

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

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE BACTERIANA DE *Ananas
comosus* PELA ABORDAGEM METAGENÔMICA E
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE ABACAXIZEIROS
'BRS IMPERIAL' POR MICRORGANISMOS ASSOCIADOS
AO MICROBIOMA DE *Ananas* spp.**

CINTIA PAULA FEITOSA SOUZA

**CRUZ DAS ALMAS / BAHIA
2021**

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE BACTERIANA DE *Ananas comosus*
PELA ABORDAGEM METAGENÔMICA E PROMOÇÃO DE
CRESCIMENTO DE ABACAXIZEIROS 'BRS IMPERIAL' POR
MICRORGANISMOS ASSOCIADOS AO MICROBIOMA DE *Ananas*
spp.**

CINTIA PAULA FEITOSA SOUZA

Engenheira Agrônoma

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2013

Tese 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 Doutora em Ciências Agrárias (Área de Concentração: Fitotecnia)

Orientadora: Dra. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa

Coorientadora: Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza

Coorientador: Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira

Coorientadora: Dra. Cláudia Fortes Ferreira

CRUZ DAS ALMAS / BAHIA

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

S729a

Souza, Cintia Paula Feitosa.

Análise da diversidade bacteriana de *Ananas comosus* pela abordagem metagenômica e promoção de crescimento de abacaxizeiros 'BRS Imperial' por microrganismos associados ao microbioma de *Ananas spp* / Cintia Paula Feitosa Souza._ Cruz das Almas, Bahia, 2021.

157f.; il.

Orientadora: Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa.

Coorientadora: Fernanda Vidigal Duarte Souza.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Doutorado em Ciências Agrárias.

1.Abacaxi – Cultivo. 2.Abacaxi – Micropropagação – Crescimento. 3.Microrganismos – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Oliveira, Saulo Alves Santos de. III.Ferreira, Cláudia Fortes. IV.Título.

CDD: 634.774

Ficha elaborada pela Biblioteca Central de Cruz das Almas - UFRB.
Responsável pela Elaboração - Antonio Marcos Sarmiento das Chagas (Bibliotecário - CRB5 / 1615).
(os dados para catalogação foram enviados pelo usuário via formulário eletrônico).

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

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE BACTERIANA DE *Ananas comosus*
PELA ABORDAGEM METAGENÔMICA E PROMOÇÃO DE
CRESCIMENTO DE ABACAXIZEIROS 'BRS IMPERIAL' POR
MICRORGANISMOS ASSOCIADOS AO MICROBIOMA DE *Ananas*
spp.**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE
CINTIA PAULA FEITOSA SOUZA**

Realizada em 25 de Fevereiro de 2021

Dra. Andresa Priscila de Souza Ramos
Analista da Embrapa Mandioca e Fruticultura

Prof^a. Dr^a. Maria Angélica Pereira de Carvalho Costa
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB

Prof^a. Dr^a. Elizabeth Amélia Alves Duarte
Faculdade Maria Milza - FAMAM

Dr. Harllen Sandro Alves Silva
Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura

Dr. Tullio Raphael Pereira de Pádua
Pesquisador da Embrapa Mandioca e Fruticultura

Aos meus amados pais, que se empenharam em minha educação, com provisão,
alento, e o olhar atento, sem vacilar, sempre me estenderam a mão.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao criador de todas as coisas que mantém a minha vida e me dá forças para prosseguir...

Aos meus pais e irmãos pelo incentivo e apoio em todos os momentos.

Ao meu amado esposo, que está sempre ao meu lado me acalentando e dando forças.

A Dra. Maria Angélica que aceitou me orientar também no doutorado, que foi a minha primeira orientadora e agora finalizo esse ciclo com ela também. Obrigada pela paciência e disponibilidade.

A Dra. Fernanda Vidigal que é uma orientadora excelente, que direciona, apoia e vibra com os resultados. Obrigada pela paciência, orientação e auxílio nessa jornada! Você idealizou, forneceu os meios e hoje colhemos o fruto desse trabalho!

Ao Dr. Saulo pela disposição, direcionamento e auxílio nas diversas etapas do trabalho.

A Dra. Cláudia pela atenção, disponibilidade, apoio e orientação.

Aos companheiros de trabalho nos laboratórios de fitopatologia, biologia molecular, cultura de tecidos e campo, agradeço a todos, mas especialmente a Dra. Andresa, Dr. Leandro e Benedito que sempre apoiaram e auxiliaram para o bom andamento do trabalho.

Ao meu amigo Zanon, no momento que mais precisei você se dispôs a me ajudar! Obrigada de coração!

Ao Dr. Hilo pela amizade e contribuições!

Ao Dr. Valter Magalhães por sua disponibilidade, atenção e contribuição para finalização do trabalho!

Ao Dr. Tiago e Dra. Larissa pelas contribuições valiosas com a análise metagenômica!

A UFRB, EMBRAPA e CAPES pela concessão da bolsa de estudos, estrutura e apoio à pesquisa!

Muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO	1
REFERENCIAL TEÓRICO	3
 ARTIGO 1	
ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DO MICROBIOMA DE <i>Ananas comosus</i> EM AMBIENTE DE OCORRÊNCIA NATURAL E CULTIVO COMERCIAL POR METAGENÔMICA 16S	18
 ARTIGO 2	
MICROORGANISMOS ASSOCIADOS AO GÊNERO <i>Ananas</i> COMO AGENTES PROMOTORES DO CRESCIMENTO EM ABACAXIZEIROS CV. 'BRS IMPERIAL'.....	63
 ARTIGO 3	
EFEITO DE BACTÉRIAS PROVENIENTES DO MICROBIOMA FUNCIONAL DE <i>Ananas comosus</i> NO CRESCIMENTO DA CV. 'BRS IMPERIAL'.....	116
 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	148

Análise da diversidade bacteriana de *Ananas comosus* pela abordagem metagenômica e promoção de crescimento de abacaxizeiros 'BRS Imperial' por microrganismos associados ao microbioma de *Ananas* spp.

Resumo: Nas últimas décadas muitos estudos têm sido realizados a fim de compreender que tipo de interações ocorrem nos microbiomas associados aos cultivos de importância econômica. Nesse sentido, foi realizada uma investigação da estrutura do microbioma associado ao gênero *Ananas* em ambiente de ocorrência natural e cultivo comercial com abordagem metagenômica 16S. Foram ainda realizados estudos acerca do uso de microrganismos provenientes do microbioma associado, na promoção do crescimento de abacaxizeiros na fase *in vitro* e no período de aclimatização de plantas micropropagadas. Além disso, os microrganismos com os melhores resultados nas etapas citadas anteriormente foram testados quanto à capacidade de promoção de crescimento de abacaxizeiros em canteiro e vasos. Quanto à análise metagenômica, os resultados obtidos indicam que os solos rizosféricos e as folhas de ambiente natural abrigam maior abundância de bactérias, assim como a diversidade populacional revelada pelo escalonamento multidimensional, diagrama de Venn e índices de diversidade, foi mais baixa para ambiente cultivado em relação ao natural. Além disso, o microbioma do solo e dos compartimentos das plantas, são diferentes entre os dois ambientes em nível de filo, família e gênero, mas apesar dessa diferença, alguns grupos bacterianos foram compartilhados entre os ambientes. Quanto à microbiolização em abacaxizeiros *in vitro*, os melhores resultados foram obtidos em plantas tratadas com bactérias, com destaque para as de ambiente cultivado, e os efeitos dessa microbiolização *in vitro* foram sentidos também na fase de aclimatização, com o incremento em variáveis de importância, quando se considera o crescimento da planta. Nesse mesmo estudo, foi realizado o sequenciamento de bactérias associadas ao gênero *Ananas* e com isso foram identificados gêneros de importância agrícola. Para a os abacaxizeiros em canteiros e vasos, os resultados obtidos mostraram que a aplicação dos mixes de bactérias em canteiros resultou em plantas maiores e mais vigorosas que o controle, com destaque para o tratamento à base de bactérias endofíticas, e quando testados individualmente em vasos, essas bactérias também foram eficientes na promoção de crescimento. Os resultados obtidos nesse estudo são promissores para aplicações futuras em

diferentes etapas do cultivo desta fruteira. Trabalhos futuros deverão focar do desenvolvimento de produtos tecnológicos que permitam o uso destes microrganismos no sistema de produção do abacaxizeiro, tornando-o mais produtivo e sustentável.

Palavras-chave: Metagenômica, abacaxizeiros, microbiolização, promoção do crescimento.

Bacteria diversity in *Ananas comosus* using metagenomics and growth promotion in 'BRS Imperial' pineapple by microorganisms associated to the microbiome of *Ananas* spp.

Abstract: In the last decades, many studies have been carried out in order to understand how interactions are in microbiomes associated with economically important crops. So, an investigation of the structure of the microbiome associated with the *Ananas* genus was carried out in natural environment (natural population) and in commercial cultivation areas through metagenomic 16S analysis. Studies were also carried out to use of microorganisms from the associated microbiome, to promote growth of pineapples at the *in vitro* phase and in the acclimatization step of micropropagated plants. In addition, the microorganisms with the best results in these steps were evaluated for the ability to promote pineapple growth in seed beds and pots. As for the metagenomic analysis the results obtained indicate that the rhizospheric soils and the leaves of the natural environment harbor a greater abundance of microorganisms, as well as the population diversity revealed by the multidimensional scaling, Venn diagram and diversity indices, was lower for the cultivated environment than the natural one. In addition, the microbiome of soil and plant compartments are different between the two environments at the phylum, family and genus level, but despite this difference, some bacterial groups have been shared between the environments. As for microbiolization in pineapples *in vitro*, the best results were obtained in plants treated with bacteria, with emphasis on those from the cultivated environment, and the effects of this microbiolization *in vitro* were also felt in the acclimatization phase, with the increase in variables of importance, when considering plant growth. In that same study, the sequencing of bacteria associated with the genus *Ananas* was carried out and with this general of agricultural importance were identified. For the pineapples in beds and pots, the results obtained show that the application of mix of bacteria in beds has resulted in plants that are larger and more vigorous than the control, with emphasis on the treatment based on endophytic bacteria and when tested individually in pots, these bacteria were also efficient in promoting growth. The results obtained in this study are promising for future applications in different stages. Future work should focus on the development of technological products that allow the use of these

microorganisms in the pineapple production system, making it more productive and sustainable.

Keywords: Metagenomic, pineapples, microbiolization, promoting growth.

INTRODUÇÃO

A relação das plantas com a comunidade microbiana que as circunda tem sido objeto de vastos estudos na última década. A partir desses trabalhos surgem evidências que existe uma rede complexa de relações que envolvem interações genéticas, bioquímicas, físicas e metabólicas entre a planta, as comunidades microbianas associadas a ela e o seu meio ambiente (TRIVEDI et al., 2020).

Plantas e microrganismos coexistem com relações específicas. As plantas depositam seu carbono via fotossíntese, diretamente no ambiente, disponibilizando nutrientes à comunidade microbiana, influenciando sua composição e atividades (BERENDSEN et al., 2012). As comunidades microbianas do solo representam o maior reservatório de diversidade biológica conhecido no mundo até o momento. A rizosfera, é influenciada pelo metabolismo das plantas via exsudatos radiculares (PHILIPPOT et al., 2013), e pode conter até 1.011 células microbianas por grama de raiz e mais de 30.000 espécies procarióticas. Além disso, o número de genes microbianos presentes na rizosfera ultrapassa de longe o número de genes de plantas (MENDES et al., 2013).

Entender a funcionalidade das interações *planta-microbioma* e os fatores envolvidos na formação da comunidade pode levar a uma melhor compreensão, de como as mesmas podem se beneficiar dessa associação. (COMPANT et al., 2019). Esses benefícios estão relacionados, principalmente aos aspectos de crescimento, desenvolvimento, nutrição, doenças e produtividade (MENDES et al., 2013) e podem ser diretos ou indiretos. Os benefícios diretos, normalmente, são a transformação e a translocação de nutrientes essenciais no solo para torná-los disponíveis para as plantas, como fixação de nitrogênio, por exemplo, mas também a mitigação de estresses ambientais, como a seca e a proteção contra fitopatógenos por meio da competição, antibiose e produção de enzimas hidrolíticas (TRIVEDI et al., 2020).

O termo holobionte tem sido usado reconhecendo que o hospedeiro e toda a microbiota associada interagem e atuam de maneira combinada. As plantas recrutam ativamente microrganismos altamente diversos, que por sua vez desempenham funções importantes e benéficas para seu hospedeiro com papel relevante na proteção das plantas contra pragas e patógenos, bem como sua

importância para o crescimento da planta e resiliência a diversos tipos de estresse (SESSITSCH et al., 2019).

Por outro lado, os sistemas agrícolas atuais têm enfrentado grandes desafios, que vão desde as mudanças climáticas, o desenvolvimento demográfico que eleva a necessidade de maior produtividade, até uma demanda crescente por uma produção sustentável. Essa exigência por cultivos mais sustentáveis, implica em uma redução significativa das práticas agrícolas com base em defensivos químicos, entre outros poluentes.

Aplicar os princípios e as potencialidades do microbioma associado às plantas de cultivos agrícolas importantes, com a finalidade de enfrentar esses desafios, tem tido cada vez mais destaque com avanços importantes nos últimos anos (MENDES et al., 2018; LONGLEY et al., 2020).

Esse trabalho busca o uso de microrganismos associados ao gênero *Ananas*, ao qual pertence o abacaxizeiro (*Ananas comosus* var. *comosus* (L.) Merrill), fruteira de importância econômica no Brasil e no mundo, para a solução de problemas, que incluem desde a produção de mudas até a supressão de doenças como a fusariose e a murcha do abacaxizeiro. A partir dos estudos de Souza et al. (2019) quantificaram e compararam a diversidade de microrganismos cultiváveis existentes no solo rizosférico e em tecidos internos de plantas do gênero *Ananas* oriundas de três ambientes diferentes: populações naturais, áreas cultivadas e uma área de conservação ex situ - Banco de Germoplasma de Abacaxi (Pineapple GB).

O presente trabalho avançou a partir de uma análise metagenômica que permitiu observar como os diferentes ambientes influenciam na composição e abundância de bactérias, um estudo de filogenia, assim como deixou evidente que alguns grupos de microrganismos associados ao gênero *Ananas*, são capazes de promover o crescimento de mudas micropropagadas de abacaxizeiro em diferentes etapas.

REFERENCIAL TEÓRICO

Importância do microbioma

O aumento da produtividade agrícola juntamente com a necessidade de sistemas de produção mais sustentáveis, tornou-se um desafio concreto para os cultivos de importância econômica. A manipulação das funções do microbioma no contexto da produção agrícola tem grande potencial para fornecer soluções para os principais desafios atuais relacionados à segurança alimentar, degradação ambiental e aumento de produtividade dos cultivos voltados para alimentação e agricultura. Essa é uma abordagem potencialmente viável para a próxima revolução verde e com viés ambientalmente sustentável.

Fatores abióticos modulam a estrutura funcional e a diversidade do microbioma associado à planta, entre esses fatores estão: propriedades do solo, estado nutricional do solo e condições climáticas. Além disso, fatores bióticos como a idade da planta ou estágio de desenvolvimento, espécie ou cultivar, e fitossanidade, igualmente interferem no microbioma associado (BERG; SMALLA, 2009).

Apesar da maioria das pesquisas realizadas estarem mais focadas nas interações entre plantas e microrganismos no âmbito da rizosfera, ambiente no qual a interface raiz-solo é influenciada pela planta via exsudatos radiculares e pelo microbioma do solo (PHILIPPOT et al., 2013), os microrganismos também podem colonizar a maioria dos tecidos ou compartimentos das plantas (BERG et al., 2014).

No microbioma da rizosfera existem desde microrganismos benéficos às plantas, quanto os fitopatogênicos e os patogênicos ao homem (BERENDSEN et al., 2012). Berg e Smalla (2009) mencionam que tanto a planta quanto o solo influenciam a composição da comunidade da rizosfera e o nível de influência depende da espécie/genótipo da planta, de seus metabólitos e da qualidade do solo. Estudos recentes mostram que as plantas selecionam os microrganismos que podem colonizar suas raízes e provavelmente outros órgãos (LEBEIS et al., 2015).

Xiao et al. (2017) descobriram que o microbioma rizosférico é influenciado principalmente pelo tipo de solo e os endófitos de raízes são influenciados pela espécie de planta. A montagem diferencial do microbioma em diferentes espécies de plantas é atribuída à variação no consumo de recursos pela planta (FITZPATRICK et al., 2018). De acordo com pesquisas as bactérias endofíticas não estão sujeitas à competição por nutrientes que normalmente ocorre na rizosfera, e têm maior eficiência do que bactérias colonizadoras da rizosfera na promoção do crescimento, absorção de água e na supressão de microrganismos deletérios, em razão de se encontrarem no interior do sistema radicular (SANTOS et al., 2005).

Vandenkoornhuyse et al. (2015) apontam que há uma necessidade em compreender como os comportamentos de interação da planta e microrganismos evoluíram, além de também entender as funções ecológicas destes, especialmente no que se refere às interações bióticas dentro da microbiota heterogênea que envolve sinalizações moleculares complexas.

De maneira oposta ao que acontece com a rizosfera e também o rizoplane, as comunidades microbianas que habitam o interior das plantas são altamente específicas. A comunidade endofítica das raízes pode ser muito diferente da comunidade do solo adjacente. Geralmente, a diversidade da comunidade endofítica é menor do que a diversidade da comunidade microbiana fora da planta (SCHLAEPPI et al., 2014). Além disso, o genótipo da planta direciona, em parte, a seleção dos microrganismos depositando exsudatos específicos na interface solo-raiz, interferindo no microbioma associado (MENDES et al., 2013). Isso indica que as plantas desenvolveram mecanismos específicos de recrutamento dos microrganismos de interesse (FITZPATRICK et al., 2018).

Conhecer esses mecanismos em uma espécie cultivada abre uma gama de aplicações e potencialidades, que podem se constituir em uma nova forma de buscar soluções para problemas que são de fato limitantes para a produção deste cultivo. Aproveitar ao máximo as relações mutualísticas é uma perspectiva que se torna cada vez mais relevante, e que vem gerando informações que podem impactar nas abordagens de plantio das culturas (DUHAMEL; VANDENKOORNHUYSE, 2013). A resposta da planta ao estresse é influenciada

pela estrutura e composição da comunidade do microbioma influenciando e melhorando a capacidade de resiliência.

É nesse contexto que o estudo do microbioma associado ao gênero *Ananas*, onde se encontra o abacaxizeiro [*Ananas comosus* (L). Merrill], pode trazer alternativas mais sustentáveis para o cultivo. Isso pode se dar, tanto a partir do uso de microrganismos promotores de crescimento, quanto daqueles que têm potencial para auxiliar na defesa contra as principais doenças, favorecendo a obtenção de plantas com maior vigor e tolerância a estresses bióticos.

Estudos dessa natureza, para essa fruteira, ainda são escassos, apesar da sua importância. Conhecer essas relações/interações pode subsidiar futuras ações, tanto na abordagem da conservação de germoplasma, quanto no programa de melhoramento genético de abacaxizeiros (SOUZA et al., 2019).

O abacaxizeiro

O abacaxizeiro é uma frutífera de clima tropical e se desenvolve bem em uma faixa de temperatura de 22 °C a 32 °C e com uma amplitude térmica, entre, dia e noite variando de 8 °C a 14 °C. Temperaturas que estejam fora dessa faixa afetam, de forma significativa o crescimento e a qualidade do fruto. É um cultivo exigente de luz, não tolera sombreamento e apesar de ter várias características anatômicas e morfológicas que favorecem sua adaptação aos climas secos, para a obtenção de uma boa produção de frutos um bom suprimento de água é importante. Em áreas de seca prolongada, precisa ser irrigado (REINHARDT et al., 2000). É uma planta sensível ao encharcamento de solo e que demanda boas condições de aeração e drenagem, já que possui um sistema radicular frágil e que se estabelece na camada superficial do solo. Adicionalmente, solos encharcados favorecem o aparecimento de fungos do gênero *Phytophthora*.

A principal doença da cultura do abacaxizeiro no Brasil é a fusariose, causada pelo fungo *Fusarium guttiforme*, cujo principal sintoma é a exudação de goma a partir da região infectada. As lesões na planta se localizam no caule migrando para a base da folha e infectando também as mudas, principalmente as do tipo filhote. Essa capacidade que o patógeno tem de infectar o material de

plântio foi o que possibilitou a dispersão da doença para as principais regiões produtoras do país.

Dentre as várias medidas que devem ser implementadas para o controle da doença podem ser destacadas a adoção de variedades resistentes e o uso de mudas comprovadamente sadias para os novos plantios, dentre muitas outras medidas (MATOS, 2003). Na última década cultivares resistentes, como a 'BRS Imperial', 'BRS Vitória' e 'BRS Ajubá' foram desenvolvidas com a finalidade de substituir a Pêrola, que é susceptível.

Outra doença importante para o abacaxizeiro é causada pelo *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (PMWaV), em associação com a cochonilha (*Dysmicoccus brevipes*) e que se caracteriza por apresentar sintomas que iniciam no ressecamento das raízes seguido de descoloração gradual das folhas e dobramento dos bordos. Ocorre o encurvamento das folhas na direção do solo e as pontas secam perdendo completamente a turgescência (GUERRA et al., 2020). À semelhança do que ocorre com a fusariose, o sistema de propagação vegetativo do abacaxizeiro dissemina a doença por meio do plantio de mudas infectadas.

Assim, um sistema eficiente para a produção de mudas sadias é uma das demandas práticas importantes para o cultivo do abacaxi, que a cultura de tecidos, por meio da micropropagação, pode atender. A propagação *in vitro* é uma técnica que pode incrementar a produtividade de abacaxizeiros, uma vez que possibilita a obtenção de uma grande quantidade de mudas sadias e homogêneas.

Micropropagação do abacaxizeiro e microrganismos promotores do crescimento

Dentre as técnicas de cultura de tecidos, a micropropagação é a de maior impacto para a agricultura, além de ser uma ótima alternativa para os programas de melhoramento vegetal, agilizando, principalmente o lançamento de novas cultivares (SOUZA et al., 2013).

Essa técnica tem permitido a produção de mudas em larga escala de vários cultivos de importância comercial e que são prioritariamente de propagação vegetativa, como cana de açúcar (ALI et al., 2008; SILVA et al., 2020), plátanos e

bananas (ROELS et al., 2005; BELLO-BELLO, 2019), alho (WEN et al., 2020) e mesmo o abacaxi (SOUZA et al., 2013).

