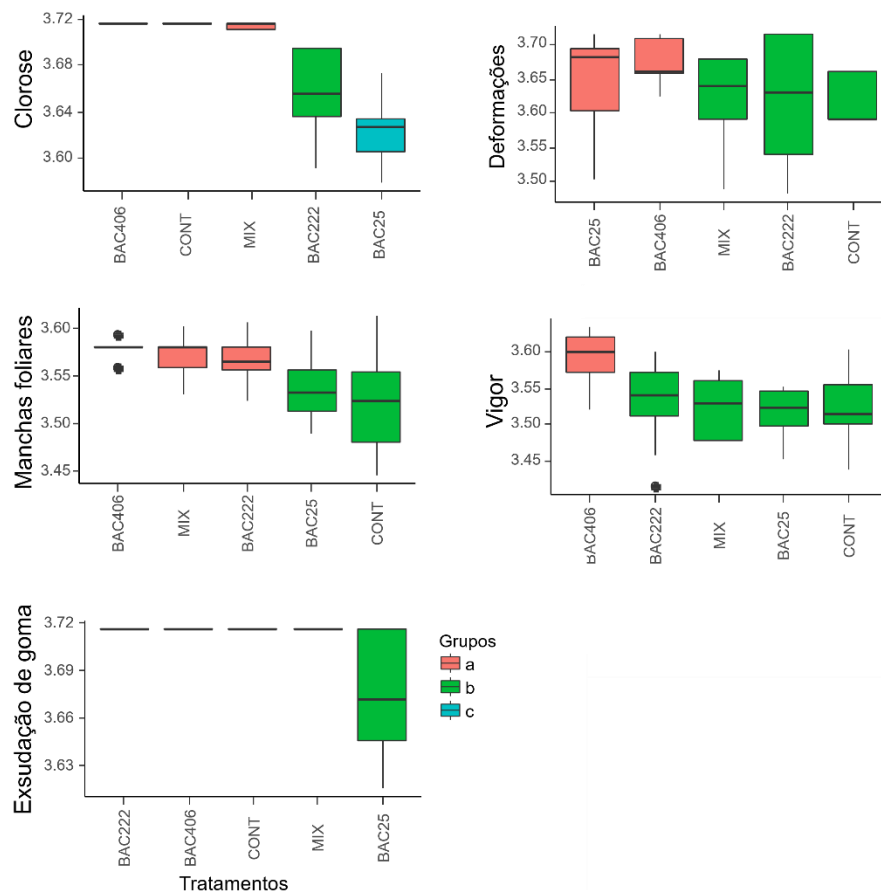
As plantas também apresentaram deformações em sua morfologia (Figura 10), e para esta variável foi possível observar que os tratamentos BAC406 e BAC25, foram capazes de reduzir o avanço deste sintoma.

Manchas foliares também foram exibidas pelas plantas (Figura 10), e para esta variável os tratamentos BAC406, MIX e BAC222 reduziram o avanço do sintoma.

Durante o período de avaliações, a maioria das mudas foram definhando e após a análise dos dados, foi possível verificar que para a variável vigor (Figura 10), o BAC406 foi o tratamento que apresentou melhores resultados, pois as plantas inoculadas com este tratamento findaram o período de avaliação mais vigorosas.

No que se refere ao sintoma exsudação de goma (Figura 10), o mesmo foi encontrado apenas no tratamento BAC25.

**Figura 10.** Boxplot representativo para a área abaixo da curva de progresso dos sintomas: Clorose; Deformações na morfologia da planta; Manchas foliares; Vigor; Exsudação de goma, em função dos tratamentos, para mudas microbiolizadas de abacaxizeiros cv. 'Pérola' inoculadas com *Fusarium guttiforme*.