Essa forma de cultivo precisa eliminar os microrganismos de tecidos internos e externos, para que não haja competição com as plantas em desenvolvimento, uma vez que esses microrganismos crescem em uma velocidade muito maior que a planta nos meios de cultura utilizados, principalmente, fungos e bactérias que se encontram na superfície da planta. Para que a técnica seja viabilizada a etapa de desinfestação para eliminação de fungos e bactérias é determinante.

Entretanto, apesar de vários relatos comprovarem a presença de endofíticos na cultura de tecidos (ABREU-TARAZI et al., 2010; QUEIROZ et al., 2020, muitos destes microrganismos que poderiam ser benéficos à planta, são eliminados na etapa de desinfestação. Esses endofíticos podem ser promotores de crescimento ou mesmo atuar na defesa da planta por meio de diferentes mecanismos, aumentando sua resiliência a estresses variados (DIAS et al., 2009).

Para abacaxizeiro já existem protocolos consolidados de micropropagação com todas as etapas *in vitro*, estabelecimento, multiplicação e enraizamento bem definidos (SOUZA et al., 2013). Entretanto, plantas micropropagadas precisam de um período de aclimatização imediatamente após sua remoção do ambiente *in vitro*, que lhes permite adaptar-se às condições de cultivo em campo (ARAGÓN et al., 2012). A aclimatização de plantas micropropagadas de abacaxi é lenta, compreendendo um período que pode chegar até seis meses, onerando de forma significativa o preço da muda e dificultando sua adoção pelos produtores. Assim, bactérias promotoras de crescimento de plantas podem atuar nessa etapa com a finalidade de reduzir o tempo das plantas na fase *in vitro* ou na etapa de aclimatização (BALDOTTO et al., 2010a).

Estudos preliminares realizados com abacaxizeiros relatam a presença de bactérias diazotróficas relacionadas aos grupos *Azospirillum amazonense*, *Azospirillum lipoferum*, *Burkholderia* spp. que podem ser detectadas em raízes, caules, folhas e frutos de diferentes genótipos (WEBER et al., 1999). Em trabalhos posteriores WEBER et al., (2003) relataram os efeitos positivos do isolado AB219 de bactéria diazotrófica sobre o crescimento e o acúmulo de nutrientes de mudas

micropropagadas da cultivar Cayenne Champac com impactos, segundo os autores, sobre o tempo de aclimatização.

Baldotto et al. (2010b) sugerem que a promoção de crescimento do abacaxizeiro pela utilização das bactérias endofíticas e epifíticas pode ser, em parte, atribuída à fixação biológica de nitrogênio. Esses autores relatam que outros mecanismos podem estar envolvidos, como a biossíntese de fitohormônios da classe das auxinas, a exemplo do ácido indol acético (AIA). Relatos semelhantes foram também mencionados em um estudo conduzido por Weber et al. (2013), no qual afirmaram que o melhor desempenho de abacaxizeiros na presença de bactérias endofíticas diazotróficas pode ser devido principalmente à produção de fitorreguladores, mas a fixação biológica de nitrogênio associada à bactéria diazotrófica na fruticultura também pode ser um fator contribuinte.

Rizobactérias produtoras de ácido indolacético, em associação com diferentes substratos, foram utilizadas na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxi, com resultados de promoção de crescimento quando reaplicadas ao longo do tempo (GONÇALVES et al., 2018).

No presente estudo, as plantas micropropagadas utilizadas para os experimentos são da cultivar 'BRS Imperial', um híbrido desenvolvido pela Embrapa Mandioca e Fruticultura, resistente à fusariose, de propriedades organolépticas excelentes, mas de crescimento mais lento que as variedades comerciais conhecidas. No caso de mudas micropropagadas, a aclimatização destas plantas é ainda mais problemática.

O uso dos diferentes microrganismos oriundos do microbioma associado ao gênero *Ananas*, neste trabalho, busca, não apenas promover a melhoria deste desenvolvimento em mudas micropropagadas, como pretende, em um trabalho posterior, avaliar o potencial desses microrganismos no auxílio da defesa da planta contra a fusariose e a murcha do abacaxizeiro.

Em vários estudos se observou o benefício das bactérias promotoras de crescimento como agentes de proteção biológica contra patógenos, sendo evidenciada redução na severidade de algumas doenças (SBRAVATTI JUNIOR et al., 2013). A utilização de microrganismos com potencial para promover o crescimento das plantas pode reduzir o uso de insumos químicos, promovendo a

produção de forma sustentável, inclusive em solos salinos (SANTOS et al., 2012). Estes microrganismos podem também proteger e amenizar os efeitos nocivos causados pelo estresse hídrico (KAVAMURA, 2012). Mais recentemente vários trabalhos com essa abordagem têm sido publicados (VURUKONDA et al., 2016; SANTOS-MEDELIM et al., 2017; ALIE; XIE, 2020).

Técnicas moleculares e a diversidade microbiana

O conhecimento detalhado da diversidade microbiana, abundância, composição, padrões de genes funcionais e vias metabólicas no nível do genoma podem auxiliar na compreensão das contribuições da comunidade microbiana para o crescimento e saúde das plantas (FADIJII; BABALOLA, 2020).

As plantas são colonizadas por diversos microrganismos que são chamados coletivamente de microbiota. Esses microrganismos formam uma comunidade complexa e podem estabelecer íntima relação com o seu hospedeiro, que os pesquisadores têm buscado entender nos últimos anos, assim como estudos relacionados. Esse entendimento tem sido possível, por meio de metagenômica e de métodos computacionais que ajudam a responder a questões como a composição, em termos de relação evolutiva, composição e funções taxonômicas e o que controla os mecanismos subjacentes de sua associação.

As técnicas de sequenciamento modernas fornecem informações detalhadas sobre a identidade e a abundância relativa dos microrganismos associados às plantas. Como as sequências são geradas diretamente da amostra ambiental, o cultivo de isolados microbianos não é necessário.

Os avanços na biologia molecular levaram ao desenvolvimento de técnicas ômicas, que ganharam destaque no estudo da diversidade e abundância de microrganismos (BRADER et al., 2017). Com isso têm aberto um imenso tesouro de diversidade microbiana que tem sido observado na grande maioria dos habitats investigados. Atualmente são encontrados artigos que destacam a importância da metagenômica e dos métodos computacionais na análise de dados sequenciados obtidos de amostras ambientais dos microrganismos associados à planta.

Diversas técnicas metagenômicas têm sido estudadas e suas limitações apresentadas. Lucaciu et al. (2019) discutem as diretrizes práticas sobre os aspectos experimentais e computacionais a serem considerados em estudos de microbioma molecular, técnicas de sequenciamento e “ômicas” com foco nos requisitos necessários para adaptar esses métodos a abordagens de pesquisa individuais.

Um dos avanços do presente trabalho em relação ao que foi realizado por Souza et al. (2019), já mencionado anteriormente, foi o uso de técnicas de metagenômica. Essas técnicas permitiram a identificação dos táxons em cada parte da planta e do solo; a comparação entre ambientes, uma análise dos táxons com abundância diferencial entre as amostras para classificação de filo, família e gênero, uma análise de abundância de famílias e gêneros entre os ambientes estudados, assim como a distribuição de gêneros de bactérias e arqueobactérias identificados no solo, raiz, caule e folha.

Essa abordagem e esses novos conhecimentos sobre esse microbioma associado ao gênero *Ananas* abre um enorme potencial de aplicação biotecnológica desses microrganismos para o cultivo do abacaxizeiro.

OBJETIVO GERAL

Estudar a composição e estrutura da comunidade bacteriana de *Ananas comosus* em ambiente de ocorrência natural da espécie e de cultivo comercial por análise metagenômica; avaliar o potencial uso de grupos funcionais de microrganismos associados a *Ananas* spp. na promoção do crescimento em mudas micropropagadas e aclimatizadas de abacaxizeiros cv. ‘BRS Imperial’, bem como avaliar as bactérias provenientes do microbioma funcional de *Ananas* spp. na promoção do crescimento em abacaxizeiros cv. ‘BRS Imperial’ em canteiro e vasos.

REFERÊNCIAS

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

ALI, A.; NAZ, S.; SIDDIQUI, F. A.; IQBAL, J. An efficient protocol for large scale production of sugarcane through micropropagation. **Pak J Bot**, v. 40, p. 139–149, 2008.

ALI, S.; XIE, LINAN. Plant Growth Promoting and Stress Mitigating Abilities of Soil Born Microorganisms. **Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture**, v. 11, p. 96-104, 2020.

BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; CANELLAS, L. P.; BRESSAN-SMITH, R.; OLIVARES, F. L. Growth promotion of pineapple ‘Vitória’ by humic acids and *Burkholderia* spp. during acclimatization. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 1593-1600, 2010b.

BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; OLIVARES, F. L.; VIANA, A. P.; BRESSAN-SMITH, R. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 2, p. 349-360, 2010a.

BELLO-BELLO, J. J.; CRUZ-CRUZ, C. A.; PÉREZ-GUERRA, J. C. A new temporary immersion system for commercial micropropagation of banana (*Musa* AAA cv. Grand Naine). **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, v. 55, p. 313–320, 2019.

BERENDSEN, R. L.; PIETERSE, C. M. J.; BAKKER, P. A. H. M. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 8, p. 478-486, 2012.

BERGG, SMALLA K. Plantspecies and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 68, p. 1–13, 2009.

BERG, G.; ERLACHER, A.; SMALLA, K.; KRAUSE, R. Vegetable microbiomes: is there a connection between opportunistic infections, human health and our 'gut feeling'? **Microbiology Biotechnoly** v.7, p. 487–495, 2014.

BRADER, G.; CORRETTO, E.; SESSITSCH, A. Metagenomics of Plant Microbiomes. In: Charles T., Liles M., Sessitsch A. (eds) **Functional Metagenomics: Tools and Applications**, Springer, 2017.

COMPANT, S.; SAMAD, A.; FAIST, H.; SESSITSCH, A. A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. **Journal of Advanced Research**, v. 19, p. 29-37, 2019.

SILVA, J. A.; SOLIS-GRACIA, N., JIFON, J. *et al.* Use of bioreactors for large-scale multiplication of sugarcane (*Saccharum* spp.), energy cane (*Saccharum* spp.), and related species. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, v. 56, p. 366–376, 2020.

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

DUHAMEL, M.; VANDENKOORNHUYSE, P. Sustainable agriculture: possible trajectories from mutualistic symbiosis and plant neodomestication. **Trends in plant science**, p. 597-600, 2013.

FADIJI, A. E.; BABALOLA, O. O. Metagenomics methods for the study of plant-associated microbial communities: A review. **Journal of Microbiological Methods**, v. 170, 105860, 2020.

FITZPATRICK, C. R.; COPELAND, J.; WANG, P.W.; GUTTMAN, D. S.; KOTANEN, P. M.; JOHNSON, M. T. Assembly and ecological function of the root microbiome across angiosperm plant species. **PNAS**, v. 115, e1157–1165, 2018.

GONÇALVES, J. S.; MUNIZ, N. P.; SOUZA, E. H. de; SOUZA, F. V. D.; SILVA, H. S. A. Crescimento de mudas micropropagadas de abacaxizeiro em substratos suplementados com rizobactérias produtoras de ácido indolacético / Josélia Santana Gonçalves... [et. al.]. – Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2018.

GUERRA, P. A.; DE SOUZA, E. H.; DE ANDRADE, E. C. et al. Comparison of shoot tip culture and cryotherapy for eradication of ampeloviruses associated with Pineapple mealybug wilt in wild varieties. **In Vitro Cellular e Developmental Biology-Plant**, v. 56, p. 903–910, 2020.

KAVAMURA, V. N. Bactérias associadas às cactáceas da Caatinga: promoção de crescimento de plantas sob estresse. **Tese** (Doutorado em Microbiologia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

LEBEIS, S. L.; PAREDES, S. H.; LUNDBERG, D. S.; BREAKFIELD, N.; GEHRING, J.; MCDONALD, M.; MALFATTI, S.; DEL RIO, T. G.; JONES, C. D. TRINGE, S. G. DANGL, J. L. Salicylic acid modulates colonization of the root microbiome by specific bacterial taxa. **Science**, v. 349, p. 860-864, 2015.

LIU, H.; BRETTELL, L. E.; QIU, Z.; SINGH, B. K. Microbiome-Mediated Stress Resistance in Plants. **Trends in Plant Science**, v. 25, p. 733-743, 2020.

LUCACIU, R.; PELIKAN, C.; GERNER, S. M.; ZIOUTIS, C.; KÖSTLBACHER, S. MARX, H. HERBOLD, C. W.; SCHMIDT, H. RATTEI, T. A Bioinformatics Guide to Plant Microbiome Analysis. **Frontiers Plant Science**, v. 10:1313, 2019.

MATOS, A. P. Doenças do abacaxizeiro. In: FREIRE, F. das C. O.; CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P. (Ed.). **Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, p.16-55, 2003.

MENDES, L.; RAAIJMAKERS, J.; DE HOLLANDER, M. et al. Influence of resistance breeding in common bean on rhizosphere microbiome composition and function. **Journal of the International Society for Microbial Ecology** 12, 212–224, 2018.

MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJMAKERS, M. J. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 634–663, 2013.

PHILIPPOT, L.; RAAIJMAKERS, J. M.; LEMANCEAU, P.; VAN DER PUTTEN, W. H. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature reviews**, v. 11, p. 789-799, 2013.

QUEIROZ, E. G.; DEGENHARDT, J.; QUOIRIN, M.; SILVA, K. da. Endophytic bacteria associated with tissue culture and leaves of *Plinia peruviana*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** [online], v. 55, p. 1678-3921, 2020.

LONGLEY. R.; NOEL, Z. A., BENUCCI, G. M. N.; CHILVERS, M. I.; TRAIL, F.; BONITO, G. Crop Management Impacts the Soybean (*Glycine max*) Microbiome. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1116, 2020.

ROELS, S.; ESCALONA, M.; CEJAS, I. *et al.* Optimization of plantain (*Musa AAB*) micropropagation by temporary immersion system. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v. 82, p. 57–66, 2005.

SANTOS, I. B.; LIMA, D. R. M.; BARBOSA, J. G.; OLIVEIRA, J. T. C. Diazotrophic bacteria associated to roots of sugarcane: inorganic phosphate solubilization and the salinity tolerance. **Bioscience Journal**, v. 28 n. 1, p. 142-149, 2012.

SANTOS, M. H. L. C.; MARIANO, R. de L. R.; CAMARA, T. R.; ANDRADE, A. G. de; WILLADINO, L.; LIMA, G. P. P. Bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento de *Heliconia psittacorum* L.f. **Hoehnea**, v. 32, p.1-8, 2005.

SANTOS-MEDELLÍN, C.; EDWARDS, J.; LIECHTY, Z.; NGUYEN, B.; SUNDARESAN, V. Drought stress results in a compartment-specific restructuring of the rice root-associated microbiomes. **mBio**, v. 8:e00764-17, 2017.

SBRAVATTI JÚNIOR, J. A.; AUER, C. G.; PIMENTEL, I. C.; SANTOS, Á. F. DOS; SCHULTZ, B. In vitro selection of endophytes for biological control of *Botrytis cinerea* in *Eucalyptus benthamii*. **Floresta**, v. 43, p. 145-151, 2013.

SCHLAEPPI, K.; DOMBROWSKI, N.; OTER, R. G.; VAN THEMAAT, E. V. L.; SCHULZE-LEFERT, P. Quantitative divergence of the bacterial root microbiota in *Arabidopsis thaliana* relatives. **PNAS**, v. 111, p. 585–592, 2014.

SESSITSCH, A.; PFAFFENBICHLER, N.; MITTER, B. Microbiome Applications from Lab to Field: Facing Complexity. **Trends in Plant Science**, v. 24, p. 194-198, 2019.

SOUZA, F. V. D.; FERREIRA, F. R.; SOUZA, E. H.; SILVA, R. L.; GUERRA, P. A. Conservation, propagation and new paths for pineapple genetic resources. **Acta Horticulturae**, v. 1239, p. 105-112, 2019.

SOUZA, F. V. D.; SOUZA, A. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, E. H.; JUNGHANS, T. G.; SILVA, M. J. Micropropagação do Abacaxizeiro e Outras Bromeliáceas. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. (Org.). **Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas**. 2ed. Brasília: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, v. 1, p. 189-218, 2013.

TRIVEDI, P.; LEACH, J. E.; TRINGE, S. G. et al. Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, p. 607–621, 2020.

VANDENKOORNHUYSE, P.; QUASER, A.; DUHAMEL, M.; VAN, A. L.; DUFRESNE, A. The importance of the microbiome of the plant Holobiont. **New Phytologist**, v. 206, p. 1196–1206, 2015.

WEBER, O. B.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. S.; KIRCHHOF, G.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. **Plant Soil**, v. 210, p. 103–113, 1999.

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

WEBER, O. B.; VIDEIRA, S. S.; ARAÚJO, J. L. S. Identification of culturable endophytes in ‘Champaka’ pineapple grown in an organic system. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, n. 26, p. 3422-3430, 2013.

WEN, Y. B.; LIU, X. X.; LIU, H. J. et al. High-frequency direct shoot organogenesis from garlic (*Allium sativum* L.) inflorescence and clonal fidelity assessment in regenerants. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, v. 141, p. 275–287, 2020.

VURUKONDA, S. S. K. P.; VARDHARAJULA, S.; SHRIVASTAVA, M. SKZ, A. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, v. 184, p.13–24, 2016.

XIAO, X.; CHEN, W. M.; ZONG, L.; YANG, J.; JIAO, S.; LIN, Y.B. et al., Two cultivated legume plants reveal the enrichment process of the microbiome in the rhizocompartments, **Molecular Ecology**, v. 26 p. 1641–1651, 2017.

ARTIGO I

**ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DO MICROBIOMA DE *Ananas comosus* EM
AMBIENTE DE OCORRÊNCIA NATURAL E CULTIVO COMERCIAL POR
METAGENÔMICA 16S**

¹Artigo a ser ajustado para posterior submissão ao comitê editorial do periódico científico *PLoS one*

Estudo da composição do microbioma de *Ananas comosus* em ambiente de ocorrência natural e cultivo comercial por metagenômica 16S

Resumo: A metagenômica é uma técnica molecular que fornece dados de sequenciamento do DNA de amostras ambientais. Nesse sentido, este trabalho teve por objetivo estudar a composição e estrutura da comunidade bacteriana de *Ananas comosus* em ambiente de ocorrência natural da espécie e em ambiente de cultivo comercial. Para o estudo, as amostras de solo rizosférico e plantas foram coletadas em dois ambientes, sendo considerado o ambiente de ocorrência natural de *Ananas comosus* da região de Mata Atlântica em Ilhéus, Bahia, Brasil e um ambiente de cultivo comercial onde é realizado plantio extensivo de *Ananas comosus* var. *comosus* cv. Pérola, na cidade de Itaberaba na Bahia, Brasil. Foi realizada a extração de DNA bacteriano em amostras de folhas, caules, raízes e solo. A análise metagenômica da comunidade bacteriana foi realizada com base no gene 16S. A diversidade microbiana foi obtida a partir da plataforma de sequenciamento Illumina-MiSeq, utilizando o método de extremidade pareada de pequenos fragmentos para sequenciamento e construção das bibliotecas. Os resultados indicam que os solos rizosféricos e as folhas de ambiente natural abrigam maior abundância de microrganismos. Além disso, o microbioma do solo e dos compartimentos das plantas, são diferentes entre os dois ambientes, mas apesar dessa diferença, alguns grupos bacterianos foram compartilhados entre os ambientes, como Acidobacteria, Actinobacteria e Proteobacteria. Esse estudo mostrou as diferenças em termos de ocorrência e abundância dos microrganismos nos ambientes natural e de cultivo comercial associados a *Ananas* e as informações levantadas aqui são relevantes para uma nova abordagem de plantio que considera a manipulação do microbioma associado como estratégia para o benefício das culturas.

Palavras-chave: microrganismos, sequenciamento, diversidade.

Study of the *Ananas comosus* microbiome structure in natural and commercial cultivation environments using 16S metagenomics

Abstract: Metagenomics is a molecular technique which allows to investigate the DNA of environmental communities. The objective of the presente work was to study the composition and structure of the bacterial community of *Ananas comosus* in natural and comercial environments. Samples of rhizospheric soil and plants were collected in two environments of the Atlantic Forest in Ilhéus, Bahia, and in a cultivated environment with extensive plantation of *Ananas comosus* var. *comosus* cv. Pérola in the city of Itaberaba, Bahia. Bacterial DNA extraction of leaves, stems, roots and soil was carried out. Metagenomic analysis of the bacteria community was carried out using the 16s. The microbial diversity was obtained by the Illumina-seq platform using pair-end technique for library construction. Results indicate that rhyzospheric soils and leaves from the natural environment consists of higher abundance of microorganisms. Furthermore, the microbiome of the soil and layers of the plants are different in both environments, with some bacteria clusters shared among them, such as Acidobacteria, Actinobacteria and Proteobacteria. This study showed the diferences in terms of occurrence and abundance of microorganisms in natural and comercial cultivated environments associated to Ananas and the information gathered is relevant for a new approach of pineapple plantations which consider manipulation of the associated microbiome as a strategy to beneficiate plants.

Key-words: microorganismos, sequencing, diversity.

INTRODUÇÃO

As plantas, por meio de nutrientes exsudados, atraem um grande número de microrganismos (BRADER et al., 2017), que colonizam principalmente o sistema radicular, e em menor grau as folhas, sementes e partes internas da planta (LEVY et al., 2018), os quais podem desempenhar um papel fundamental na regulação da fisiologia, bem como interferir em diversas funções (BERENDSEN et al., 2012). As interações estabelecidas entre microrganismos e plantas podem gerar uma gama de novos fenótipos, sem alterar as informações genéticas das plantas (WEY; JOUSSET, 2017). Entretanto a alteração do fenótipo da planta ocorre dependente dos fatores bióticos e abióticos (KROLL et al., 2017).

Microrganismos associados às plantas podem ser classificados como patogênicos ou não patogênicos. Os patogênicos, no entanto, recebem atenção especial dos cientistas devido à sua importância econômica (FADIJI; BABALOLA, 2020). Quando considerados não patogênicos, a associação estabelecida pode ser benéfica, comensal ou simplesmente neutra (JONES et al., 2019). É importante salientar que, em certas condições, as plantas também se beneficiam dos inúmeros genes e proteínas presentes nesses microrganismos (FADIJI; BABALOLA, 2020).

Estudos, cada vez mais numerosos, têm destacado a importância do uso dos recursos como solo e plantas, presentes em ambientes naturais, a fim de melhorar o desempenho das culturas (PINEDA et al., 2017; KLEIJN et al., 2018), por meio do uso do microbioma diversificado existente nesses ecossistemas, os quais apresentam interações/relações com microrganismos que podem ser favoráveis em ambientes agrícolas (MARIOTTE et al., 2018).

Em períodos anteriores não era possível estudar a fundo a composição da comunidade microbiana e suas funções. Os métodos utilizados inicialmente eram dependentes de cultivo, e na dinâmica do solo e planta, habitam muitos microrganismos que não são cultiváveis em meios de cultura em laboratório. No entanto, com o avanço das técnicas biotecnológicas, principalmente técnicas de *highthroughput*, esses estudos se tornaram possíveis (LEVY et al., 2018). Em termos práticos, as abordagens diversificadas que integram o que se conhece nos

dias de hoje por metagenômica, incluem a caracterização de comunidades microbianas, com a utilização de métodos independentes de cultivo, por meio da aplicação de técnicas de análise em alta escala (LEVY et al., 2018).

Pesquisas relacionadas à diversidade e abundância de microrganismos por meio da utilização de técnicas ômicas, tem se destacado devido aos avanços no campo da biologia molecular (ALAWIYE; BABALOLA, 2019). Nesse contexto, as pesquisas metagenômicas podem empregar uma abordagem de sequenciamento diferenciada, a depender do tipo de amostra ambiental estudada. Esses estudos exploratórios têm se consolidado como importantes ferramentas para compreensão de amostras ambientais, desde o entendimento da história evolutiva, até a biodiversidade estrutural, funcional e ecológica (SHOKRALLA et al., 2012) que, juntamente com o avanço das ferramentas computacionais, possibilitam aos pesquisadores o aumento da compreensão das interações entre os fitomicrobiomas. Conseqüentemente, esse conhecimento derivado pode fornecer estratégias para o uso de microrganismos promotores do crescimento de plantas em campo (MITTER et al., 2016).

O conhecimento sobre a composição, estrutura e dinâmica das comunidades microbianas é de fundamental importância para uma agricultura sustentável e inovadora. Nesse sentido, o trabalho teve por objetivo estudar a composição e estrutura da comunidade microbiana de *Ananas comosus* em ambiente de ocorrência natural da espécie e em ambiente de cultivo comercial.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras

As amostras de solo rizosférico e de tecidos vegetais de plantas de *Ananas comosus* foram coletadas em dois ambientes distintos: a) ambiente de ocorrência natural de *Ananas comosus* var. *comosus* na região de Mata Atlântica na cidade de Ilhéus, Bahia, localizada a 14°43'26" S, 39°10'14" W, (Figura 1. A) e b) ambiente de cultivo comercial onde é realizado plantio extensivo de *Ananas comosus* var. *comosus* cv. Pérola, na cidade de Itaberaba, Bahia (Figura 1. B), localizada a 12° 26' 35.8" S, 040° 13' 05.8" W. Segundo a classificação de Köppen-

Geiger, o clima em Ilhéus é classificado como Af (tropical-úmido ou equatorial), com temperatura média anual de 24,5 °C e pluviosidade média anual de 1946 mm. Já na cidade de Itaberaba, o clima é classificado como BSh (semi-árido quente). A temperatura média anual é 24,4 °C e a pluviosidade média anual de 747 mm.

As amostras foram armazenadas e transportadas em condições estéreis e conduzidas ao laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Mandioca e Fruticultura. As amostras de tecido vegetal (folha, caule e raízes) foram fragmentadas e as frações de solo rizosférico foram separadas. Em seguida, as amostras foram embaladas, identificadas e armazenadas a -80 °C para posterior extração de DNA metagenômico.



Figura 1. Representação de *Ananas comosus* nos ambientes de ocorrência. A. *Ananas comosus* em ambiente natural (Mata Atlântica-Ilhéus, BA). B. *Ananas comosus* var. *comosus* cv. Pérola em ambiente de cultivo comercial (Itaberaba, BA). Cruz das Almas, Bahia, Fevereiro de 2021.

Extração de DNA bacteriano a partir do material vegetal e solo rizosférico

A extração de DNA das amostras de folhas e caules foi realizada pelo método CTAB proposto por Doyle & Doyle (1990) com adaptações. Já as amostras de raízes foram extraídas utilizando-se o método proposto por Murray & Thompson (1980) com adaptações. O DNA bacteriano das amostras de solo foi

extraído de 0,25 g de tecido utilizando o DNeasy Powersoil kit (QIAGEN), seguindo as instruções do fabricante.

As extrações foram realizadas até a obtenção da concentração de DNA de 30 ng μL^{-1} . Em seguida, as amostras de DNA foram mantidas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a sua utilização. Ao todo, foram preparadas 16 amostras de DNA, sendo duas réplicas técnicas de cada amostra de solo rizosférico, raízes, caule e folhas considerando os ambientes de ocorrência natural e cultivo comercial de *Ananas comosus*.

Análise Metagenômica para estudo do microbioma: Sequenciamento do gene 16S e análise de bioinformática

A análise metagenômica da comunidade bacteriana foi realizada com base no gene 16S. A diversidade microbiana foi obtida a partir da plataforma de sequenciamento Illumina-MiSeq (CDgenomics, Shelby, NY, USA), utilizando o método de extremidade pareada de pequenos fragmentos para sequenciamento e construção das bibliotecas. Os amplificadores foram executados na plataforma Illumina-MiSeq para gerar *raw reads* de 300 pb (pares de bases), com o qual foi gerada a análise automática preliminar dos dados a partir do software MiSeq Reporter (MSR) v2.6. O processamento específico consistiu nas seguintes etapas: -Leituras de extremidades pareadas foram atribuídas a uma amostra por seu código de barras exclusivo, e o código de barras e a sequência do primer foram então truncados. As leituras de extremidades pareadas foram mescladas usando FLASH (V1.2.7), que é uma ferramenta de análise para mesclar pares de leituras quando os fragmentos de DNA originais são menores que o dobro do comprimento das leituras. As sequências de junção obtidas foram chamadas de tags brutas ou *raw tags*.

- A filtragem quanto ao controle de qualidade das *tags* brutas foi realizada com base no programa Trimmomatic v 0.33. Após a filtragem, as *tags* limpas de alta qualidade, foram processadas e as sequências analisadas.

Processamento e análises das sequências

As sequências brutas foram processadas usando o software DADA2 versão 3.11 no RStudio versão 4.0.0, seguindo a estratégia descrita por Callahan et al. (2016). Os *reads* R1 e R2 foram truncados para um comprimento de 150 pb, e os *reads* de baixa qualidade foram removidos. Usando aprendizado de máquina, os erros dos *reads* foram identificados e em seguida removidos. Os *reads* R1 e R2 foram unidos usando DADA2 :: mergePairs e as quimeras removidas usando DADA2 :: removeBimeraDenov. A atribuição taxonômica foi realizada usando o banco de dados SILVA v132, em seis níveis taxonômicos (QUAST et al., 2012). As análises da comunidade microbiana das amostras foram feitas em seguida usando o Phyloseq 1.24.2 (MCMURDIE; HOLMES, 2013), também no RStudio. Os táxons com classificação taxonômica atribuída como “Mitochondria” e “Chloroplast” foram removidos.

Análise de diversidade

A Diversidade Alfa foi estimada para cada amostra pelo cálculo dos índices de diversidade de Simpson e Shannon usando o phyloseq :: plot_richness no RStudio. A comparação do microbioma entre as amostras, por meio do cálculo da Diversidade Beta, foi realizada pela análise multidimensional NMDS (Non-Metric Multidimensional Scaling) com base na presença e ausência de OTUs (*Organizational Taxonomic Unit*) usando a distância de Jaccard com o pacote phyloseq :: ord.nm.ds.bray. Essa metodologia separa as OTU's em clusters de organismos tendo como base o sequenciamento de DNA para definir “espécies” em diferentes níveis taxonômicos (HUGHES et al., 2002; WU et al., 2014). Os gráficos de barras, foram construídos para apresentar os táxons mais abundantes, usando phyloseq :: prune_taxa.

A análise estatística dos índices de diversidade foi realizada no programa GraphPad Prisma 5.0. Inicialmente foi realizada a análise de distribuição dos dados pelo teste de Kolmogorov - Smirnov. Confirmado o perfil de distribuição gaussiano dos dados, para comparar os dados de ambiente natural com o

ambiente cultivado das diferentes partes da planta e solo, foi utilizado o teste-T. Os dados foram considerados significativamente estatísticos para p-valor menor que 0.05.

RESULTADOS

Análise de diversidade

Um total de 5251 unidades taxonômicas de bactérias e arqueobactérias foram obtidas no sequenciamento de todas as amostras. Para avaliar a qualidade das replicatas e a diferença entre amostras biológicas, uma projeção em escalonamento multidimensional baseado nos táxons identificados em cada replicata foi realizada, utilizando a distância de Jaccard para calcular a similaridade e diferença global dos grupos experimentais (Figura 2). As replicatas utilizadas possuem boa qualidade demonstrada pela proximidade dos pontos de replicatas das mesmas amostras no gráfico da Figura 2. Além disso, pode-se observar maior diferença entre as amostras de solo e folha de ambiente cultivado, das amostras de ambiente natural. Porém, as amostras de caule e raízes foram mais homogêneas quanto a presença e ausência de táxons identificados pela análise metagenômica.

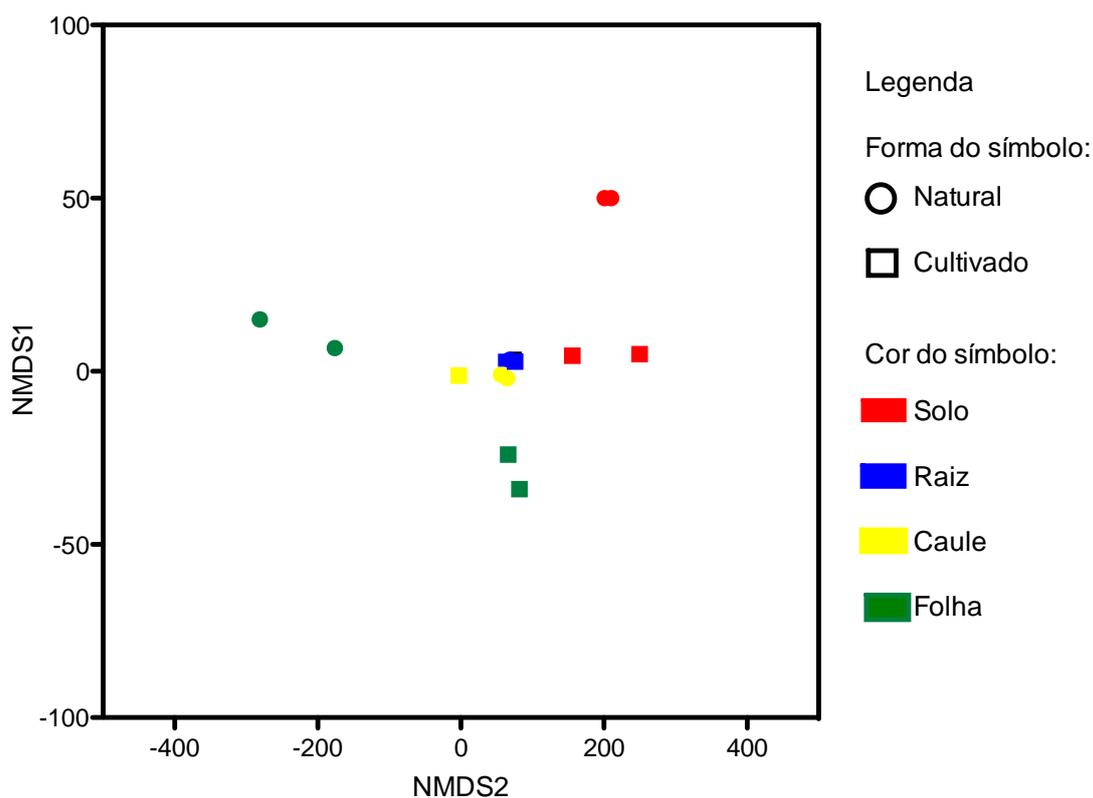


Figura 2 - Projeção das amostras em gráfico de escalonamento multidimensional (NMDS) calculados utilizando a distância de Jaccard. Os formatos dos símbolos representam o ambiente natural (círculo) e de cultivo (quadrado). As cores representam o solo ou partes diferentes das plantas analisadas.

No diagrama de Venn representado na figura 3, as diferentes amostras são representadas por cores distintas. É possível observar que as sobreposições entre os diferentes padrões de cores representam o número de OTUs compartilhados entre as duas amostras, enquanto que a parte não sobreposta simboliza o número de OTUs exclusivos pertencentes à amostra relacionada.

Na figura 3 quanto ao número de táxons presentes, o solo rizosférico de *Ananas comosus* de ambiente natural apresentou um maior número de táxons individuais (728) em comparação com o solo rizosférico de *Ananas comosus* de cultivo (607), apesar disso, os dois tipos de solo apresentaram um grande número de táxons compartilhados (1276). O mesmo ocorreu para as raízes de *Ananas comosus* de ambiente natural, que apresentou maior número de táxons individuais

(78) do que as raízes de *Ananas comosus* de ambiente cultivado (40), com um total de 518 táxons compartilhados.

Exceção ao que ocorreu para as demais amostras, o caule de *Ananas comosus* de ambiente natural expôs menor número de táxons individuais (28) comparado ao caule de *Ananas comosus* de ambiente cultivado (45). No entanto, ambas as amostras compartilharam um elevado número de táxons semelhantes (159).

Nas folhas de ambiente natural foi encontrado grande número de táxons específicos (327) quando comparados não apenas à amostra correspondente de folha de ambiente cultivado (69), mas também às amostras de caule e raízes provenientes do mesmo ambiente. As folhas de ambos os ambientes apresentaram 174 táxons compartilhados.

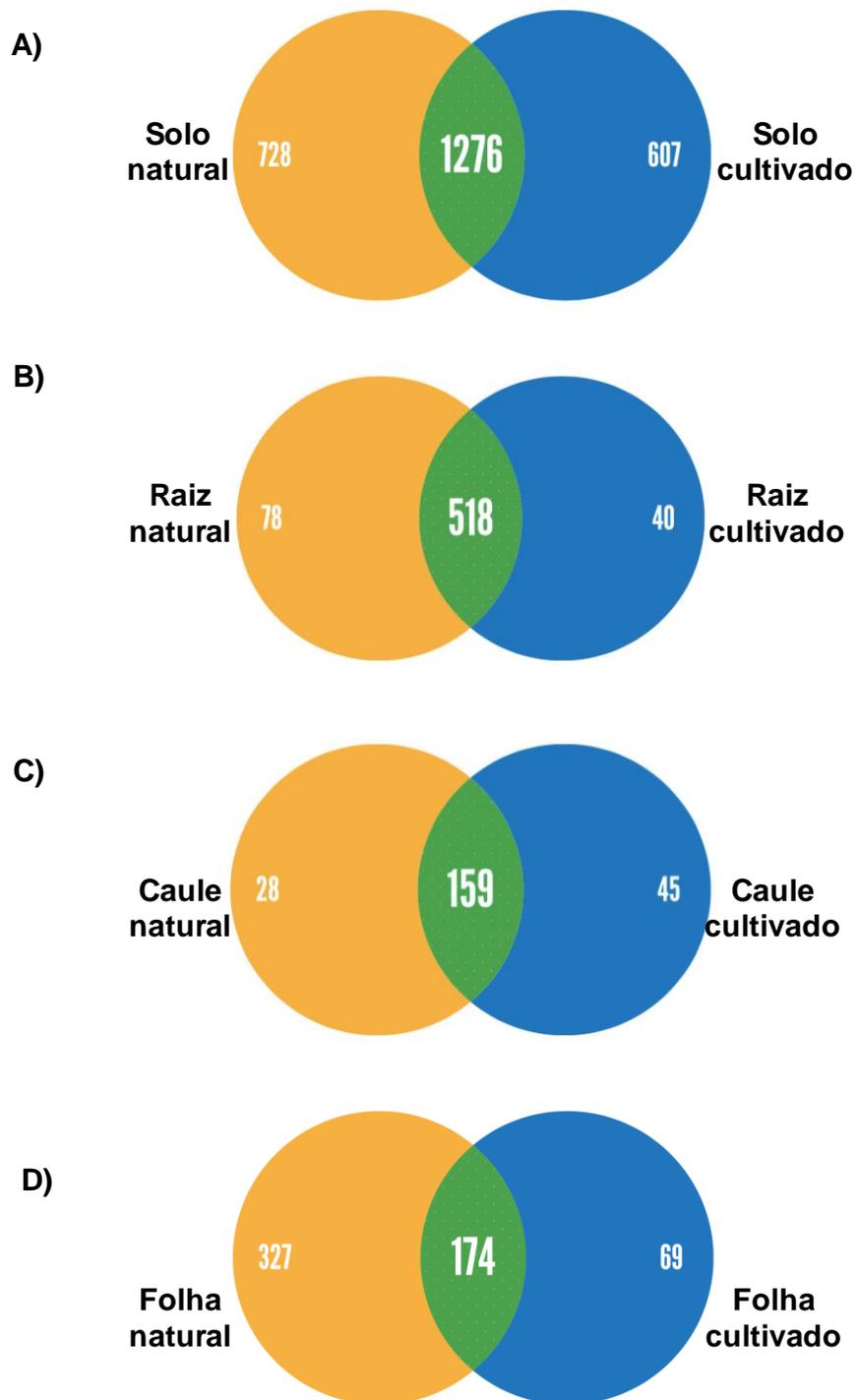


Figura 3 - Diagrama de Venn apresentando os táxons compartilhados e específicos entre os grupos experimentais analisados. A) Solo. B) Raiz. C) Caule. D) Folha.

Os índices de diversidade de Shannon, que representa a diversidade global de cada amostra, e de Simpson, que representa a dominância de táxons, foram calculados para cada grupo experimental (Figura 4). A comparação estatística dos índices de diversidade entre as partes da planta e solo de ambientes natural e cultivado, foi realizada pelo teste-T. O solo e a raiz apresentaram maiores índices de Shannon do que as demais partes de planta. Houve diferença significativa apenas para raiz e folha, no qual em ambas as partes de plantas possuíram maior diversidade das amostras obtidas do ambiente natural quando comparado com o ambiente cultivado. Quanto ao índice de Simpson, não houve diferença significativa entre dominância de táxons para as amostras analisadas.

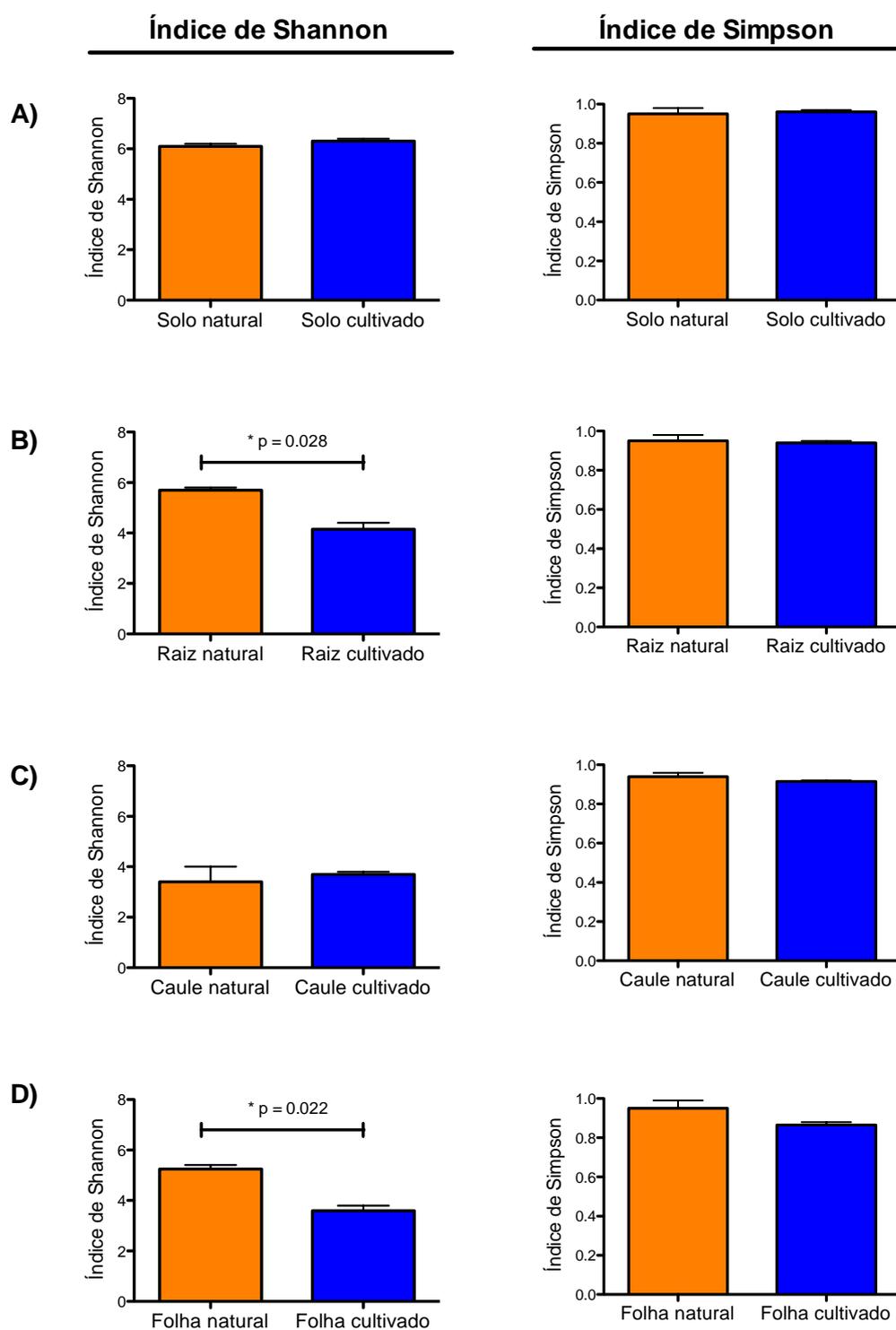


Figura 4 - Análise dos índices de diversidade dos grupos experimentais. A) Solo. B) Raiz. C) Caule. D) Folha. O símbolo * representa p-valor menor do que 0.05 calculado pelo teste-T.