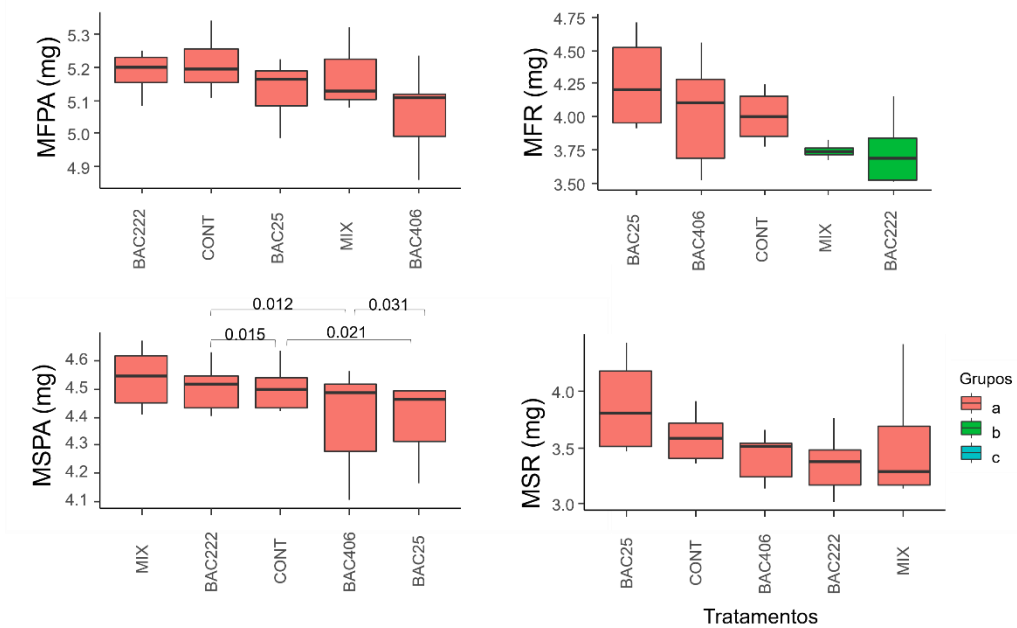


Para a massa fresca da raiz, os tratamentos BAC25 e BAC406 não diferiram significativamente do controle, não sendo capazes de gerar incremento para a variável. Os demais tratamentos causaram redução da massa fresca da raiz.

Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos para a massa fresca da parte aérea e massa seca da raiz (Figura 11).

Para a massa seca da parte aérea (Figura 11) é possível observar que houve incremento proporcionado pelos tratamentos BAC25 e BAC222, ao comparar os tratamentos pelo teste 't' par a par.

**Figura 11.** Boxplot representativo das variáveis: Massa fresca da parte aérea; Massa fresca da raiz, Massa seca da parte aérea; Massa seca da raiz, em função dos tratamentos, para mudas microbiolizadas de abacaxizeiros cv. 'Pérola' inoculadas com *Fusarium guttiforme*.

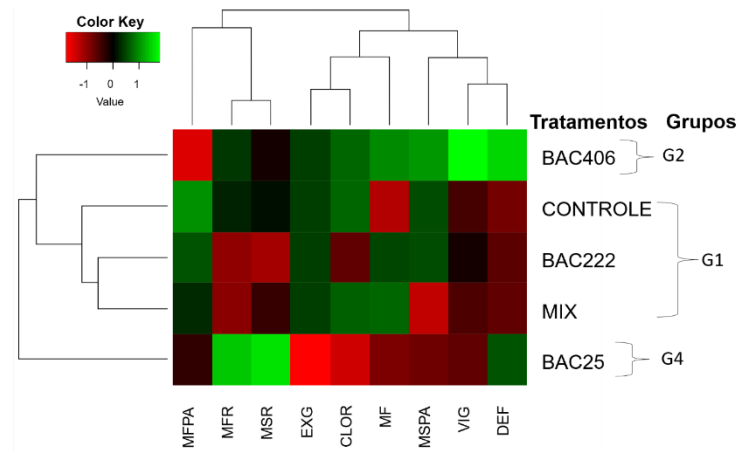


A verificação dos melhores tratamentos foi realizada a partir da construção do *heatmap* (Figura 12), onde foi possível observar a formação de três grupos. Sendo o G2 formado pelo tratamento BAC406, que reduziu o avanço da maioria dos sintomas, além de não causar redução na massa seca da parte aérea e a massa das raízes.