Distribuição taxonômica

As informações de abundância em cada nível taxonômico, e os gráficos de estrutura da comunidade microbiana de cada nível foram desenhados pela ferramenta de linguagem R. As sequências encontradas das amostras foram comparadas com bibliotecas de organismos conhecidos. No processo de análise obteve-se a formação das afiliações taxonômicas das amostras. No histograma tem-se apenas a abundância das principais taxonomias detectadas e os organismos que não receberam nenhuma atribuição quanto à sua classificação taxonômica, foram classificados como “NA”, táxon não assinalado.

A análise dos táxons com abundância diferencial entre as amostras foi realizada para classificação de filo, família e gênero. A distribuição dos filios de bactérias e arqueobactérias mais frequentes em cada amostra pode ser observada na Figura 5.

A análise do solo possibilita a observação de aumento da abundância de Acidobacteria e redução de Actinobacteria em solo natural em relação ao solo cultivado. Além disso, bactérias dos filios Chloroflexi, FCPU-426 e WPS-2 foram identificadas especificamente no solo cultivado.

As raízes dos dois ambientes analisados compartilharam os filios Actinobacteria e Proteobacteria. No entanto, a presença de Acidobacteria e Epsilonbacteraeota foi específica na raiz de ambiente natural, parte da planta que apresentou maior diversidade neste ambiente quando comparado ao ambiente cultivado. Além disso, também foi observada redução de Actinobacteria e expansão de Proteobacteria na raiz de ambiente natural. Já em caule de ambiente natural, foi detectado apenas Proteobacteria, filo encontrado também em caule de ambiente cultivado, além da presença de Acidobacteria e Actinobacteria para o último ambiente citado.

Em folhas de ambiente natural foi também observada uma maior diversidade de filios. Nesta parte da planta, o ambiente natural apresentou presença de Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes e Proteobacteria, não detectado no ambiente cultivado. Neste último, o filo predominante foi Firmicutes.

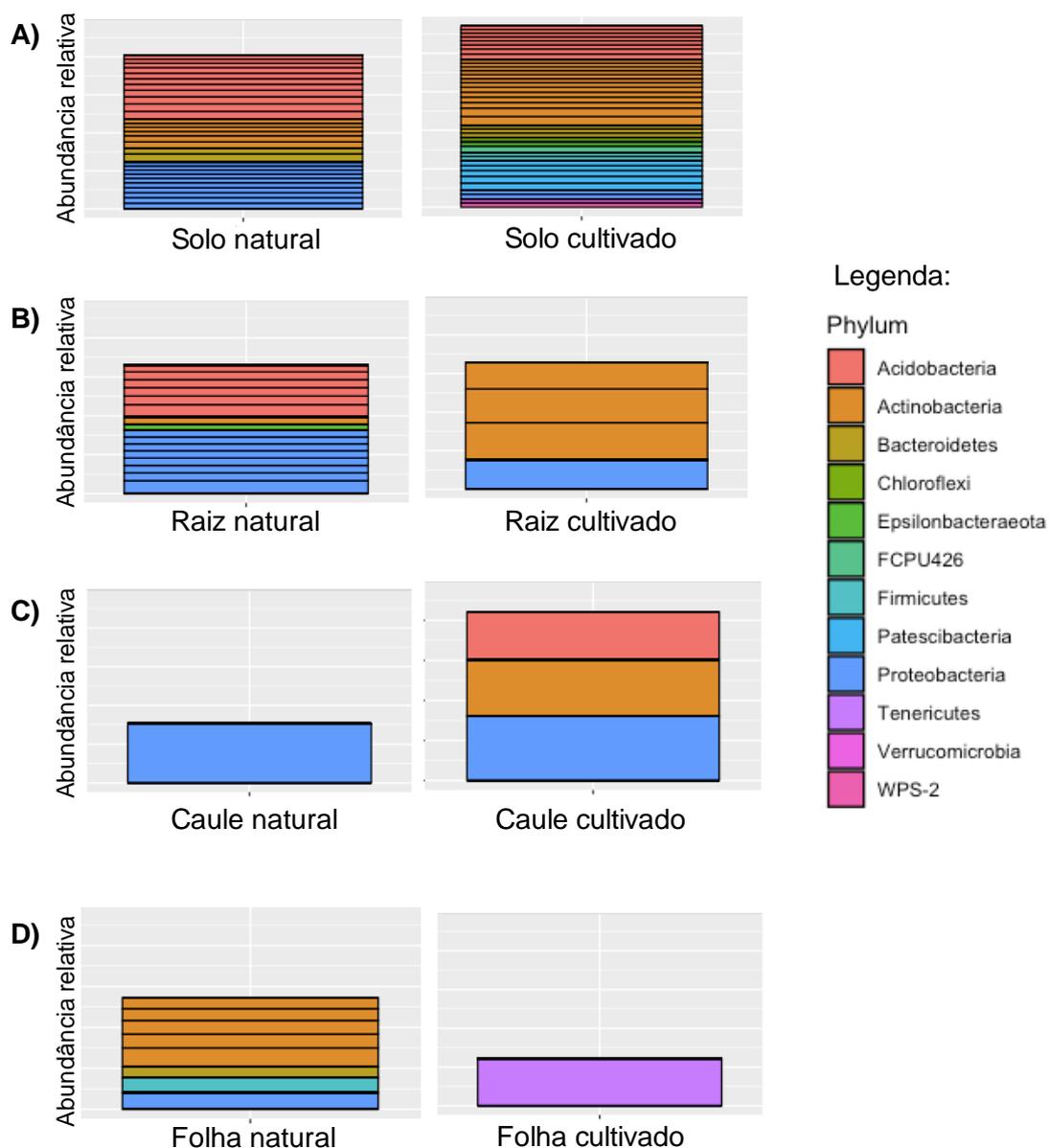


Figura 5 - Distribuição dos filós de bactérias e arqueobactérias identificados nos grupos experimentais. A) Solo. B) Raiz. C) Caule. D) Folha.

A análise de abundância de famílias (Figura 6) indicou que em solo natural há presença de Acidobacteriaceae, Acidothermaceae, Beijerinckiaceae, Chitinophagaceae, Solibacteraceae, sendo a maior abundância de Acidobacteriaceae, Chitinophagaceae e Solibacteraceae, enquanto em solo

cultivado foram encontrados Acidothermaceae, Chitinophagaceae, Micrococcaceae e Streptococaceae, com maior abundância da família Streptococcaceae.

Raízes de ambiente natural à semelhança das amostras de solo, também apresentaram maior abundância de bactérias da família Solibacteraceae, em que também foram detectadas sequências correspondentes a Xanthobacteraceae e as amostras de solo cultivado apresentaram enriquecimento de bactérias da família Streptococcaceae. Por outro lado, Xanthobacteraceae também foi abundante em caule de ambiente natural, enquanto Enterobacteriaceae e Nocardiaceae foram mais abundantes em caules de ambiente cultivado.

Folhas de ambiente natural também foram enriquecidas de famílias bacterianas incluindo Microbacteriaceae, Micrococcaceae, Micromonosporaceae, Streptococcaceae e Xanthobacteraceae. No entanto, em folhas de ambiente cultivado não foram detectadas sequências correspondentes a nenhuma família de bactérias.

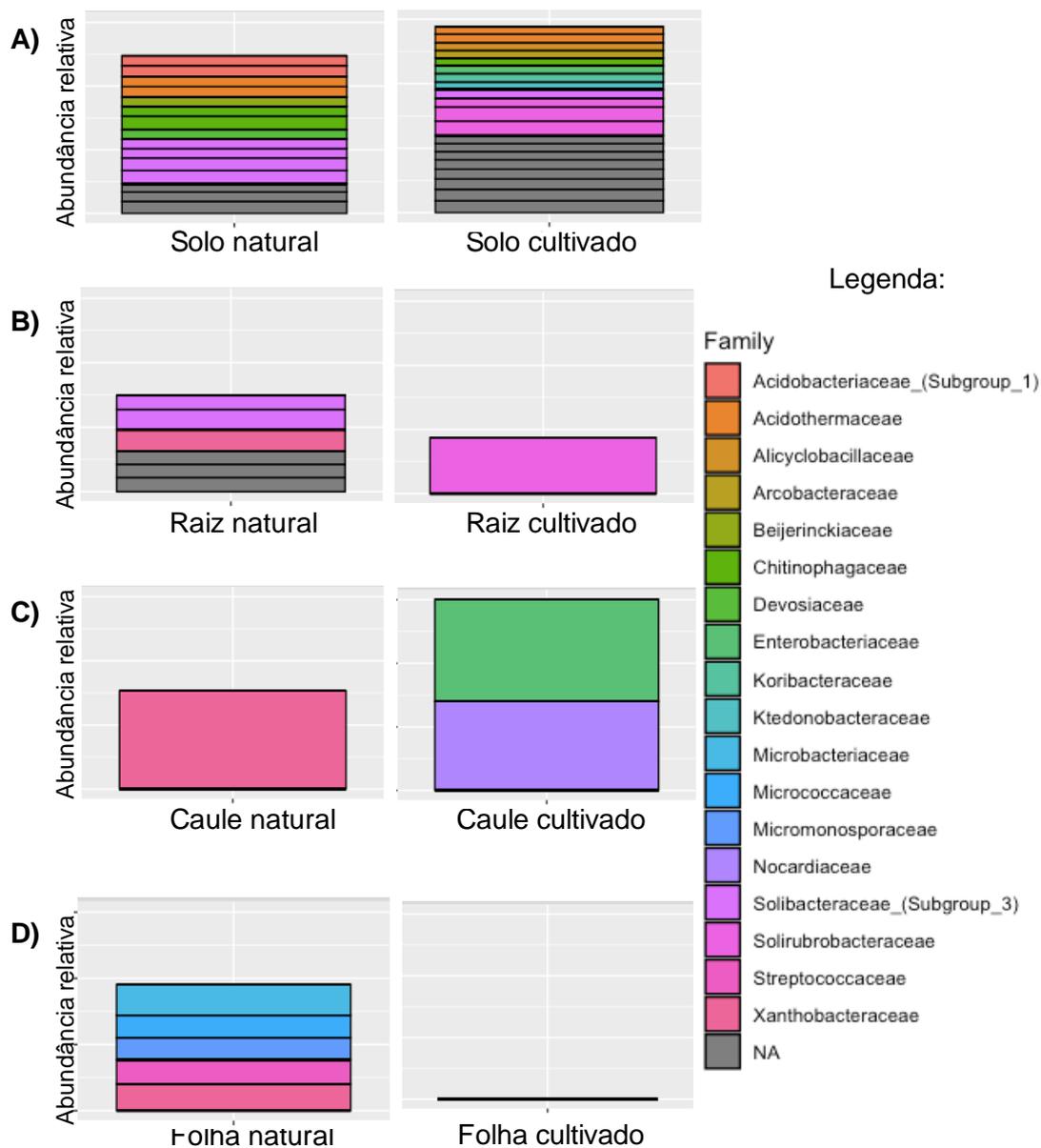


Figura 6 - Distribuição de famílias de bactérias e arqueobactérias identificados nos grupos experimentais. A) Solo. B) Raiz. C) Caule. D) Folha. NA, táxon não assinalado.

Em nível de gênero tem-se a distribuição das bactérias que são diferencialmente abundantes entre o ambiente natural e cultivado (Figura 7). Em solo natural foram detectados os gêneros *Acidothermus*, *Arsenicitalea*, *Bryobacter*, *Candidatus_Solibacter*, *Edaphobacter* e *Roseiarcus*. Enquanto no solo cultivado foram detectados os gêneros *Acidothermus*, *Arcobacter*, *Candidatus_Koribacter*, *Conexibacter* e *Tumebacillus*, sendo o *Conexibacter* mais abundante nesse ambiente. Em raiz, o gênero *Bryobacter* foi dominante em ambiente natural, enquanto o *Conexibacter* foi o mais abundante em ambiente cultivado.

Em caule, o gênero *Nitrobacter* foi mais abundante em ambiente natural e os gêneros *Escherichia/Shigella* e *Rhodococcus* foram presentes especificamente em ambiente cultivado. Em folhas de ambiente natural os gêneros mais abundantes foram *Nitrobacter*, *Pseudarthrobacter*, *Streptococcus* e *Verrucosipora*.

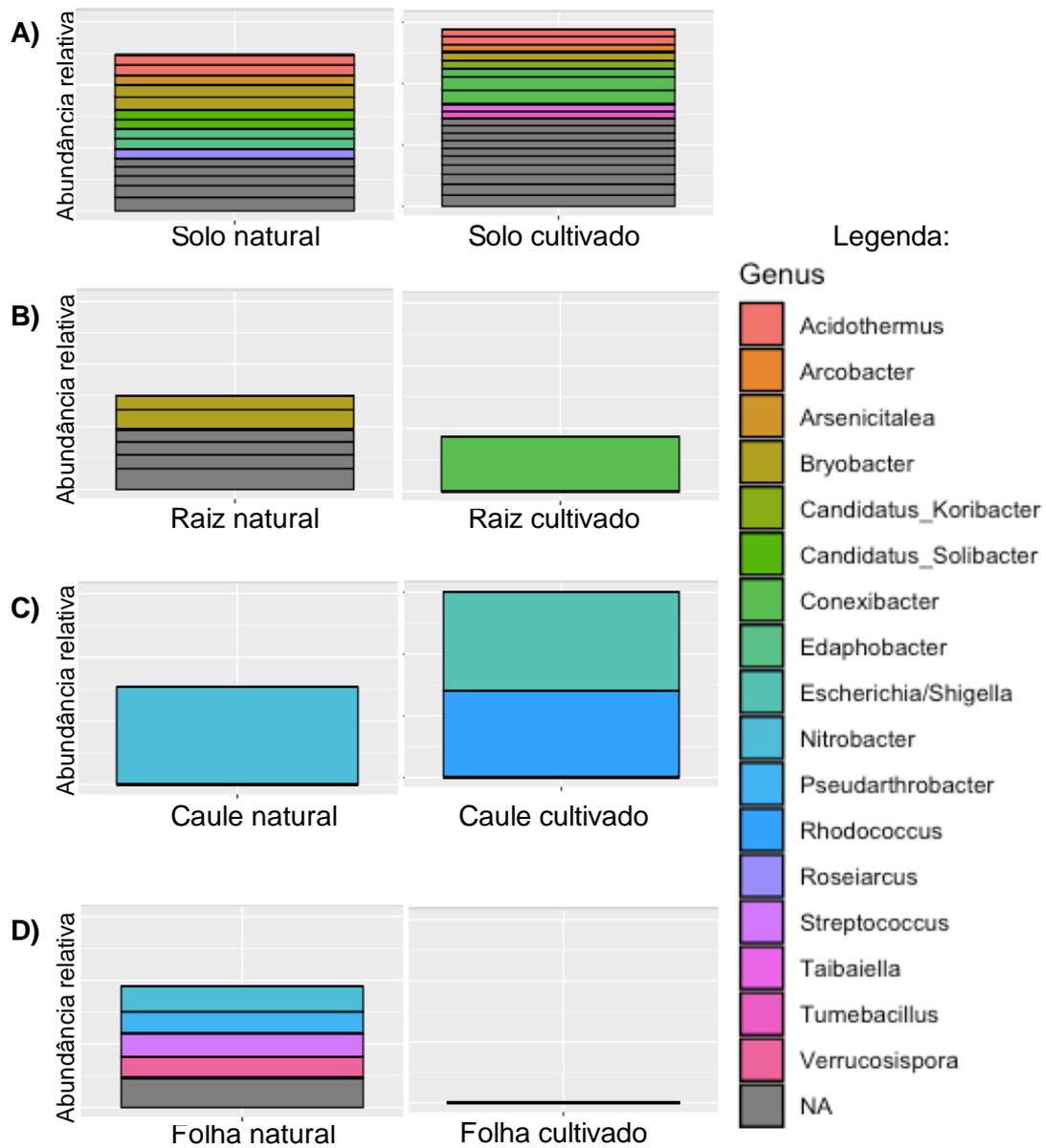


Figura 7. Distribuição dos gêneros de bactérias e arqueobactérias identificados nos grupos experimentais. A) Solo. B) Raiz. C) Caule. D) Folha. NA, táxon não assinalado.

DISCUSSÃO

Análise de diversidade

Nosso trabalho é o primeiro relato sobre a composição microbiana associada ao gênero *Ananas* com uma abordagem metagenômica e visa contribuir para a compreensão da dinâmica dos microbiomas.

Utilizando-se a distância de Jaccard (Figura 2) foi observado que a microbiota de ambiente cultivado é mais homogênea, ou seja, os símbolos que representam as amostras de solo e das diferentes partes da planta encontram-se mais próximos. Em contrapartida, a microbiota presente no ambiente de ocorrência natural de *Ananas comosus*, representada pelo solo, raízes, caule e folhas, é mais heterogênea. Outro fato interessante é que as amostras de raízes dos ambientes de ocorrência natural e cultivo comercial encontram-se próximas no gráfico, indicando a semelhança existente entre a microbiota dos dois ambientes para as diferentes amostras, bem como a semelhança existente entre a microbiota do caule dos dois ambientes e a proximidade da microbiota de caule com a microbiota de raiz.

Devido à proximidade do solo rizosférico com as raízes na planta, a microbiota associada poderia até ser mais semelhante, no entanto, foi observado que em ambos os ambientes a microbiota é menos homogênea, e esse fato é mais evidente para o ambiente de ocorrência natural.

Semelhantemente, Bulgarelli et al. (2015) ao estudar o microbioma da rizosfera e raízes de cevada, observaram que os diferentes microhabitats são colonizados por comunidades com perfis taxonomicamente distintos, que emergem do solo por diferenciação progressiva. Por isso, mesmo amostras de uma mesma planta podem apresentar uma comunidade microbiana diversa.

A diferença entre as comunidades microbianas, evidenciada pela natureza heterogênea da microbiota de ambiente natural pode ser entendida pelo fato dos recursos biológicos presentes naturalmente no solo favorecem as relações do sistema solo-planta, os quais ocorrem sem interferência antrópica. Dessa forma, os microrganismos trabalham ativamente realizando funções fundamentais. Já no

ambiente de cultivo comercial, a prática de monocultivo é recorrente e a parte biológica do solo e sua configuração é alterada. A parte biológica do solo em um sistema agrícola homogeneizado trabalha de forma menos eficiente e os microrganismos presentes são menos diversificados.

Em consonância com o que foi observado, Philippot et al. (2013) citam que no ambiente natural há uma menor interferência das ações humanas, o que por sua vez o torna uma fonte de microrganismos benéficos que coevoluíram com as plantas.

No presente trabalho foi observada maior diversidade de táxons em solo e folhas de ambiente natural em relação ao ambiente cultivado (Figura 3 e 4). Existem relatos de que alguns ambientes experimentaram perdas de espécies com a adição de fertilizantes no solo, prática que é comumente utilizada em sistemas de produção agrícola, a exemplo do que é realizado para produção de culturas como o abacaxizeiro. Suding et al. (2005) mostraram perda da diversidade à medida em que houve aumento na produção. Foi relatado ainda que espécies raras costumam ser perdidas por causa da fertilização do solo. O risco de perda de espécies devido à fertilização foi maior que 60% para as espécies raras a 10% para as espécies mais abundantes. Simbiontes fixadores de N, e os de origem nativa, também experimentaram aumento do risco de extinção após a fertilização, independentemente de sua abundância inicial. Nesse contexto, nossos resultados estão em conformidade com o que foi relatado, onde os dados apresentam menor diversidade relacionada ao ambiente cultivado.

Distribuição taxonômica

Foi realizada também análise de abundância para as amostras dos diferentes ambientes em nível de filo, família e gênero. O principal filo bacteriano encontrado em todas as amostras analisadas foram as Proteobacterias, com exceção à folha de ambiente cultivado, sendo mais abundante em solo, raiz, e caule de ambiente natural, e de igual modo em caule de ambiente cultivado. Segundo Scholoss et al. (2011), as Proteobacterias são consideradas o grupo bacteriano mais abundante no solo. Em consonância Preheim et al. (2013), em

um estudo realizado a fim de analisar a diversidade de bactérias do solo a partir do sequenciamento do gene 16s, descobriram que nas amostras analisadas as Proteobacterias constituíam 48,6% do total de bactérias. Estudos apontam que esse filo engloba organismos de uma enorme diversidade morfológica, fisiológica e metabólica, e desempenham um papel significativo nos ciclos do carbono, nitrogênio e enxofre do solo (KERSTERS et al., 2006; ACOSTA-MARTÍNEZ et al., 2010). Ainda, Fierer et al. (2007) relataram a abundância de Proteobacteria correlacionada com taxas de carbono mineralizado em regiões quentes.

De forma semelhante, Bulgarelli et al. (2015) analisaram o microbioma associado de acessos selvagens e domesticados de *Hordeum vulgare* pela combinação dos métodos de sequenciamento do gene 16S e por shotgun e identificaram em suas amostras a dominância das sequências correspondentes aos filos Proteobacteria, Actinobacteria e Bacteroidetes no solo rizosférico e também em raízes.

Sequências correspondentes a Actinobacteria foram detectadas em ambos os ambientes estudados e na maior parte das amostras, com exceção de caule de ambiente natural e raízes de ambiente cultivado, sendo este filo dominante em solo e raiz de ambiente cultivado, bem como em folha de ambiente natural. Zucchi et al. (2011) relatam que bactérias desse filo estão amplamente distribuídas na natureza, e devido as várias aplicações biotecnológicas a que se destinam, relacionadas ao resultado de suas atividades metabólicas, esse grupo tem recebido especial atenção. Essas bactérias também têm sido frequentemente associadas à decomposição da matéria orgânica dos solos, exercendo um papel fundamental na manutenção dos ecossistemas (ACOSTA-MARTÍNEZ et al., 2008).

Gao e Gupta (2012) relatam que no domínio das bactérias o filo Actinobacteria é um dos maiores e mais antigos. Esse táxon bacteriano é um dos mais abundantes no solo e habitam uma ampla gama de ambientes, incluindo os extremos como os solos desérticos (MAESTRE et al., 2015; DELGADO-BAQUERIZO et al., 2017; HO et al., 2017). Inclusive algumas espécies de Actinobacteria são endofíticas, e proporcionam múltiplos benefícios para as plantas influenciando na saúde e nutrição (ARAUJO et al., 2020), assim como foi

observado neste trabalho a presença dessas bactérias não apenas no solo, mas também nos diferentes compartimentos das plantas. A atual percepção das funções potenciais das actinobactérias é fundamentada em microrganismos que podem ser cultivados, e esses refletem apenas uma parcela da diversidade existente em amostras ambientais (GOMEZ-ESCRIBANO et al., 2016).

Se sequências correspondentes a Actinobacteria foram mais abundantes em solo e raízes de ambiente cultivado, o oposto foi observado para o filo Acidobacteria, o qual foi detectado em maior abundância em solo e raízes de ambiente natural. Organismos cultiváveis desse filo são oligotróficos, e respondem negativamente aos aumentos em carbono e pH (RODRIGUES et al., 2013).

É sugerido que existe uma relação ecológica entre Acidobacteria e Proteobacteria porque elas são frequentemente observadas como intimamente associadas umas às outras no ambiente, e podem influenciar a posição uma da outra na comunidade (KIELAK et al., 2016). Certos grupos de Proteobacteria foram associados a estilos de vida copiotróficos e, dada essa associação, Smit et al. (2001) levantaram a hipótese de que a proporção entre Proteobacteria e Acidobacteria pode fornecer informações sobre o estado geral de nutrientes dos solos. Baixas razões entre esses grupos seriam indicativas de solos oligotróficos, enquanto altas razões seriam observadas em condições copiotróficas (que prosperam em condições de disponibilidade elevada de C e exibem taxas de crescimento relativamente rápidas). Kielak et al. (2009) também relataram sobre a proporção de Acidobacteria significativamente menor na rizosfera, rica em nutrientes, do que no solo, confirmando seu estilo de vida oligotrófico. Resultado semelhante foi observado nesse trabalho.

Um grupo de ocorrência nas amostras de solo dos dois ambientes e folha de ambiente natural foi Bacteroidetes, no entanto em pequena proporção em todas elas, assim como Ramirez et al. (2010) identificou esse mesmo padrão em diferentes amostras de solo. Foi mostrado que Bacteroidetes, Actinobacteria e Proteobacteria tem sua abundância relativa aumentada ao longo do gradiente de concentração do Nitrogênio, indicando que esses são táxons copiotróficos, em

contraste houve um declínio na abundância de Acidobacteria (FIERER et al., 2007; EILERS et al., 2010), um grupo que muitas vezes é considerado oligotrófico.

Os grupos bacterianos Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria e Firmicutes são importantes participantes no ciclo do carbono (LI et al., 2017; ZHENG et al., 2017; DENG et al., 2018), enriquecendo o solo onde estão inseridos, e isso ocorre independentemente do ambiente em que estiverem presentes ou do uso da terra. Embora os solos e partes das plantas compartilhassem alguns grupos bacterianos, foram verificadas diferenças na abundância microbiana em todas as amostras, sendo verificados grupos dominantes. Grupos dominantes que abrangem mais que uma pequena porcentagem do número total de células em uma comunidade terão uma representação maior no conjunto de dados, e podem ser estudados mais a fundo.

Carbonetto et al. (2016) afirmam que solos cultivados são ambientes mais heterogêneos do que solos não cultivados. As práticas agrícolas realizadas periodicamente em solos cultivados como o revolvimento do solo, a fertilização e a aplicação de pesticidas, geram mudanças temporais e espaciais nas propriedades químicas do solo e, portanto, na disponibilidade de nutrientes e acessibilidade por microrganismos. As bactérias dominantes neste tipo de solo devem ser adaptadas à heterogeneidade do ambiente. Esses microrganismos devem ser capazes de ajustar a ingestão de carbono e nitrogênio de acordo com suas necessidades metabólicas sob frequentes mudanças externas. Este parece ser o caso de Actinobacterias, que foram mais abundantes nesse ambiente, sugerindo uma estratégia ecológica generalista.

Esta competição, no entanto, seria menos acirrada em solos não cultivados devido à maior homogeneidade e um gradiente de nitrogênio menos marcado devido à falta de fertilização e formas de matéria orgânica mais recalcitrantes (CARBONETTO et al., 2016).

Outras sequências analisadas exclusivas de solo de ambiente cultivado foram WPS-2, FCPU426 e Chloroflexi, embora em menor proporção. Microrganismos específicos podem ser enriquecidos a partir do ambiente circundante, também, atraídos por exsudatos de raiz contendo carboidratos, proteínas e vitaminas (CHAPARRO et al., 2013). Como resultado disso, cada

planta abriga até certo grau microrganismos específicos (BERG; SMALLA, 2009; BULGARELLI et al., 2012).

O filo candidato WPS-2 foi relatado em estudos recentes como sendo organismos abundantes de vários ambientes de solo descoberto. Alguns estudos sugerem que esse filo inclui bactérias com diversas capacidades metabólicas (SHEREMET et al., 2020). De modo semelhante, o filo Chloroflexi foi relatado em alguns estudos prevalecendo em solos pobres e com baixo pH (JANSSEN et al., 2006; WILL et al., 2010) ou ainda algumas bactérias desse filo que podiam ser recuperadas do solo tinham taxas muito lentas de crescimento e formação de minicolônias (DAVIS et al., 2005; DAVIS et al., 2011). Estudos relataram também que essas bactérias apresentaram menor abundância relativa em parcelas com altos níveis de nitrogênio (FIERER et al., 2012).

Em um estudo, o filo FCPU426 foi negativamente correlacionado com tripes, que é considerado uma praga para a cultura do crisântemo e positivamente correlacionado com ácido clorogênico, que foi relatado com uma função defensiva contra patógenos. No entanto, a variável altura da planta, foi negativamente correlacionada com esse filo. Apesar disso, os autores não evidenciaram se a falta de promoção do crescimento das plantas foi resultado da presença de patógenos ou dos custos gerais da simbiose. Nesse mesmo trabalho foi identificada alta correlação entre os filios FCPU426 e Chloroflexi (MA et al., 2019). Em nosso trabalho, esses dois filios foram detectados apenas em amostras de solo de ambiente cultivado, o que pode ser um indicativo da co-ocorrência desses grupos.

A ocorrência de Epsilonbacteraeota foi exclusiva de raiz natural, bem como Firmicutes foi exclusivo de folha de ambiente natural e Tenericutes foi exclusivo de folha de ambiente cultivado.

Firmicutes parece ser um filo que está associado à supressão de doenças, Mendes et al. (2011) relataram que a abundância de Firmicutes na rizosfera da beterraba sacarina foi consistentemente associada à supressão de doenças radiculares causadas por *Rhizoctonia solani*. Além disso, foi relatado que o enriquecimento de Acidobacteria e Firmicutes na rizosfera do trigo, foi correlacionado com a supressividade de doenças. O oposto, no entanto, foi

verificado para Proteobacteria, em que a sua abundância foi correlacionada negativamente com a supressão de doenças do trigo (SANGUIN et al., 2009).

Sequências em nível de família também demonstraram certas diferenças na estrutura das comunidades microbianas do solo e de compartimentos da planta para os diferentes ambientes estudados. Em solo de ambiente natural, houve o enriquecimento por diferentes famílias, no entanto sequências correspondentes a Acidobacteriaceae, Chitinophagaceae e Solibacteraceae, foram mais abundantes. Já em solo de ambiente cultivado, Streptococaceae foi mais abundante, assim como em raízes de ambiente cultivado foi observada dominância dessa família.

Bactérias da família Acidobacteriaceae parecem estar envolvidas em diferentes atividades no solo. Tang et al. (2021) estudaram como o consórcio de amendoim e cana-de-açúcar pode melhorar a qualidade biológica do solo e relataram que Acidobacteriaceae subgrupo 1, foi positivamente correlacionado com a qualidade do solo medida no sistema consorciado. Além disso, esses resultados sugerem que o consórcio de amendoim e cana-de-açúcar aumenta o teor de N e P disponíveis, aumentando a abundância de microrganismos rizosféricos, especialmente Acidobacteriaceae subgrupo 1.

Membros da família Chitinophagaceae estão amplamente distribuídos em diversos habitats (MADHAIYAN et al., 2015). Em uma investigação com cepas de Chitinophagaceae isoladas de solo rizosférico de leguminosas, foi mostrado que a inoculação de plantas com essas cepas aumentou significativamente o índice de vigor da plântula e a biomassa em sementes de canola, e ainda mostrou resultados de promoção de crescimento de tomate e do amendoim com aumentos significativos na biomassa. Além disso, o teor de nutrientes vegetais (N, P e C) aumentou significativamente em plantas de tomate e amendoim inoculadas com a cepa Vu-144^T. Esses resultados mostram que as novas cepas de Chitinophagaceae são bactérias promotoras de crescimento de plantas, não apenas devido à sua capacidade de solubilizar fosfatos e de sintetizar fitohormônios, mas também por meio de diversos mecanismos de promoção de crescimento de plantas que requerem um estudo mais aprofundado.

Além das duas famílias supracitadas, tem-se também a família *Solibacteriaceae*. Membros dessa família são abundantes e presentes nos diferentes tipos de solo devido à sua versatilidade fisiológica e metabólica. A capacidade de crescer em diferentes gradientes de oxigênio e usar diversos carboidratos e fontes de nitrogênio, foi revelada pela análise do genoma (EICHORST et al., 2018). Chen et al. (2020) mostraram que a abundância relativa de *Solibacteraceae*, entre outras famílias, foi maior no solo e na superfície da raiz, do que no interior da mesma, semelhantemente ao observado em nosso trabalho.

Os grupos bacterianos aqui citados se destacaram em nível de família para o ambiente de ocorrência natural do gênero *Ananas*, no entanto, em solo de ambiente cultivado, foi observada maior abundância de *Streptococcaceae*, assim como foi o grupo dominante em raízes de ambiente cultivado. No entanto, na literatura, não são atribuídos benefícios dessa família para as plantas.

As bactérias foram detectadas nas amostras de raízes, caule e folhas de *Ananas*. O grupo bacteriano mais prevalente no interior da raiz em ambiente natural, além de *Solibacteriaceae*, foi *Xanthobacteraceae*, semelhantemente ao que foi relatado por Chen et al. (2020). Esta mesma família foi identificada em caule de ambiente natural, sendo uma bactéria endofítica dominante no compartimento analisado. Em contraste, no caule de ambiente cultivado, foi observado enriquecimento por *Enterobacteraceae* e *Nocardiaceae*.

Em conformidade com o que foi observado com os índices de diversidade, as folhas de ambiente natural apresentaram um microbioma mais heterogêneo, com a ocorrência de famílias exclusivas para esse compartimento; a exemplo das famílias *Microbacteraceae*, *Micrococaceae* e *Micromonosporaceae*, além das famílias que ocorreram em outras amostras como *Streptococcaceae* e *Xanthobacteraceae*.

Embora a abundância relativa de cada família bacteriana varie nos diferentes ambientes, muitas famílias exibem suas preferências de nicho não apenas em relação ao ambiente, mas também nos solos e diferentes compartimentos da planta; como pode ser visto pela maior abundância relativa ou dominância de alguns grupos bacterianos em solos ou compartimentos internos atuando como endofíticos. No entanto, foi observado que toda a comunidade

bacteriana ou famílias dominantes no interior das plantas (raízes, caule e folhas) formaram uma rede menos complexa e também em alguns casos, diferentes daquelas obtidas no solo. Essas populações endofíticas que colonizaram os diferentes compartimentos podem formar associações íntimas com seu hospedeiro.

A diversidade populacional de comunidades bacterianas derivadas do solo e dos compartimentos da planta também tiveram suas abundâncias relativas avaliadas em nível de gênero.

A comunidade bacteriana identificada em amostras de solo de ambiente natural, mostrou-se diversa sendo o *Bryobacter* mais abundante em nível de gênero. Já em solo cultivado, o *Conexibacter* foi o mais abundante. As espécies de ocorrência nos solos dos ambientes natural e de cultivo são bem diferentes, apesar disso, o gênero *Acidothermus* foi identificado em ambos os solos.

Na literatura a maioria dos trabalhos relatados com membros do gênero *Acidothermus*, referem-se à espécie *Acidothermus cellulolyticus*. Essa é uma bactéria tolerante a ácidos, cujo pH ideal é de 5,5, termofílica com temperatura ideal de crescimento de 55 °C, com grande potencial na indústria de biocombustíveis devido à sua termoestabilidade e atividade em baixo pH (RUBIN et al., 2008).

O mesmo padrão de dominância em amostras de solo foi observado também para as raízes de ambiente natural com enriquecimento pelo gênero *Bryobacter* e no ambiente cultivado o gênero *Conexibacter*, o que demonstra a capacidade dessas bactérias de colonizarem desde o solo rizosférico até os compartimentos internos das raízes.

Bactérias do gênero *Bryobacter* estão relacionadas à promoção do crescimento em plantas, além disso, Dedysh et al. (2016) relataram que *Bryobacter* é um gênero com bactérias que desempenham um papel importante no ciclo biogeoquímico do carbono, pois podem utilizar polissacarídeos e ácidos orgânicos. Tanto *Bryobacter*, quanto os gêneros *Candidatus solibacter* e *Edaphobacter*, pertencem ao filo Acidobacteria, e demonstram preferência por solos de baixo pH. Todos esses gêneros foram exclusivos de ambiente natural,

diferentemente do ambiente cultivado, que demonstrou preferência por outros gêneros.

Além do solo, as raízes de ambiente cultivado também foram enriquecidas com bactérias do gênero *Conexibacter*. Dong et al. (2018) mostraram a ocorrência do gênero *Conexibacter* associado a raízes de *Panax notoginseng*, no entanto, as abundâncias de bactérias desse gênero foram significativamente maiores em folha, flor e caule do que em raízes.

Em amostras de solo natural também foram identificadas sequências correspondentes a outros gêneros, contudo, foram menos abundantes. A exemplo disso, o gênero *Arsenicitalea*, ao qual pertence uma única espécie até o momento, *Arsenicitalea aurantiaca*, foi relatada pelos autores Mu et al. (2020), sendo resistente ao Arsênico. O gênero *Candidatus solibacter*, cujo genoma contém celulasas e β - glicosidases, sugerindo a capacidade de degradar substratos de celulose (YU et al., 2019), e *Edaphobacter*, com capacidade de degradar uma variedade de polímeros de plantas, também pertence ao filo Acidobacteria (MANNISTO et al., 2012). Já o gênero *Roseiarcus*, de acordo com Jiao et al. (2019), decompõem fontes de carbono e foi relatado como um dos táxons centrais únicos em solo com cultivo de arroz.

Em solo cultivado, além do *Conexibacter*, podem ser observados outros gêneros, sendo eles: *Arcobacter*, identificado como endofítico de *Oryza sativa* L. em região salina (KUNDA et al., 2021), *Tumebacillus* um membro altamente abundante de *Firmicutes* em diferentes solos (LIAN et al., 2019) e são capazes de decompor diversas fontes de carbono em ambientes anóxicos (JIAO et al., 2019), e ainda o *Candidatus*, com capacidade de usar substratos complexos, como quitina, hemiceluloses, pectina, amido e xilano (WARD et al., 2009).

Já bactérias do gênero *Nitrobacter*, mostraram preferência por caule e folha no ambiente natural. Estudos realizados com *Nitrobacter* sp. associaram o seu uso ao aumento da taxa de germinação, atuando na melhoria quanto a emergência de plântulas, aumento no crescimento das plantas e proteção das mesmas como resposta a fatores de estresse prolongado em *Lycopersicon esculentum* (IBIENE et al., 2012). Membros desses gêneros são conhecidos como

oxidantes de nitrito e amônio, e contribuem para a nitrificação em solos (PAJARES; BOHANNAN, 2016).

Em caule de ambiente cultivado, os gêneros *Escherichia/Shigella* e *Rhodococcus*, foram dominantes. Representantes desses gêneros são relatados na literatura associados a doenças em humanos (PARSOT et al., 2005; MARTEYN et al., 2012), no entanto estudos relatam benefícios dessas bactérias em solos contaminados por PCB (bifenilas policloradas), em que cepas de *Rhodococcus* foram capazes de degradar *in vitro* vários congêneres de PCB e promover a emergência lateral da raiz na planta modelo *Arabidopsis thaliana in vivo*. Além disso, essas cepas mostraram capacidade de aumentar a biomassa vegetal da espécie em solo contaminado com PCB, tornando-as candidatas ideais para sustentar a rizorremediação de PCB assistida por microrganismos por meio de uma abordagem de bioaugmentação (VERGANI et al., 2019).

Em folhas de ambiente natural além do *Nitrobacter*, outros gêneros foram identificados, os quais são relatados com diversas funções. *Pseudarthrobacter* associado à promoção do crescimento de plantas (PARK et al., 2020), *Streptococcus*, e ainda o gênero *Verrucomicrobia*; um gênero raro de actinomicetos, conhecido por sua capacidade insuperável de produzir metabólitos secundários com diversas atividades biológicas (ZHANG et al., 2020). Em contrapartida, em folhas de ambiente cultivado, não foram detectados gêneros.

A ocorrência e abundância dos gêneros bacterianos nas amostras parece estar diretamente relacionada às condições dos diferentes ambientes, tendo em vista que para cada ambiente e nos compartimentos internos das plantas, foi observada a presença de diferentes gêneros. Isso pode ocorrer devido à disponibilidade de nutrientes, umidade, temperatura favorável e matéria orgânica, onde os grupos microbianos mais abundantes se destacam por sua rápida resposta de crescimento com os recursos disponíveis.

Ao compararmos as amostras, é possível observar o quanto os diferentes ambientes influenciam na composição e abundância dos microrganismos. Alguns autores sugerem que a ocorrência de microrganismos pode ser alterada por múltiplos fatores, sejam eles bióticos (ANSARI; MAHMOOD, 2019) ou abióticos, logo, até discretas mudanças ambientais (micro climas) interferem na composição

do microbioma das plantas. Por comparação, fica claro que as amostras provenientes dos dois ambientes resultaram em uma distribuição de bactérias no solo, raízes, caules e folhas significativamente diferentes, e essas diferenças são importantes ao considerarmos a biodiversidade dos microrganismos e sua função no nicho de ocupação.

Esse estudo mostrou as diferenças em termos de ocorrência e abundância dos microrganismos nos ambientes natural e de cultivo associados ao gênero *Ananas* e as informações levantadas aqui são relevantes e fundamentais quando se pensa em uma nova abordagem de plantios que considera o microbioma associado como estratégico para o benefício das culturas.

Conhecer e acessar esse microbioma nos diferentes ambientes, principalmente o natural, que como foi relatado aqui, é rico em diversidade tanto a nível de solo rizosférico como para os compartimentos das plantas, configura-se em uma estratégia a ser utilizada, a fim de gerir melhor a produção de abacaxizeiros através do recrutamento de comunidades microbianas benéficas, que oferecem as plantas uma diversidade de serviços como promoção do crescimento, nutrição, e proteção para as doenças, além de outros ganhos provenientes dessas interações. Para isso, basta encontrar a melhor maneira de manipulá-lo em benefício das culturas, resultando no aumento da produtividade e sustentabilidade de plantios agrícolas.

Alguns grupos bacterianos identificados em nível de gênero relatados aqui foram pouco estudados e seus papéis precisam ser melhor esclarecidos a fim de entender seu modo de ação em associação com as plantas nos diferentes ambientes.

CONCLUSÕES

- A diversidade populacional revelada pelo escalonamento multidimensional, diagrama de Venn e índices de diversidade, foi mais baixa para o ambiente cultivado em relação ao natural;

- O microbioma do solo e dos compartimentos das plantas são diferentes entre os dois ambientes em nível de filo, família e gênero, mas apesar dessa diferença, alguns grupos bacterianos foram compartilhados entre os ambientes;

- As populações endofíticas que colonizaram raízes, caule e folhas de *Ananas comosus* podem formar associações íntimas com seu hospedeiro;

- Parte da comunidade bacteriana ou grupos dominantes nas raízes, caule e folhas, que formaram uma rede menos complexa, são em sua maioria, diferentes daquelas obtidas no solo;

- Esse estudo fornece valiosas informações sobre o microbioma associado a *Ananas*, o qual pode ser manipulado de forma estratégica para o benefício das culturas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA-MARTÍNEZ, V.; DOWD, S.E.; SUN, Y.; WESTER, D.; ALLEN, V.G. Pyrosequencing analysis for characterization of soil bacterial populations as affected by an integrated livestock-cotton production system. **Applied Soil Ecology**, v. 45, p. 13-25, 2010.

ACOSTA-MARTÍNEZ, V.; ROWLAND, D.; SORENSEN, R.B.; YEATER, K.M. Microbial community structure and functionality under peanut-based cropping systems in a sandy soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 44, p. 681-692, 2008.

ALAWIYE, T. T.; BABALOLA, O. O. Bacterial diversity and community structure in typical plant rhizosphere. **Diversity**, v. 179, 2019.

ALLARD, S. M.; MICALLEF, S. A. The Plant Microbiome: Diversity, Dynamics, and Role in Food Safety. In **Safety and Practice for Organic Food**. Elsevier, pp. 229–257, 2019.

ANSARI, R. A.; SUMBUL, A.; RIZVI, R.; MAHMOOD. Organic soil amendments: potential tool for soil and plant health management. In: ANSARI, R. A.; MAHMOOD, I. (eds). **Plant health under biotic stress**. Springer, Singapore, v. 1, p. 1-35. 2019.

ARAUJO, R.; GUPTA, V. V. S. R.; REITH, F.; BISSETT, A.; MELE, P.; FRANCO, C. M. M. Biogeography and emerging significance of Actinobacteria in Australia and Northern Antarctica soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 146, 107805, 2020.

BERENDSEN, R. L.; PIETERSE, C. M. J.; BAKKER, P. A. H. M. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 8, p. 478-486, 2012.

BERG, G. E.; SMALLA, K. As espécies de plantas e o tipo de solo moldam cooperativamente a estrutura e a função das comunidades microbianas na rizosfera. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 68, p. 1-13, 2009.

BRADER, G.; COMPANT, S.; VESCIO, K.; MITTER, B.; TROGNITZ, F.; MA, L. J.; SESSITSCH, A. Ecology and genomic insights into plant-pathogenic and plant-nonpathogenic endophytes. **Annual Review Phytopathology**, v. 55, p. 61-83, 2017.

BULGARELLI, D.; GARRIDO-OTER, R.; MÜNCH, P. C.; WEIMAN, A.; DRÖGE, J.; PAN, Y.; MCHARDY, A. C.; SCHULZE-LEFERT, P. Structure and Function of the Bacterial Root Microbiota in Wild and Domesticated Barley. **Cell Host & Microbe**, v. 17, n. 3, p. 392-403, 2015.

BULGARELLI, D.; ROTT, M.; SCHLAEPPI, K.; VAN THEMAAT, E. V. L.; AHMADINEJAD, N.; ASSENZA, F. et al. Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota, **Nature**, v. 488, p. 91-95, 2012.

CALLAHAN, B. J.; MCMURDIE, P. J.; ROSEN, M. J.; HAN, A. W.; JOHNSON, A. J.; HOLMES, S. P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature methods**, v. 13, n. 7, p. 581–583, 2016.