O G1 foi formado pelo CONTROLE, BAC222 e MIX que apresentaram alguns dos sintomas avaliados. O G4 foi constituído pelo tratamento BAC25 que não reduziu o avanço da maioria dos sintomas.

**Figura 12.** *Heatmap* formado a partir da área abaixo da curva de progresso das variáveis: Massa fresca da parte aérea (MFPA); Massa fresca da raiz (MFR); Massa seca da raiz (MSR); Exsudação de goma (EXG); Clorose (CLOR); Manchas foliares (MF) Massa seca da parte aérea (MSPA); Vigor (VIG), Deformações na morfologia da planta (DEF), em função dos tratamentos, para mudas microbiolizadas de abacaxizeiros cv. 'Pérola' inoculadas com *Fusarium guttiforme*.





#### 4. DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliado o potencial de promoção de crescimento de isolados bacterianos oriundos do microbioma funcional de *Ananas* spp., em mudas de abacaxizeiro cv. 'Pérola'. Foram avaliados diferentes parâmetros de crescimento e foi calculada a área abaixo da curva de progresso para cada variável. A partir de então foi realizado teste de Skott-Knott e foram elaboradas diferentes representações gráficas para uma melhor compreensão dos resultados.

Também foram realizados testes visando a verificação do potencial de antagonismo destes isolados contra *Fusarium* spp. em laboratório e em campo, sendo realizados testes de pareamento *in vitro* e avaliação deste potencial de supressão em folhas destacadas e em mudas cultivadas em vasos.

No que se refere à verificação do potencial de crescimento, apenas o tratamento BAC25 apresentou incremento para a maioria das variáveis analisadas, demonstrando ser um isolado que pode ser utilizado para promover crescimento de abacaxizeiro cv. 'Pérola'.

O tratamento BAC25 foi composto por um isolado bacteriano pertencente ao gênero *Acinetobacter*, isolado de amostras de caule de abacaxizeiros oriundos de ambiente cultivado, a partir das pesquisas realizadas por Souza (2019). O isolado foi capaz de proporcionar incremento para a altura da planta, número de folhas, diâmetro da roseta e comprimento da folha 'D'.

Bactérias do gênero *Acinetobacter* podem ser encontradas tanto no solo, quanto vivendo endofiticamente em vegetais. São capazes de proporcionar



incremento em parâmetros de crescimento, aumentando a produtividade de plantas, bem como são capazes de melhorar a qualidade nutricional do solo disponibilizando nutrientes essenciais para uma melhor absorção pelas plantas (DEY *et al.*, 2004).

Segundo Gulati *et al.* (2009) estes microrganismos também são capazes de secretar indutores de crescimento, além de possuir ação antifúngica, induzindo resistência sistêmica nas plantas. E em seus estudos, os autores constataram que uma espécie de *Acinetobacter* foi capaz de aumentar significativamente o comprimento das raízes de mudas de ervilha e de milho, quando comparadas às plantas controle.

No que se refere a inibição *in vitro* do crescimento micelial, para *Fusarium proliferatum* tratado com isolados bacterianos associados ao microbioma de *Ananas* spp., foi possível observar que o isolado fúngico respondeu de maneira semelhante para a maioria dos tratamentos testados, uma vez que não foi observada a formação de halo de inibição e não houve redução no crescimento micelial acima de 22%.

Para este isolado, o tratamento que apresentou a melhor inibição foi o BAC406, constituído por um isolado bacteriano endofítico de caule filogeneticamente relacionado à *Acinetobacter calcoaceticus*, que reduziu em 22% o crescimento micelial do fungo em questão.