CARBONETTO, B.; RASCOVAN, N.; ÁLVAREZ, R.; MENTABERRY, A.; VÁZQUEZ, M. P. Structure, Composition and Metagenomic Profile of Soil Microbiomes Associated to Agricultural Land Use and Tillage Systems in Argentine Pampas. **PLoS One**, v. 9, e99949, 2014.

CHAPARRO, J. M.; BADRI, D. V.; BAKKER, M. G.; SUGIYAMA, A.; MANTER, D. K. E.; VIVANCO, J. M. A exsudação radicular de fitoquímicos em *Arabidopsis* segue padrões específicos que são programados para o desenvolvimento e se correlacionam com as funções microbianas do solo. **PLoS One**, v. 8: e5573, 2013.

CHAUDHARI, D.; RANGAPPA, K.; DAS A.; JAYANTA, L.; BASAVARAJ, S.; KANDPAL, B. K.; SHOUCHE, Y.; RAHI, P. Plant Shapes Its Rhizosphere Microbiome for Nutrient Uptake and Stress Amelioration in Acidic Soils of the North-East Region of India. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 968, 2020.

CHEN, W-C.; KO, C-H.; SU, Y-S.; LAI, W-A.; SHEN, F-T. Metabolic potential and community structure of bacteria in an organic tea plantation. **Applied Soil Ecology**, v. 157, 103762, 2020.

DAVIS, K. E. R.; JOSEPH, S. J.; JANSSEN, P. H. Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, p. 826-834, 2005.

DAVIS, K. E. R.; SANGWAN, P.; JANSSEN, P. H. Acidobacteria, Rubrobacteridae and Chloroflexi are abundant among very slow-growing and mini-colony-forming soil bacteria. **Environment Microbiology**, v. 13, p. 798-805, 2011.

DEDYSH, N.; KULICHEVSKAYA, I. S.; HUBER, K. J.; OVERMANN, J. Defining the taxonomic status of described subdivision 3 Acidobacteria: proposal of Bryobacteraceae fam. nov. Svetlana. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, p. 498–501, 2017.

DELGADO-BAQUERIZO, M.; ELDRIDGE, D. J.; OCHOA, V.; GOZALO, B.; SINGH, B. K.; MAESTRE, F. T. Soil microbial communities drive the resistance of ecosystem multifunctionality to global change in drylands across the globe. **Ecology Letters**, v. 20, p. 1295-1305, 2017.

DONG L, CHENG R, XIAO L, WEI F, WEI G, XU J, WANG Y, GUO X, CHEN Z, CHEN S. Diversity and composition of bacterial endophytes among plant parts of *Panax notoginseng*. **Chinese Medical Journal**, v. 13, PMC6092820, 2018.

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

EICHORST, S. A.; TROJAN, D.; ROUX, S.; HERBOLD, C.; RATTEI, T.; WOEBKEN, D. Genome insights into the *Acidobacteria* reveal strategies for their success in terrestrial environments. **Environment Microbiology**, v. 20, p. 1041-1063, 2018.

EILERS, K. G.; LAUBER, C. L.; KNIGHT, R.; FIERER, N. Shifts in bacterial community structure associated with inputs of low molecular weight carbon compounds to soil. **Soil Biol Biochem**, v. 42, p. 896–903, 2010.

FADIJI, A. E.; BABALOLA, O. O. Metagenomics methods for the study of plant-associated microbial communities: A review. **Journal of Microbiological Methods**, v. 170, p. 2020.

FIERER, N.; LAUBER, C. L.; RAMIREZ, K. S.; ZANEVELD, J.; BRADFORD, M. A. et al. Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. **ISME J**, v. 6, p. 1007-1017, 2012.

FIERER, N.; BRADFORD, M.; JACKSON, R. Toward an ecological classification of soil bacteria. **Ecology**, v. 88, p. 1354-1364, 2007.

FIERER, R. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, p. 579-590, 2017.

GAO, B.; GUPTA, R. S. Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, p. 66-112, 2012.

GOMEZ-ESCRIBANO, J. P.; ALT, S.; BIBB, M. J. Next generation sequencing of actinobacteria for the discovery of novel natural products. **Marine Drugs**, v. 14, 2016.

HO, A.; PAOLO, D.; LONARDO, DI.; BODELIER, P. L. E. Revisiting life strategy concepts in environmental microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, fix006, 2017.

HUGHES, J. B.; HELLMANN, J. J.; RICKETTS, T. H.; BOHANNAN, B. J. M. Counting the Uncountable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, v, 67, n. 10 p. 4399–4406, 2001.

IBIENE, A. A.; AGOGBUA, J. U.; OKONKO, I. O.; NWACHI, G. N. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as bio-fertilizer: Effect on growth of *Lycopersicum esculentus*. **Journal of American Science**, v. 8, p. 318-324, 2012.

JANSSEN, P. H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 1719-1728, 2006.

JIAO, S.; XU, Y.; ZHANG, J.; HAO, X.; LU, Y. Core microbiota in agricultural soils and their potential associations with nutrient cycling. **mSystems**, v. 4:e00313-18, 2019.

JONES, P.; GARCIA, B. J.; FURCHES, A.; TUSKAN, G. A.; JACOBSON, D. Plant host-associated mechanisms for microbial selection. **Frontiers Plant Science**, v. 10, p. 862, 2019.

KERSTERS K.; LISDIYANTI P.; KOMAGATA K.; SWINGS J. The Family Acetobacteraceae: The Genera *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter*, and *Kozakia*. In: Dworkin, M.; Falkow, S.;

Rosenberg, E.; Schleifer, K. H.; Stackebrandt, E. (eds) **The Prokaryotes**. Springer, v. 5, p. 163-200, 2006.

KERSTERS, K.; DE VOS, P.; GILLIS, M.; SWINGS, J.; VANDAMME, P.; STACKEBRANDT, E. Introduction to the proteobacteria. In: DWARKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.H.; STACKEBRANDT, E. (Ed.). **The prokaryotes**. Springer, v. 5, p. 3-37, 2006.

KIELAK, A. M.; BARRETO, C. C.; KOWALCHUK, G. A.; VAN VEEN, J. A.; KURAMAE, E. E. The Ecology of Acidobacteria: Moving beyond Genes and Genomes. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 744, 2016.

KIELAK, A.; PIJL, A. S.; VAN VEEN, J. A.; KOWALCHUK, G. A. Phylogenetic diversity of Acidobacteria in a former agricultural soil. **ISME J**, v. 3, p. 378–382, 2009.

KLEIJN, D.; BOMMARCO, R.; FIJEN, T. P.; GARIBALDI, L. A., POTTS, S. G., VAN DER PUTTEN, W. H. Ecological intensification: bridging the gap between science and practice. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 34, p. 154-166, 2018.

KROLL, S.; AGLER, M. T.; KEMEN, E. Genomic dissection of host-microbe and microbe-microbe interactions for advanced plant breeding. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 36, p. 71–78, 2017.

KUNDA, P.; DHAL, P. K.; MUKHERJEE, A. Endophytic bacterial community of rice (*Oryza sativa* L.) from coastal saline zone of West Bengal: 16S rRNA gene based metagenomics approach. **Meta Gene**, v. 18, p. 79-86, 2018.

LEVY, A.; CONWAY, J. M.; DANGL, J. L.; WOYKE, T. Elucidating bacterial gene functions in the plant microbiome. **Cell Host Microbe**, v. 24 p. 475-485, 2018.

LIAN, T.; MA, Q.; SHI, Q.; CAI, Z.; ZHANG, Y.; CHENG, Y. et al. High aluminum stress drives different rhizosphere soil enzyme activities and bacterial community structure between aluminum-tolerant and aluminum-sensitive soybean genotypes. **Plant Soil**, v. 440, p. 409–425, 2019.

MA, H. K.; PINEDA, A.; HANNULA, S. E.; KIELAK, A. M.; SETYARINI, S. N.; BEZEMER, T. M. Steering root microbiomes of a commercial horticultural crop with plant-soil feedbacks. **Applied Soil Ecology**, v. 150, p. 2019.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; SENTHILKUMAR, S.; PRAGATHESWARI, D.; LEE, J-S.; LEE, K-C. *Arachidicoccus rhizosphaerae* gen. nov., sp. nov., a plant-growth-promoting bacterium in the family Chitinophagaceae isolated from rhizosphere soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, p. 578–586, 2015.

MAESTRE, F. et al. Increasing aridity reduces soil microbial diversity and abundance in global drylands. **Proceedings of National Academy Science**, v. 112, p. 15684–15689, 2015.

MÄNNISTÖ, M. K.; RAWAT, S.; STAROVOYTOV, V.; HÄGGBLÖM, M. M. *Granulicella arctica* sp. nov., *Granulicella mallensis* sp. nov., *Granulicella tundricola* sp. nov. and *Granulicella sapmiensis* sp. nov., novel acidobacteria from tundra soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 2097–2106, 2012.

MARIOTTE, P.; MEHRABI, Z.; BEZEMER, T. M.; DE DEYN, G. B.; KULMATISKI, A.; DRIGO, B.; VEEN, G. C.; VAN DER HEIJDEN, M. G.; KARDOL, P. Plant–soil feedback: bridging natural and agricultural sciences. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 33, p. 129–142, 2018.

MARTEYN B, GAZI A, SANSONETTI P. Shigella: a model of virulence regulation in vivo. **Guts Microbes**, v. 3, n.2, p. 104-20, 2012.

MCMURDIE P. J.; HOLMES S. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **PLoS One**, v. 8: e61217, 2013.

MENDES, R.; KRUIJT, M.; DE BRUIJN, I.; DEKKERS, E.; VAN DER VOORT, M.; SCHNEIDER, J. H. M.; PICENO, Y. M.; DESANTIS, T. Z. ANDERSEN, G. L.; BAKKER, P. A. H. M.; RAAIJMAKERS, J. M. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. **Science** v. 332, p. 1097–1100, 2011.

MITTER, B.; PFAFFENBICHLER, N.; SESSITSCH, A. Plant–microbe partnerships in 2020. **Microbial Biotechnology**, v. 9 p. 635-640, 2016.

MU, Y.; ZHOU, L.; ZENG, X-C.; LIU, L.; PAN, Y.; CHEN, X.; WANG, J. LI, S.; LI, W-J.; WANG, Y. *Arsenicitalea aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Hyphomicrobiaceae, isolated from high-arsenic sediment. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, p. 5478–5484, 2016.

MURRAY, M.G.; THOMPSON, W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, v.8, p.4321-4325, 1980.

Novel PCB-degrading *Rhodococcus* strains able to promote plant growth for assisted rhizoremediation of historically polluted soils. **PLoS One**, v. 14, n. 8: e0221253. 2019.

PAJARES, S.; BOHANNAN, B. J. M. Ecology of Nitrogen Fixing, Nitrifying, and Denitrifying Microorganisms in Tropical Forest Soils. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1045, 2016.

PARK, M.; PARK, Y.; KIM, M.; KIM, M.; IBAL, J. C.; KANG, G.; LEE, G.; TAGELE, S. B.; KWON, H.; KANG, M.; KIM, M.; KIM, S.; SHIN, J. Complete genome

sequence of a plant growth-promoting bacterium *Pseudarthrobacter* sp. NIBRBAC000502772, isolated from shooting range soil in the Republic of Korea. **Korean Journal Microbiology**, v. 56, p. 390-393, 2020.

PARSOT, C. Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli pathogenicity factors. **FEMS Microbiology Letters**, v. 252, p. 11-8, 2005.

PHILIPPOT, L.; RAAIJMAKERS, J. M.; LEMANCEAU, P.; VAN DER PUTTEN, V. D. GOING back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature reviews**, v. 11, p. 789-799, 2013.

PINEDA, A.; KAPLAN, I.; BEZEMER, T. M. Steering soil microbiomes to suppress aboveground insect pests. **Trends Plant Science**. v. 22, p. 770–778, 2017.

PREHEIM, S. P.; PERROTTA, A. R.; MARTIN-PLATERO, A. M.; GUPTA, A.; ALM, E. J. Distribution-Based Clustering: Using Ecology To Refine the Operational Taxonomic Unit. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 21, p. 6593-6603, 2013.

QUAST, C.; PRUESSE, E.; YILMAZ, P.; GERKEN, J.; SCHWEER, T.; YARZA, P.; GLÖCKNER, F. O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic acids research**, v. 41, p. 590-596, 2012.

R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2017. <https://www.R-project.org/>.

RAMIREZ, K.; LAUBER, C.; KNIGHT, R.; BRADFORD, M.; FIERER, N. Consistent effects of nitrogen fertilization on the phylogenetic composition of soil bacterial communities in contrasting systems. **Ecology**, v. 91, p. 3463-3470, 2010.

RODRIGUES, J. L. M. et al. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 3, p. 988-993, 2013.

RUBIN, E. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, v. 454, p. 841–845, 2008.

SANGUIN, H.; SARNIGUET, A.; GAZENGEL, K.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; GRUNDMANN, G. Rhizosphere bacterial communities associated with disease suppressiveness stages of take-all decline in wheat monoculture. **New Phytology**, v. 184, p. 694–707, 2009.

SCHLOSS, P. D.; GEVERS, D.; WESTCOTT, S. L. Reducing the Effects of PCR Amplification and Sequencing Artifacts on 16S rRNA-Based Studies. **PLoS one**, v. 6, 12: e27310, 2011.

SHEREMET, A.; JONES, G. M.; JARETT, J.; BOWERS, R. M.; BEDARD, I.; CULHAM, C.; ELOE-FADROSH, E. A.; IVANOVA, N.; MALMSTROM, R. R.; GRASBY, S. E.; WOYKE, T.; DUNFIELD, P. F. Ecological and genomic analyses of candidate phylum WPS-2 bacteria in an unvegetated soil. **Environment Microbiology**, v. 22, p. 3143-3157, 2020.

SHOKRALLA, S.; SPALL, J. L.; GIBSON, J. F.; HAJIBABAEI, M. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. **Molecular Ecology**, v. 21, n.8, p. 1794-1805, 2012.

SMIT, E.; LEEFLANG, P.; GOMMANS, S.; VAN DEN BROEK, J.; VAN MIL, S.; WERNARS, K. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 2284-2291, 2001.

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

SUDING, K. N.; COLLINS, S. L.; GOUGH, L.; CLARK, C.; CLELAND, E. E.; GROSS, K. L.; MILCHUNAS, D. J. Functional- and abundance-based mechanisms explain diversity loss due to N fertilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 12, p. 4387-4392, 2005.

TANG, X.; JIANG, J.; HUANG, Z.; WU, H.; WANG, J.; HE, L.; XIONG, F.; ZHONG, R.; LIU, J.; HAN, Z.; TANG, R.; HE, L. Sugarcane/peanut intercropping system improves the soil quality and increases the abundance of beneficial microbes. **Journal of Basic Microbiology**. V. 61, n. 2, p. 165-176, 2021.

VERGANI, L.; MAPELLI, F.; SUMAN, J.; CAJTHAML, T.; UHLIK, O.; BORIN, S. WARD, N. L.; CHALLACOMBE, J. F.; JANSSEN, P. H.; HENRISSAT, B.; COUTINHO, P. M.; WU, M.; et. al. Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. **Applied Environment Microbiology**, v. 75, n. 7, p. 2046-2056, 2009.

WEI, Z.; JOUSSET, A. Plant Breeding Goes Microbial. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 7, p. 555-558, 2017.

WILL, C.; THURMER, A.; WOLLHERR, A.; NACKE, H.; HEROLD, N. et al. Horizon-specific bacterial community composition of German grassland soils, as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 6751–6759, 2010.

WU, D.; DOROUD, L.; EISEN, J. Tree OTU: Operational Taxonomic Unit Classification Based on Phylogenetic **Trees**. 2013.

YU, Y.; WU, M.; PETROPOULOS, E.; ZHANG, J.; NIE, J.; LIAO, Y.; LI, Z.; LIN, X.; FENG, Y. Responses of paddy soil bacterial community assembly to different long-term fertilizations in southeast China. **Science of The Total Environment**, v. 656, p. 625-633, 2019.

ZHANG, J.; LI, B.; QIN, Y. *et al.* A new abyssomicin polyketide with anti-influenza A virus activity from a marine-derived *Verrucosispora* sp. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 104, p. 1533–1543, 2020.

ZHANG, N.; CASTLEBURY, L.; MILLER, A.; HUHNDORF, S. M.; SCHOCH, C.; SEIFERT, K.; ROSSMAN, A.; ROGERS, J.; KOHLMAYER, J.; VOLKMANN-KOHLMEYER, B.; SUNG, G-H. An overview of the systematics of the Sordariomycetes based on a four-gene phylogeny. **Mycologia**, v. 98, p. 1076-1087, 2006.

ZUCCHI, T. D.; GUIDOLIN, A. S.; CÔNSOLI, F. L. Isolation and characterization of actinobacteria ectosymbionts from *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Hymenoptera, Formicidae). **Microbiological Research**, v. 166, p. 68-76, 2011.

ARTIGO II

MICROORGANISMOS ASSOCIADOS AO GÊNERO *Ananas* COMO AGENTES PROMOTORES DO CRESCIMENTO EM ABACAXIZEIROS CV. 'BRS IMPERIAL'

¹Artigo a ser ajustado para posterior submissão ao Comitê Editorial do periódico científico Scientia Horticulturae

Microrganismos associados ao gênero *Ananas* como agentes promotores do crescimento em abacaxizeiros cv. 'BRS Imperial'

Resumo: A associação de plantas com microrganismos pode gerar efeitos benéficos no crescimento e desenvolvimento de mudas, assim como no estado de nutrição, na resistência a doenças e no aumento da produtividade. Nesse sentido, este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial uso de microrganismos associados ao gênero *Ananas* na promoção do crescimento de mudas micropropagadas de abacaxizeiros cv. 'BRS Imperial' *in vitro* e na etapa de aclimatização. Para tanto, plantas micropropagadas de abacaxizeiros 'BRS Imperial' foram inoculadas *in vitro* com microrganismos associados ao gênero *Ananas*. As plantas *in vitro* foram avaliadas a cada sete dias em um período de 42 dias, adotando-se as seguintes variáveis: altura da planta (cm) número de folhas, porcentagem de sobrevivência, diâmetro da roseta (mm), diâmetro do caule (mm), massa fresca e seca da parte aérea e raízes (mg). As plantas retiradas do cultivo *in vitro* foram conduzidas à aclimatização em casa de vegetação onde foram realizadas avaliações periódicas semelhantes às realizadas *in vitro*, com adição da contagem de estômatos. Com os dados obtidos foram realizados procedimentos estatísticos utilizando o programa R. Além disso, foi realizada extração de DNA bacteriano, sequenciamento e construção da árvore filogenética. As mudas de abacaxizeiros 'BRS Imperial' responderam diferentemente à microbiolização, realizada com bactérias e fungos dos ambientes natural e de cultivo, com destaque para os mixes 8, e 9 na fase *in vitro* e os mixes 2, 9 e 13 na aclimatização. A partir do sequenciamento com base no gene 16s rRNA e a análise filogenética foram identificados 12 gêneros diferentes associados ao microbioma de *Ananas*, sendo a maioria de importância agrícola. Os resultados obtidos nesse trabalho podem ser considerados promissores e com potencial para ser aplicado *in vitro* e na etapa de aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro visando promoção de crescimento.

Palavras-chave: abacaxizeiros; propagação *in vitro*; aclimatização; microbioma.

Microorganisms associated to the genus *Ananas* as growth promoting agents in cv. 'BRS Imperial' pineapple

Abstract: The association of plants with microorganisms can be beneficial to growth and development of plantlets, as well as nutrition, disease resistance and productivity. The objective of this work was to evaluate potential use of microorganisms associated to the genus *Ananas* in promotion of growth of micropropagated pineapple plants the 'BRS Imperial' and the step acclimatization. Micropropagated pineapple plants from the 'BRS Imperial' were inoculated *in vitro* with microorganisms associated with the genus *Ananas*. *In vitro* plantlets were evaluated every seven days for a period of 42 days for the following variables: plant height (cm), number of leaves, percentage of survival, diameter of the rosette (mm), stem diameter (mm), and fresh and dry mass of aerial part and roots (mg). Plants withdrawn from the *in vitro* cultivation were acclimated in greenhouses where the same periodical evaluations were carried out, with addition of stomata count. Statistical analysis of the data was carried out using the R software. DNA extraction of bacteria, as well as sequencing and construction of a phylogenetic tree, were also carried out. 'BRS Imperial' pineapple plantlets responded differently according to the microbiolization using bacteria and fungi from natural and cultivated environments highlighting mixes 8 and 9 in the *in vitro* phase and mixes 2, 9 and 13 during the acclimation phase. From sequencing of the 16sRNA gene, the phylogenetic tree was constructed and 12 different genus associated to the microbiome of *Ananas* were identified; most of agricultural importance. Results are promising with potential for use *in vitro* as well as during acclimatization of micropropagated pineapples aiming growth.

Key words: pineapples; *in vitro* propagation; acclimatization; microbiome.

INTRODUÇÃO

O abacaxi está entre as frutas tropicais mais consumidas em todo o mundo e tem importância econômica e social em mais de 70 países (CRESTANI et al., 2010). Em 2016, a produção mundial alcançou aproximadamente 25,80 milhões de toneladas, em uma área colhida de 1,04 milhão de hectares (FAO, 2018). No Brasil, a fruta é produzida em todos os estados com uma área colhida de 67.17 hectares e uma produção de 1.62 milhões de toneladas em 2019 (IBGE, 2019).

A variedade mais plantada no Brasil é a 'Pérola', que por sua vez é suscetível à fusariose, a doença mais importante da cultura é causada pelo fungo *Fusarium guttiforme*. Esse panorama tem levado à busca de novas variedades resistentes e que possam atender, tanto às preferências do produtor, como do consumidor. Dentre os fatores que poderiam ser elencados para a adoção eficiente de uma nova variedade, a obtenção de mudas de qualidade fitossanitária garantida, está entre as mais importantes.

A propagação do abacaxizeiro é assexuada, produz poucas mudas por planta, além de poder acarretar a disseminação das pragas e doenças comprometendo toda área de cultivo. Em vista disso, vários métodos têm sido desenvolvidos a fim de que garantam a qualidade fitossanitária do material propagativo e em quantidade que possa atender a demanda do cultivo. Dentre essas técnicas, a micropropagação por cultura de tecidos, possibilita a produção de um elevado número de mudas, com um pequeno espaço físico, em curto espaço de tempo e com uma qualidade fitossanitária superior a outros métodos (BOTELLA et al., 2018).

Existem vários trabalhos que relatam protocolos de sucesso para a produção de mudas de abacaxi por cultura de tecidos (PEREIRA et al., 2006; PASQUAL et al., 2008; SOUZA et al., 2012a, SOUZA et al., 2012b; SOUZA et al., 2013; ALVES et al., 2014; SANTOS et al., 2015). Entretanto uma das etapas é reconhecida como limitante, que é a aclimatização, onde as plantas são submetidas a condições autotróficas, ou seja, sua saída das condições *in vitro* que consiste em uma série de adaptações morfofisiológicas. O tempo de aclimatização é longo e o crescimento é lento, o que onera o custo da muda e demanda

pesquisas com vistas a reduzir esse tempo e otimizar o processo de micropropagação (BARBOZA et al., 2006; BALDOTTO et al., 2010; ARAGÓN et al., 2012).

Dentre as estratégias que podem ser usadas está o uso de microrganismos promotores de crescimento, uma vez que sua aplicação promove benefícios na propagação de culturas de interesse econômico e social (LOCATELLI et al., 2002; MORAES et al., 2010; REGALADO et al., 2017; BEZERRA et al., 2019).

Os microrganismos podem promover o crescimento e a saúde das plantas por uma diversidade de fatores, tais como, a capacidade de solubilizar P inorgânico e mineralizar P orgânico deixando-o disponível para as plantas, o que consiste em uma importante estratégia para melhorar a eficiência no aproveitamento deste nutriente no solo (DIN, et al., 2019); fixação biológica do nitrogênio por meio da conversão da molécula de N₂ gasoso em espécies químicas nitrogenadas que podem ser prontamente utilizadas pelas plantas (BASHAN et al., 2014), produção de reguladores de crescimento que auxiliam no desenvolvimento vegetal (LOPEZ, et al., 2019) e aporte para o desenvolvimento mediante a regulação da resposta imune da planta (STRINGLIS et al., 2018).

Como resultado de anos de seleção natural e evolução, acredita-se que as plantas são, em parte, dependentes do microbioma da rizosfera para realização de funções vitais de defesa, saúde e crescimento. No entanto, evidências recentes sugerem que, embora as consequências funcionais sejam desconhecidas, o processo de domesticação das culturas alterou os microbiomas recrutados pelas plantas (WALLENSTEIN, 2017). Em comparação com as plantas ancestrais que são consideradas mais diversificadas e adaptadas aos solos pré-agrícolas, os cultivares modernos das plantas podem ter perdido algumas das características necessárias para recrutar o microbioma específico do hospedeiro durante o processo de domesticação (LEFF et al., 2016; PEREZ-JARAMILLO et al., 2016).

Logo, uma "neodomesticação" de plantas, que aproveita ao máximo as relações mutualísticas que ocorrem entre plantas e microrganismos, é viável para uma agricultura inovadora (DUHAMEL; VANDENKOORNHUYSE, 2013). Essa nova perspectiva torna-se cada vez mais relevante, tendo em vista que a

progressão desse conhecimento pode gerar informações e subsidiar modificações que possam levar às abordagens de plantios mais sustentáveis.

Nesse sentido, no presente estudo foram considerados como recursos biológicos, para as mudas *in vitro* de abacaxizeiros, os microbiomas coletados nos ambientes de ocorrência natural de *Ananas* e os provenientes de área de cultivo comercial, bem como os microbiomas associados aos diferentes estratos das plantas, se de folhas, caule, raízes ou solo rizosférico, tendo em vista que os microrganismos podem habitar em diferentes ambientes e compartimentos e assim terem relações bem estabelecidas com as plantas. Relatos acerca da distribuição entre bactérias e fungos, nos diferentes ambientes, bem como a abundância e predominância em compartimentos específicos das plantas foram discutidos em Souza et al. (2019) e serviram de base para o estabelecimento desse trabalho.

O conhecimento e a capacidade de manipular o microbioma das plantas podem configurar um recurso biotecnológico alinhado aos interesses de diminuição dos custos de produção e aumento da sustentabilidade na agricultura, como por exemplo, a aplicação de microrganismos com capacidade de promover o crescimento vegetal ou microrganismos que atuam como agentes de controle biológico de pragas e doenças (MENDES et al., 2013).

Esse recurso biotecnológico pode ser usado, portanto, no caso da aclimatização de plantas micropropagadas de abacaxizeiro, etapa do processo que se constitui em uma das limitações para o uso dessas mudas em larga escala (SOUZA et al., 2013). A microbiolização pode ser uma alternativa para viabilizar essas mudas.

Nesse sentido, este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial uso de microrganismos associados ao gênero *Ananas* na promoção do crescimento de mudas micropropagadas de abacaxizeiros cv. 'BRS Imperial' *in vitro* e na etapa de aclimatização.

MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho foram utilizadas plantas *in vitro* de *Ananas comosus* var. *comosus* cv. 'BRS Imperial' fornecidas pelo Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (LCTV) da Embrapa Mandioca e Fruticultura, totalizando 600 plantas. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 24 repetições e 25 tratamentos, conforme mostrado na Tabela 1, sendo que plantas não microbiolizadas constituíram o controle. As plantas utilizadas no trabalho foram microbiolizadas com bactérias e fungos, separadamente, presentes na coleção biológica de microrganismos associados a *Ananas* spp. obtidos de amostras de solo e plantas (folha, caule e raízes) coletadas em ambientes natural e cultivado (SOUZA et al., 2019).

Para o preparo das suspensões, foram reativados 157 isolados de bactérias, divididos em quatorze grupos pela origem e tipo de amostra, sendo 11 isolados bacterianos para cada um dos mixes produzidos. Os isolados de bactérias foram reativados em placas de Petri contendo meio Ágar Nutriente e incubados em BOD a 25 °C, por 24 h. Após o período de incubação, 5 ml de solução salina (MgCl₂ a 10 mM) foram acrescentados em cada placa e as colônias raspadas com uso da alça de Drigalsky. Os líquidos obtidos de cada placa com diferentes isolados para os grupos constituíram os mixes e foram reunidos em diferentes béqueres, para cada uma das quatorze suspensões. As mesmas tiveram as absorbâncias definidas e ajustadas para 0,1 ($\lambda = 550$ nm), que corresponde a 10⁸ ufc/mL (SOUZA, 2011; CUNHA et al., 2006).

Já para os tratamentos estabelecidos com fungos foram feitas suspensões de esporos. Para isso, selecionou-se os isolados, sendo 12 fungos para cada um dos mixes produzidos. Os fungos cresceram em placas de Petri contendo BDA incubados em BOD a 25 °C durante 10 dias. Após este período adicionaram-se 10 mL de água destilada esterilizada à cada placa de Petri e o micélio raspado com uso de pincéis estéreis. Em seguida, as suspensões foram filtradas em camada dupla de gaze a fim de remover partes de micélio e/ou meio de cultura e reunidas em béqueres distintos para cada um dos tratamentos. Posteriormente,

todas as suspensões foram ajustadas para concentração de 10^7 esporos mL^{-1} pela contagem de esporos em hemocitômetro do tipo Neubauer.

Quanto ao preparo do substrato para introdução das plantas *in vitro*, foram separados tubos de ensaio nos quais foram introduzidos 10 g de substrato autoclavado. Nesses tubos foram adicionados ao substrato, 4 mL de meio líquido contendo sais e vitaminas MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com BAP $0,20 \text{ mg L}^{-1}$, o qual teve seu pH ajustado para 5,7. Após a inserção do meio líquido ao substrato nos tubos de ensaio, estes foram autoclavados a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 20 minutos.

Aos substratos autoclavados contidos nos tubos de ensaio foram adicionadas as suspensões dos microrganismos conforme os diferentes tratamentos, e nestes tubos foram introduzidas as plantas. As suspensões com bactérias foram semeadas nos substratos e as plantas foram inseridas três dias após a semeadura. Já para os tratamentos com fungos, as plantas foram inseridas no substrato dez dias após a semeadura. Quanto ao controle, esse foi composto de plantas não tratadas com microrganismos. Esses tratamentos foram mantidos em sala de crescimento com condições de incubação de $27 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tabela 1. Microrganismos que compõem os tratamentos inoculados em plantas de abacaxizeiros da cv. 'BRS Imperial' (SOUZA et al., 2019). Cruz das Almas, Bahia, Fevereiro de 2021.

Sigla	Tratamentos
Mix 1	Bactérias de solo de ambiente natural
Mix 2	Bactérias de solo de ambiente natural
Mix 3	Bactérias de solo de ambiente natural
Mix 4	Bactérias de solo de ambiente natural
Mix 5	Bactérias endofíticas de raízes de ambiente natural
Mix 6	Bactérias endofíticas de caule de ambiente natural
Mix 7	Bactérias endofíticas de folha de ambiente natural
Mix 8	Bactérias de solo de ambiente cultivado
Mix 9	Bactérias de solo de ambiente cultivado
Mix 10	Bactérias de solo de ambiente cultivado
Mix 11	Bactérias de solo de ambiente cultivado
Mix 12	Bactérias endofíticas de raízes de ambiente cultivado
Mix 13	Bactérias endofíticas de caule de ambiente cultivado
Mix 14	Bactérias endofíticas de folha de ambiente cultivado
Mix 15	Fungos de solo de ambiente natural
Mix 16	Fungos de solo de ambiente natural
Mix 17	Fungos endofíticos de raízes de ambiente natural
Mix 18	Fungos endofíticos de caule de ambiente natural
Mix 19	Fungos endofíticos de folha de ambiente natural
Mix 20	Fungos endofíticos de folha de ambiente cultivado
Mix 21	Fungos de solo de ambiente cultivado
Mix 22	Fungos de solo de ambiente cultivado
Mix 23	Fungos endofíticos de raízes de ambiente cultivado
Mix 24	Fungos endofíticos de caule de ambiente cultivado
CONTROLE	Plantas não tratadas com microrganismos

As plantas foram avaliadas a cada sete dias após a microbiolização em um período de 42 dias, adotando-se as seguintes variáveis: altura da planta (cm) número de folhas e sobrevivência. Já as variáveis diâmetro da roseta (mm), diâmetro do caule (mm) e as avaliações destrutivas de massa fresca e seca da parte aérea e raízes (mg) foram avaliadas ao final dos 42 dias.

Aos dados obtidos em periodicidade foi aplicada a fórmula para o cálculo da área abaixo da curva de crescimento (AACP), nome adaptado da fórmula AACPD = $\sum [(y_1+y_2)/2]*(t_2-t_1)$, onde y_1 e y_2 que refere-se a duas avaliações

consecutivas realizadas nos tempos t_1 e t_2 , respectivamente (CAMPBELL; MADDEN, 1990), e para avaliar como os tratamentos e as variáveis estavam relacionadas, foi realizada a construção dos *boxplots* e *heatmap*, utilizando o programa estatístico R (R Development Core Team, 2017).

As plantas advindas do experimento do cultivo *in vitro* foram transplantadas para copos plásticos com substrato orgânico, autoclavado e mantidas em casa de vegetação por um período de 150 dias (Figura 1), onde passaram por avaliações periódicas (aos 60, 90, 120, e 150 dias), considerando as seguintes variáveis quantitativas: ALT - altura da planta (cm), DIA - diâmetro da copa (cm), e NF - número de folhas.



Figura 1. Experimento estabelecido com abacaxizeiros cv. 'BRS Imperial' em casa de vegetação. Embrapa, Cruz das Almas, Bahia, Fevereiro de 2021.

Ao final dos 150 dias foram retiradas três plantas de cada tratamento para avaliação destrutiva realizada no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais das seguintes variáveis: NR - número de raízes, CR - comprimento da raiz principal (cm), MFF - massa fresca das folhas (g), MFR - massa fresca das raízes (g). Após secagem em estufa a 60 °C e estabilização da massa das amostras, foram obtidos os dados referentes a MSF - massa seca das folhas (g) e MSR - massa seca das raízes (g).

O delineamento utilizado para o experimento em casa de vegetação foi o inteiramente casualizado (desbalanceado), com 19 tratamentos e número de repetições variável (7 a 16) devido a perdas na fase do cultivo *in vitro*.

Nesse período também foi realizada a contagem do número de estômatos, a fim de se obter a densidade estomática por mm². Para tanto foi utilizada a técnica de impressão epidérmica a partir da folha D de três repetições de cada tratamento, em seguida foi inserida uma gota de adesivo instantâneo universal sobre uma lâmina de vidro e a região mediana da folha D de cada repetição foi pressionada sobre uma lâmina de vidro por aproximadamente 10 s. Após esse período a folha foi separada da lâmina. Depois de confeccionadas, foi realizada a contagem estomática das lâminas na área de 1 mm², e para cada lâmina foram realizadas cinco contagens, totalizando 15 contagens nas três lâminas por tratamento. As lâminas foram visualizadas com o auxílio do microscópio de luz Olympus BX51 (Olympus, Tokyo, Japan). Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott em 5% de significância.

Quanto à análise estatística, aos dados obtidos em periodicidade na fase de aclimatização foi aplicada a fórmula para o cálculo da área abaixo da curva de crescimento (AACP). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% em probabilidade. A fim de avaliar como os tratamentos e as variáveis estavam relacionadas, foi realizada a construção dos *boxplots*, análise de correlação, *heatmap* e componentes principais utilizando o programa estatístico R (R Development Core Team, 2017).

Aos dados obtidos nas fases *in vitro* e na aclimatização, bem como em fases posteriores foi realizado o ranqueamento com base no índice de Mulamba & Mock (1978) a fim de selecionar os melhores tratamentos para sequenciamento dos microrganismos.

Dentre os melhores tratamentos evidenciados a partir das análises realizadas procedeu-se às extrações de DNA das bactérias que compunham cada tratamento a fim de identificá-las em nível de gênero/espécie. Para tanto, as culturas bacterianas foram crescidas em meio nutriente (1,5 g extrato de carne, 1,5 g extrato de levedura, 5 g peptona, 5 g NaCl, 15 g de ágar e 1000 ml água

destilada esterilizada) por 24 horas, a 28°C, em câmara BOD. 1 µl de cada uma das amostras das colônias dos isolados foram transferidas para microtubo com capacidade de 200 µl, contendo 20 µl de água deionizada autoclavada. Em seguida as amostras foram submetidas à temperatura de 90 °C por 10 min, visando a desnaturação das células e liberação do DNA genômico.

Procedeu-se também à amplificação por PCR do gene ribossomal 16S dos DNA's extraídos, o qual foi amplificado utilizando-se os primers direto (8SF5: AGAGTTTGATCCTGGCTCA) e reverso (1492R5: GGTTACCTTGTTACGACTT). As reações de amplificação foram preparadas com um volume final de 25 µL, contendo os seguintes reagentes: Tris-HCl 10 mM (pH 8,3), MgCl₂ 2,0 mM, 0,2 mM de cada um dos dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 0,2 µM de cada primer, 20 ng de DNA genômico e 1,25 unidade de Taq DNA polimerase. As amplificações de PCR foram realizadas em termociclador Vertiti (Applied Biosystems) de acordo com o seguinte programa: 95 °C durante 5 min, 30 ciclos a 95 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min e 72 °C durante 2 min, uma extensão final a 72 °C durante 7 min e 10 °C. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,0 %, corados com brometo de etídio na concentração de 0,5 mg mL⁻¹ e visualizados em transiluminador de luz UV. Os perfis eletroforéticos das bandas foram fotografados utilizando o sistema de fotodocumentação Gel Carestream 212 PRO (Kodak). Os produtos de PCR foram enviados para sequenciamento (tipo Sanger) em empresa terceirizada (Macrogen inc, Coréia do Sul), ao todo 164 amostras. Após o recebimento, os dados das sequências direta e reversa foram utilizadas para formação das sequências consenso do rRNA 16S, com software alinhador Bioestat.

As sequências do gene 16S rRNA dos isolados foram comparadas às do GenBank (NCBI) por meio do programa BlastN (ALTSCHUL et al., 1990). A partir desses resultados, as sequências para as espécies tipo bacteriano correspondentes foram usadas para construir alinhamentos de sequência múltipla (MSA). As sequências de rRNA 16S das espécies-tipo usadas na análise filogenética foram recuperadas da Lista de Nomes Procarióticos com sua posição na Nomenclatura (LPSN) (PARTE et al., 2020). Para a abordagem filogenética, o servidor GUIDANCE2 (SELA et al., 2015) com o algoritmo de alinhamento MAFFT

(KATOH et al., 2013) foi usado para garantir que apenas posições com altas probabilidades de serem corretamente alinhadas fossem usadas. ModelFinder (SUBHA et al., 2017) foi usado para encontrar o melhor modelo de substituição de nucleotídeos para os dados. A análise filogenética foi realizada com o software IQ-TREE 2 (MINH et al., 2020), utilizando o método de Máxima Verossimilhança (ML). A árvore foi editada usando o programa FigTree v1.4.4 (RAMBAUT, 2012). A análise envolveu um total de 110 sequências de nucleotídeos.

RESULTADOS

In vitro

Os dados coletados aos 60, 90, 120 e 150 dias para o crescimento das plantas e número de folhas foram integralizados e calculados pela área abaixo da curva de progresso. Os resultados apontam para diferenças entre os tratamentos testados. Para a variável de crescimento verificada no comprimento das plantas (Figura 2.A), *in vitro*, foi observado que o controle, o mix 9, 8 e 19 exibiram comportamento bem próximo. Os resultados obtidos para os demais tratamentos foram insatisfatórios, com destaque para as plantas microbiolizadas com o mix 22. Em relação ao número de folhas (Figura 2.B), em plantas não microbiolizadas (controle) foram observados os melhores resultados. Todavia, os mixes 11, 9, 8, 19, 13 e 7 promoveram efeito semelhante. As plantas microbiolizadas com o mix 16 responderam negativamente à variável analisada.

Quanto as taxas de sobrevivências (Figura 2.C) as plantas microbiolizadas com o mix 9, 8, 11, 5, 12, 7, 6, 22, 02, 14, 13 e controle obtiveram as maiores taxas de sobrevivência, o contrário foi verificado em plantas microbiolizadas com o mix 20, 18, 17, 15, 24 e 23 com o pior resultado registrado para o mix 16.

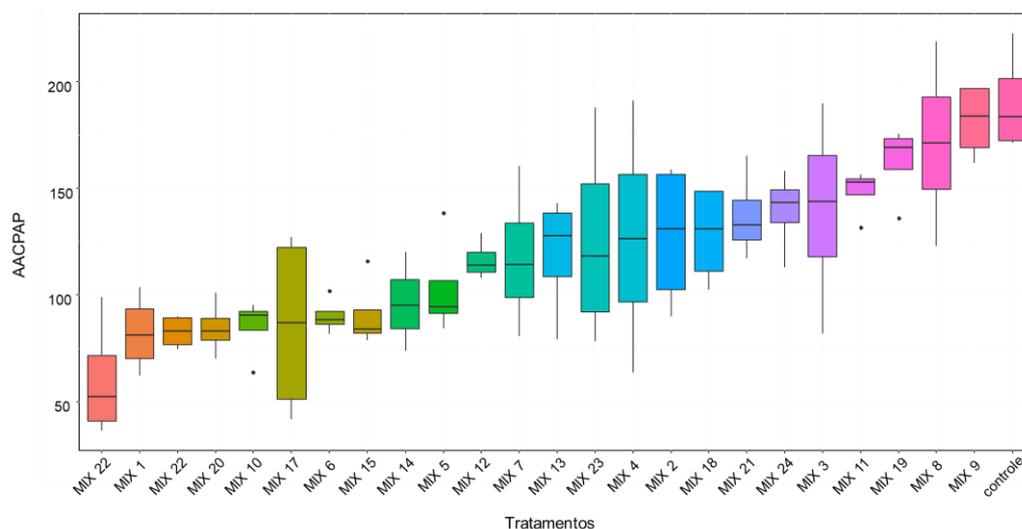
Observando-se a variável diâmetro do caule (Figura 2.D), houve o maior incremento no diâmetro da muda quando foram microbiolizadas com os mixes 4, 9, 3, 2 e 20. As mudas microbiolizadas com os mixes 24, 13, 19, 10, 17 e 15 apresentaram menor diâmetro da muda.

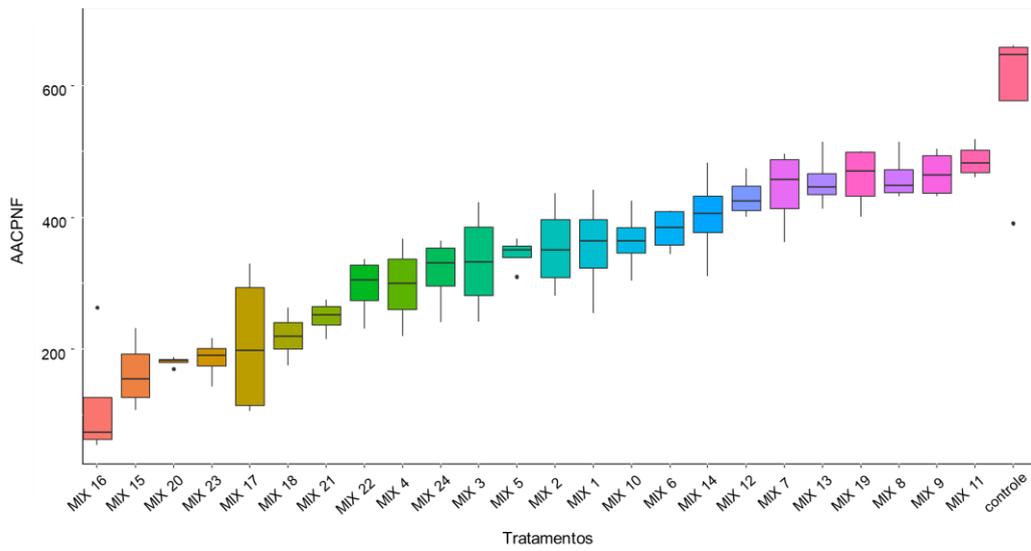
Quanto ao diâmetro da roseta (Figura 2.E) observou-se que as plantas microbiolizadas com o mix 9 obtiveram os melhores resultados, semelhantemente ao mix 8. Entretanto os mixes 24, 20, 12, 16 e 18 induziram os piores resultados.

Para a massa fresca das raízes (Figura 2.F) as plantas obtiveram diferenças bem discretas, no entanto, os mixes 21 e 22 promoveram maior ganho de massa. O contrário foi observado em plantas microbiolizadas com o mix 20. Já para massa fresca da parte aérea (Figura 2.G), os melhores resultados foram obtidos em plantas microbiolizadas com o mix 9, porém os mixes 8, 11, 12, 2, 3 e o controle promoveram resultados semelhantes. Entretanto, plantas microbiolizadas com os mixes 20, 17, 18, 15, 24 e 16 foram inferiores quando comparado aos demais tratamentos analisados.