Já o pareamento entre os isolados e *Fusarium guttiforme*, apresentou percentuais de inibição completamente diferentes. O tratamento BAC25 foi o que apresentou melhores resultados, causando uma redução de 49% do tamanho da colônia fúngica. Sendo este tratamento também composto por um isolado bacteriano pertencente ao gênero *Acinetobacter*.

Os resultados encontrados neste trabalho estão de acordo com os encontrados por Liu *et al.* (2007), onde os autores constataram que isolados de *Acinetobacter* sp. podem atuar como antagonistas para fungos fitopatogênicos, dentre eles, *Fusarium* sp. Resultado semelhante também foi observado por Assumpção *et al.* (2009), onde foi avaliado o potencial antagonista de bactérias do gênero *Acinetobacter* contra *Fusarium oxysporum*.

Outro tratamento que exibiu bons resultados foi o BAC388, composto por um isolado endofítico de caule oriundo de mudas de abacaxizeiros de ambiente cultivado, que até o momento ainda não foi identificado.

De acordo com a literatura, os microrganismos competem entre si de diversas formas. Sendo que a redução do crescimento do fungo pode estar associada à liberação de metabólitos pelas bactérias ou até mesmo por competição dos nutrientes disponíveis nas condições de cultivo *in vitro*.

Em estudos realizados por Xue *et al.* (2009), foi demonstrado o potencial de controle de *Acinetobacter* sp. contra *Ralstonia solanacearum*, causadora da murcha bacteriana do tomateiro, onde foi verificado que *Acinetobacter* sp. apresentou efeito antagonista, reduzindo a quantidade de inóculo e conseqüentemente, proporcionando aumento tanto na biomassa quanto no rendimento de tomateiros acometidos pela doença, sendo o primeiro estudo correlacionando *Acinetobacter* sp. com controle biológico.

Outros tratamentos que apresentaram inibição do crescimento micelial para *Fusarium proliferatum*, no entanto com menores médias, foram o BAC210, composto por um isolado bacteriano endofítico de caule ainda não identificado, o BAC381 composto por um isolado bacteriano também endofítico de caule pertencente ao gênero *Acinetobacter* e o BAC47, composto por um isolado bacteriano de solo pertencente ao gênero *Arthrobacter*.

Bactérias pertencentes ao gênero *Arthrobacter* podem ser encontradas em diversos ambientes e possuem capacidade para fixação de nitrogênio e controle biológico, como demonstrado em pesquisas realizadas por Zhang *et al.* (2018), onde *Arthrobacter* foi utilizada no controle biológico contra *Ralstonia solanacearum*, sendo, segundo os autores o primeiro relato onde *Arthrobacter* sp. pode ser utilizada como agente de controle biológico.

Apesar de não apresentar efeito significativo para a redução do crescimento micelial, o tratamento BAC222 foi o único que induziu a produção de ácido fusárico, substância capaz de aumentar a toxicidade dos metabólitos do fungo, que afeta diretamente processos bioquímicos relacionados às mudanças na permeabilidade da membrana (SINGH; SINGH; UPADHYAY, 2017). Desta maneira pode-se inferir que este isolado causou algum tipo de estresse no fungo, a ponto de fazê-lo liberar esta substância para inibir a possível ação antagonista da bactéria. No entanto, devem ser feitos testes para identificação da presença desta possível substância.

Já para *Fusarium guttiforme*, os tratamentos BAC226 e BAC223 também apresentaram bons percentuais na redução do crescimento micelial. Ambos os tratamentos foram compostos por isolados oriundos de solo de ambiente cultivado de abacaxizeiros, no entanto o BAC226 foi composto por um isolado pertencente ao gênero *Enterobacter* e o BAC223 por um isolado do gênero *Bacillus*.

Bactérias do gênero *Enterobacter* também foram testadas como antagonistas no controle de *Pythium*, por Kazerooni *et al.* (2020) e foi verificado um potencial antagonista de 63% na incidência da doença podridão em pepinos, demonstrando que alguns isolados deste gênero podem apresentar efeito antagonista contra fungos causadores de doenças em plantas comerciais.

Já o efeito antagonista de espécies do gênero *Bacillus*, vem sendo bastante estudado e é possível observar um grande potencial de antagonismo para diferentes espécies de *Fusarium*, como pode ser observado em pesquisas realizadas por Venegas *et al.* (2005), Corrales *et al.* (2012), Maciel *et al.* (2014), Carrer Filho, Dianese e Cunha (2015) e González *et al.* (2017).

Apesar dos tratamentos BAC222 e BAC406 não estarem entre os que apresentaram maiores percentuais na redução do crescimento micelial de *Fusarium guttiforme*, estes isolados também foram testados na supressão do fungo com intuito de verificar como se comportariam ao serem inoculados *in vivo*, uma vez que já apresentaram resultados satisfatórios como promotores de crescimento vegetal neste trabalho.

Para a supressão de *Fusarium guttiforme* em mudas de abacaxizeiros cv. 'Pérola' cultivadas em vasos, o tratamento que apresentou melhores resultados foi o BAC406, uma vez que ao final do período de avaliações, as mudas pertencentes a este tratamento aparentavam estar mais saudáveis e vigorosas do que as mudas oriundas de outros tratamentos.

Não foram encontrados na literatura estudos que abordam sobre a utilização de bactérias do gênero *Acinetobacter* no controle biológico em plantas. Trotel-Aziz *et al.* (2008) avaliaram o potencial de controle de *Acinetobacter* sp. no controle de *Botrytis cinerea*, fungo causador da podridão cinzenta em vegetais, e verificaram potencial antagonico direto sob o fungo.

Bactérias podem exibir potencial antagonista contra fungos a partir de diferentes mecanismos, como os antagonistas diretos, ou pela resistência induzida na planta hospedeira. Os mecanismos antagonistas diretos podem ser a partir da antibiose, parasitismo e competição por nutrientes e habitat, que faz com que o crescimento e desenvolvimento do antagônico reduza ou inexista em função da presença do antagonista (SANTOS, 2014).

Já a resistência sistêmica age pela indução da ativação do sistema de defesa das plantas após a exposição ao patógeno, que ocorre pela ação de substâncias bióticas ou abióticas (MÉLO-FILHO e GUENTHER, 2015).

Estudos como este e os supracitados, demonstram a importância da utilização de microrganismos no controle biológico e que, como visto neste trabalho também podem possuir capacidade para promoção de crescimento em plantas, demonstrando que esta pode ser uma alternativa viável e sustentável a longo prazo.

No entanto, torna-se necessária a identificação de alguns dos melhores isolados obtidos no experimento que ainda não foram identificados, para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na supressão de *Fusarium* spp.

## 5. CONCLUSÕES

- O tratamento BAC25 proporcionou incremento para os parâmetros de crescimento de mudas de abacaxizeiro cv. 'Pérola' cultivadas em vasos.
- Os isolados bacterianos testados exibiram um potencial antagonista maior sob *Fusarium guttiforme*, com ênfase para os tratamentos BAC25 e BAC388.
- O tratamento BAC406 reduziu a ocorrência da maioria dos sintomas associados à fusariose, em mudas de abacaxizeiro cv. 'Pérola'.

## 6. REFERÊNCIAS

- ALDONATE, M. L.; JIMÉNEZ, P.; ULLA, E. L. Caracterización de rizobacterias nativas y su efecto en la promoción de crecimiento de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en condiciones controladas. **Revista Agronómica del Noroeste Argentino**, v. 39, n. 2, p. 89-98, 2019.
- ASSUMPÇÃO, L. C.; LACAVA, P. T.; DIAS, A. C. F; AZEVEDO, J. L. de; MENTEN, J. O. M. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 5, p. 503-510, 2009.
- BEZERRA, G. de A.; DIAS, V. M.; SANTOS, P. H. D. dos; AREDES, F. A. S.; SILVEIRA, S. F. da. Identificação e seleção de espécies de *Trichoderma* spp. endofíticos de bromélias de restingas como agentes de biocontrole da fusariose em frutos de abacaxi. **Summa Phytopathologica**, v. 45, n. 2, p. 172-178, 2019.
- CABRAL, J. R. S.; JUGHANS, D. T. **Variedades de abacaxi**. Cruz das Almas – BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2003. 4p. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Comunicado técnico, 114).
- CAETANO, L. C. S.; VENTURA, J. A.; BALBINO, J. M. S. Comportamento de genótipos de abacaxizeiro resistentes à fusariose em comparação a cultivares comerciais suscetíveis. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, n. 2, p. 404-409, 2015.
- CAMARGO, L. M. P. C. A.; BARACHO, I. R. Virulência de linhagens de *Fusarium moniliforme* Sheld. var. *subglutinans* Wr. e Rg. **Summa Phytopathologica**, v. 3, n. 3, p. 215-220, 1977.
- CARRER FILHO, R.; DIANESE, É. C.; CUNHA, M. G. da. Supressão da murcha de fusário em tomateiro por rizobactérias do gênero *Bacillus*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 45, n. 3, p. 356-363, 2015.
- CORRALES, L. C.; SANCHEZ, L. C.; CORVO, J.; JEWEL, J. A.; MARQUEZ, C. Efecto biocontrolador de '*Bacillus*' spp., frente a '*Fusarium*' sp., bajo condiciones de invernadero en plantas de tomillo ('*Thymus vulgaris* L.'). **Nova**, v. 10, n. 17, p. 64, 2012.
- DEPARTAMENTO DE ECONOMIA RURAL (DERAL). Disponível em <[http://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/arquivos\\_restritos/files/documento/2020-01/fruticultura\\_2020.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2020-01/fruticultura_2020.pdf)> Acessado em: 05 fev. 2022.
- DEY, R.; PAL K. K.; BHATT D.M.; CHAUHAN, S.M. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. **Microbiology Research**, v. 159, p.371–394, 2004.

ESPINOZA, L. R. M.; GASTÉLUM, F. R.; RAMÍREZ, C. J. D. Diversity of endophytic bacteria associated with tomato plants (*Solanum lycopersicum*). **Mexican Journal of Phytopathology**, v. 38, n.2, p. 307-319, 2020.

FERREIRA, T. C.; BETTIOL, W. Biocontrol of soilborne pathogens and growth promotion by *Bacillus* spp. in corn. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 15, n. 4, p. 337-356, 2019.

GONZÁLEZ, C. A. R.; BUITRAGO, J. F.; BETANCURT, A. D.; CARDENAS, R. L. Actividad antagonista de *Bacillus*. sp frente a *Fusarium oxysporum*: un aporte a la agricultura sostenible. **Revista Nova**, v. 3, n. 1, p. 9-19, 2017.

GULATI, A.; VYAS, P.; RAHI, P.; KASANA, R. C. Plant growth-promoting and rhizosphere-competent *Acinetobacter rhizosphaerae* strain BIHB 723 from the cold deserts of the Himalayas. **Current Microbiology**, v. 58, n. 4, p. 371-377, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção Agrícola - Lavoura Temporária**. Disponível em <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/abacaxi/br>> Acessado em: 10 de Junho de 2022.

KAZEROONI, E. A.; AL-SHIBLI. H.; NASEHI, A.; AL-SADLI, A. M. Endophytic *Enterobacter cloacae* exhibits antagonistic activity against *Pythium* damping-off of cucumber. **Ciência Rural** [online]. 2020, v. 50, n. 8. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20191035>>. Acesso em: 01 de set. 2022.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia**. 3.ed. São Paulo: v.2. Agronômica Ceres. 1997, 774p.

LIU, C. H.; CHEN, X.; LIU, T. T.; LIAN, B.; GU, Y.; CAER, V.; XUE, Y. R.; WANG, B. T. Study of the antifungal activity of *Acinetobacter baumannii* LCH001 *in vitro* and identification of its antifungal components. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, n. 2, p. 459-466, 2007.

MACIEL, C. G.; WALKER, C.; MUNIZ, M. F. B.; ARAÚJO, M. M. Antagonismo de *Trichoderma* spp. e *Bacillus subtilis* (UFV3918) a *Fusarium sambucinum* em *Pinus elliottii engelm*. **Revista Árvore**, v. 38, n. 3, p. 505-512, 2014.

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

MCKINNEY, H. H. Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedlings by *Helminthosporium sativum*. **Journal of Agricultural Research**, v. 26, n. 5, p. 195-218, 1923.

MELO, L. G. L.; SILVA, E. K. C. S.; CAMPOS NETO, J. M.; LINS, S. R. O. RODRIGUES, A. A. C., OLIVEIRA, S. M. A. de. Indutores de resistência abióticos no controle da fusariose do abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.51, n.10, p.1703-1709, 2016.

MÉLO-FILHO, L. R.; GUENTHER, M. A Resistência Sistêmica Induzida como Alternativa Sustentável ao Uso de Agrotóxicos. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 8, n. edição especial, p. 27, 2015.

NIRENBERG, H.; O'DONNELL, K. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, v. 90, n. 3, p. 434-458, 1998.

PENTEADO, S. R. C.; CARPANEZZI, A. A.; NEVES, E. J. M.; SANTOS, A. F. dos; FLECHTMANN, C. A. H. Escolitídeos como bioindicadores do “declínio do nim” no Brasil. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 31, n. 65, p. 69–73, 2011.

R Development Core Team (2017). **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>. Acessado em: 10 de agosto de 2022.

REINHARDT, D. H. R. C.; BARTHOLOMEW, D. P.; SOUZA, F. V. D.; CARVALHO, A. C. P. P. de; PÁDUA, T. R. P. de; JUNGHANS, D. T.; MATOS, A. P. de. Advances in pineapple plant propagation. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, n. 6, 2018.

SANTOS, D. R. dos. **Isolamento e seleção de bactérias antagonistas a fitopatógenos e detecção de genes associados à produção de compostos bioativos**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2014.

SPOLAOR, L. T.; GONÇALVES, L. S. A.; SANTOS, O. J. A. P. dos; OLIVEIRA, A. L. M. de; SCAPIM, C. A.; BERTAGNA, F. A. B.; KUKI, M. C. Plant growth-promoting bacteria associated with nitrogen fertilization at topdressing in popcorn agronomic performance. **Bragantia**, v. 75, n. 1, p. 33-40, 2016.

TROTEL-AZIZ, P.; COUDERCHET, M.; BIAGIANTI, S.; AZIZ, A. Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* spp. Mediating grapevine resistance against *Botrytis cinerea*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 64, p. 21–32, 2008.

VENEGAS, E. G.; CIAMPI, P. L.; COLLADO, G. L.; COSTA, L. M.; FUENTES, P. R.; NISSEN, M. J.; SCHOBITZ, T. R.; SCHOEBITZ, C. M. Aislamiento e identificación de bacterias nativas del género *Bacillus Cohn* antagonistas de cepas patógenas de *Fusarium* Link. en cala. **Agro Sur**, v. 33, n. 2, p. 1-12, 2005.

VENTURA, J. A.; ZAMBOLIM, L. Controle das doenças do abacaxizeiro. In: ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R. do; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H. **Controle de doenças de plantas fruteiras**. Viçosa - MG: UFV, 2002. Cap. 8. p. 445-509.