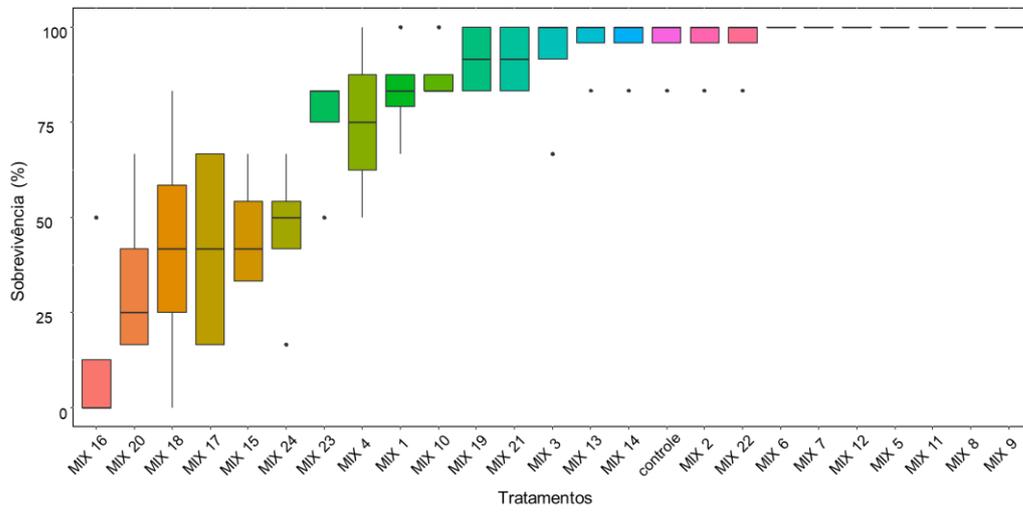
Em relação a massa seca das raízes (Figura 2.H) foi verificado que plantas tratadas com o mix 22 exibiram os melhores resultados, além disso resultados semelhantes foram obtidos com os mixes 9, 8 e 11. Entretanto, as mudas tratadas com os mixes 20, 16, 24, 17 e 19 mostraram comportamento inferior em relação aos demais tratamentos.

Para a massa seca da parte aérea (Figura 2.I) verificou-se que os melhores resultados foram obtidos em plantas tratadas com o mix 19. Apesar disso, outros tratamentos também proporcionaram incremento a exemplo dos mixes 9, 4 e 3. No entanto, plantas tratadas com os mixes 20, 16, 10, 5, 23, 17, 24, 21 e sobretudo o controle foram inferiores aos demais tratamentos.

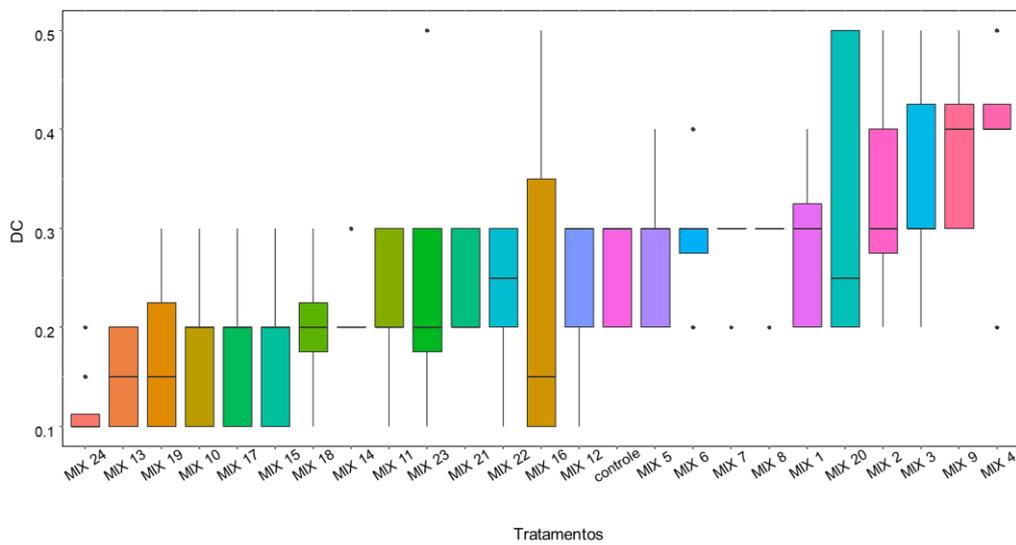




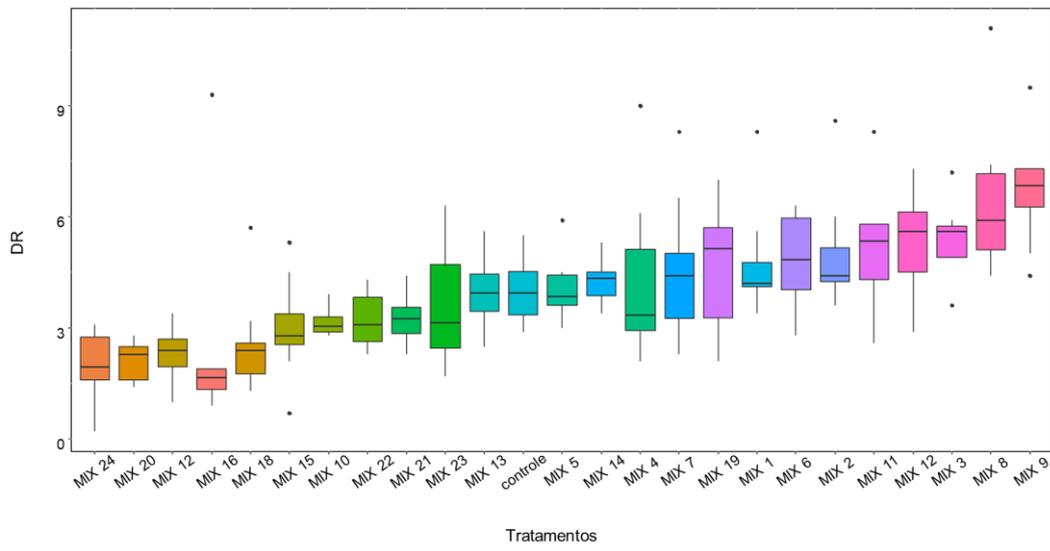
B



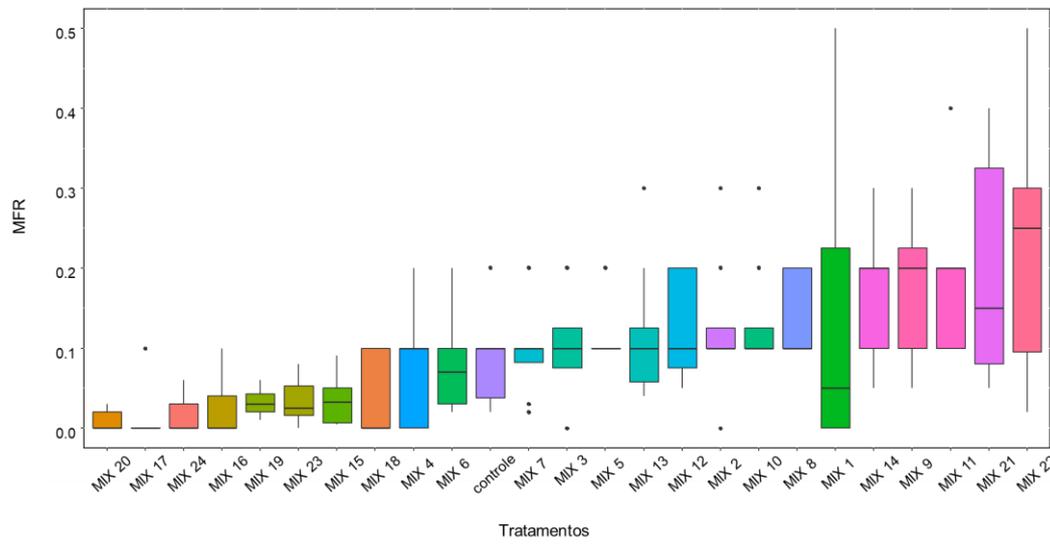
C



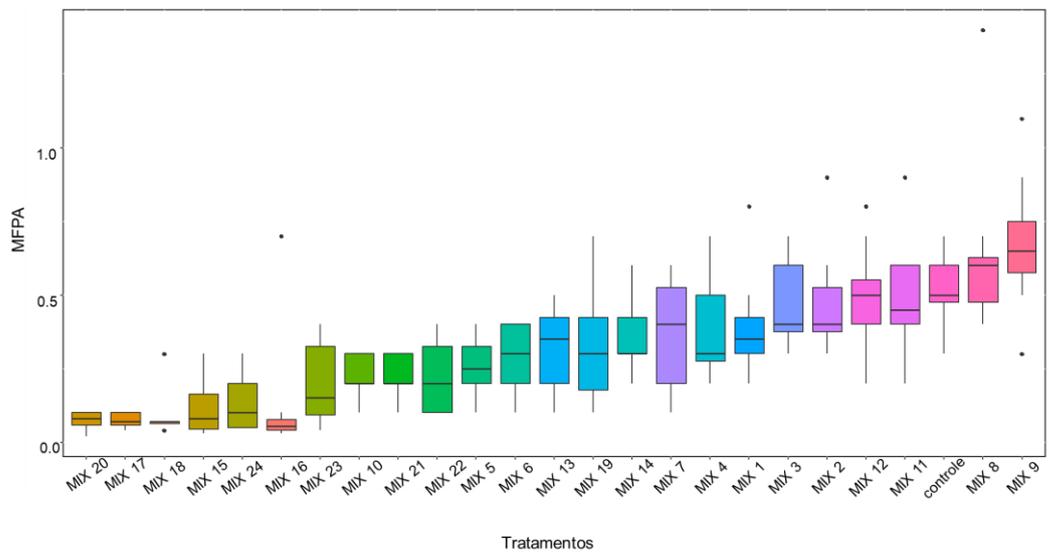
D



E



F



G

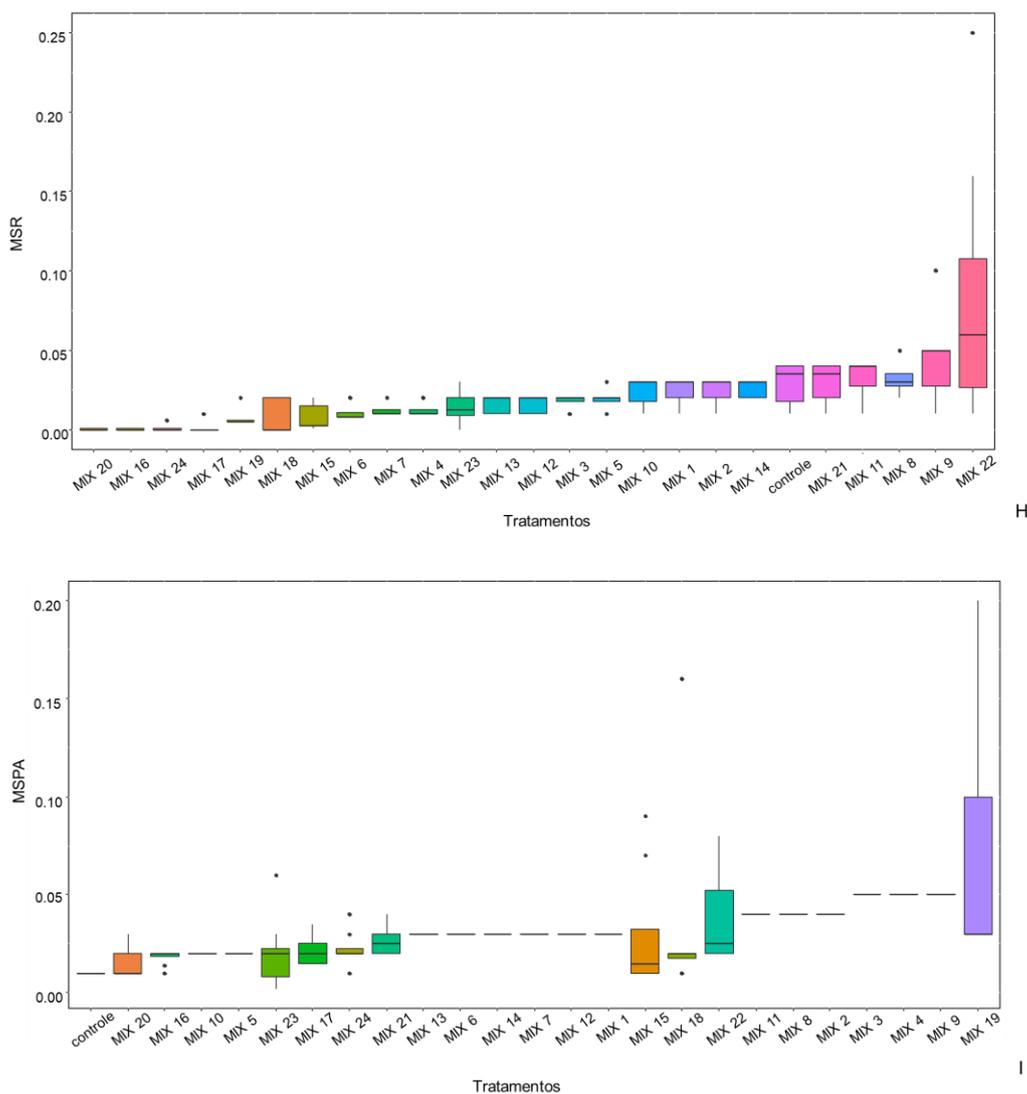


Figura 2. (A-I) Boxplot representativo das variáveis: A – AACPPAP (Área Abaixo da Curva de Progresso para a variável Altura da Planta); B – AACPNF (Área Abaixo da Curva de Progresso para a variável Número de Folhas); C – Porcentagem de Sobrevivência; D – Diâmetro da caule (mm); E – Diâmetro da roseta (cm); F – Massa Fresca das Raízes (mg); G – Massa Fresca da Parte Aérea (mg); H – Massa Seca das Raízes (mg); I – Massa Seca da Parte Aérea, e dos 25 tratamentos: (Mix 1 (Bactérias totais de solo de ambiente natural); Mix 2 (Bactérias de solo de ambiente natural); Mix 3 (Bactérias de solo de ambiente natural); Mix 4 (Bactérias de solo de ambiente natural); Mix 5 (Bactérias endofíticas de raízes de ambiente natural); Mix 6 (Bactérias endofíticas de caule de ambiente natural); Mix 7 (Bactérias endofíticas de folha de ambiente natural); Mix 8 (Bactérias de solo de

ambiente cultivado); Mix 9 (Bactérias de solo de ambiente cultivado); Mix 10 (Bactérias de solo de ambiente cultivado); Mix 11 (Bactérias de solo de ambiente cultivado); Mix 12 (Bactérias endofíticas de raízes de ambiente cultivado); Mix 13 (Bactérias endofíticas de caule de ambiente cultivado); Mix 14 (Bactérias endofíticas de folha de ambiente cultivado)); e fungos (Mix 15 (Fungos de solo de ambiente natural); Mix 16 (Fungos de solo de ambiente natural); Mix 17 (Fungos endofíticos de raízes de ambiente natural); Mix 18 (Fungos endofíticos de caule de ambiente natural); Mix 19 (Fungos endofíticos de folha de ambiente natural); Mix 20 (Fungos endofíticos de folha de ambiente cultivado); Mix 21 (Fungos de solo de ambiente cultivado); Mix 22 (Fungos de solo de ambiente cultivado); Mix 23 (Fungos endofíticos de raízes de ambiente cultivado); Mix 24 (Fungos endofíticos de caule de ambiente cultivado); CONTROLE (Plantas não tratadas com microrganismos). Cruz das Almas, Bahia, Fevereiro de 2021.

O *heatmap* indicou a formação de quatro grupos (Figura 3). No G1 encontram-se os tratamentos que induziram respostas mais satisfatórias nas plantas, com resultados promissores para a maior parte das variáveis analisadas. Este grupo foi formado em sua maioria por bactérias endofíticas (Mixes 7, 12 e 13) e de solo (Mixes 8, 9 e 11), no entanto um tratamento composto de fungos endofíticos (Mix 19) também respondeu positivamente, seguido pelo G2 com tratamentos formados por bactérias, tanto de solo (Mixes 1, 2 e 10), como as endofíticas (Mixes 5, 6 e 14) e também o CONTROLE. O G3 foi constituído em sua maioria por fungos endofíticos (Mixes 18 e 24), e de solo (Mixes 21 e 22), no entanto também se encontram bactérias de solo (Mixes 3 e 4). Já o G4 foi formado pelos tratamentos que mostraram resultados inferiores para a maioria das variáveis, além disso esse grupo foi formado apenas por fungos endofíticos (Mixes 17, 20 e 23) e de solo (Mix15 e 16).

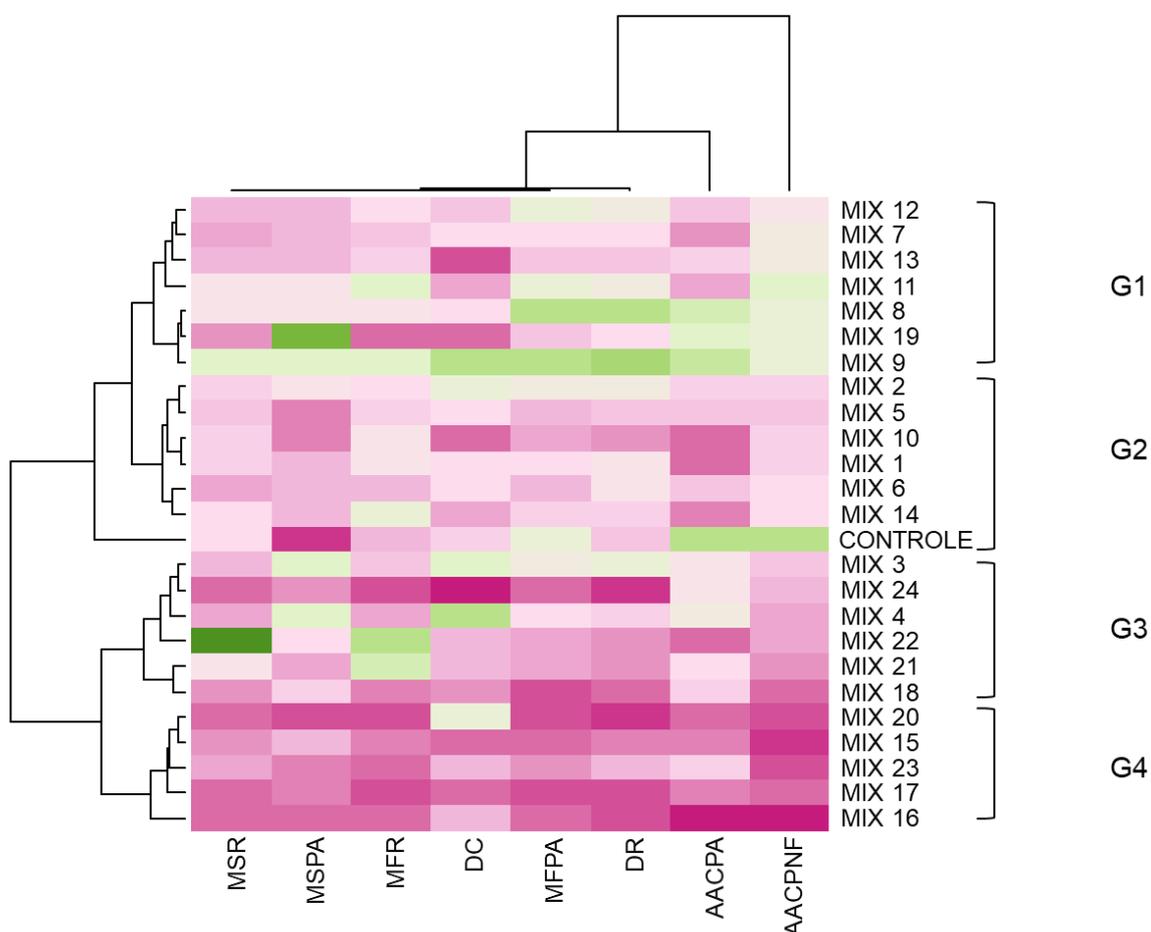


Figura 3. *Heatmap* formado a partir das variáveis: AACPA (Área Abaixo da Curva de Progresso para a variável Altura da Planta); AACPNF (Área Abaixo da Curva de Progresso para a variável Número de Folhas); Diâmetro da caule (mm); Diâmetro da roseta (cm); Massa Fresca das Raízes (mg); Massa Fresca da Parte Aérea (mg); Massa Seca das Raízes (mg); Massa Seca da Parte Aérea, e dos 25 tratamentos que se constituem em grupos de plantas microbiolizadas com bactérias (Mix 1 (Bactérias totais de solo de ambiente natural); Mix 2 (Bactérias de solo de ambiente natural); Mix 3 (Bactérias de solo de ambiente natural); Mix 4 (Bactérias de solo de ambiente natural); Mix 5 (Bactérias endofíticas de raízes de ambiente natural); Mix 6 (Bactérias endofíticas de caule de ambiente natural); Mix 7 (Bactérias endofíticas de folha de ambiente natural); Mix 8 (Bactérias de solo de ambiente cultivado); Mix 9 (Bactérias de solo de ambiente cultivado); Mix 10 (Bactérias de solo de ambiente cultivado); Mix 11 (Bactérias de solo de ambiente cultivado); Mix 12 (Bactérias endofíticas de raízes de ambiente cultivado); Mix 13

(Bactérias endofíticas de caule de ambiente cultivado); Mix 14 (Bactérias endofíticas de folha de ambiente cultivado)); e fungos (Mix 15 (Fungos de solo de ambiente natural); Mix 16 (Fungos de solo de ambiente natural); Mix 17 (Fungos endofíticos de raízes de ambiente natural); Mix 18 (Fungos endofíticos de caule de ambiente natural); Mix 19 (Fungos endofíticos de folha de ambiente natural); Mix 20 (Fungos endofíticos de folha de ambiente cultivado); Mix 21 (Fungos de solo de ambiente cultivado); Mix 22 (Fungos de solo de ambiente cultivado); Mix 23 (Fungos endofíticos de raízes de ambiente cultivado); Mix 24 (Fungos endofíticos de caule de ambiente cultivado); CONTROLE (Plantas não tratadas com microrganismos). Cruz das Almas, Bahia, Fevereiro de 2021.

Aclimatização

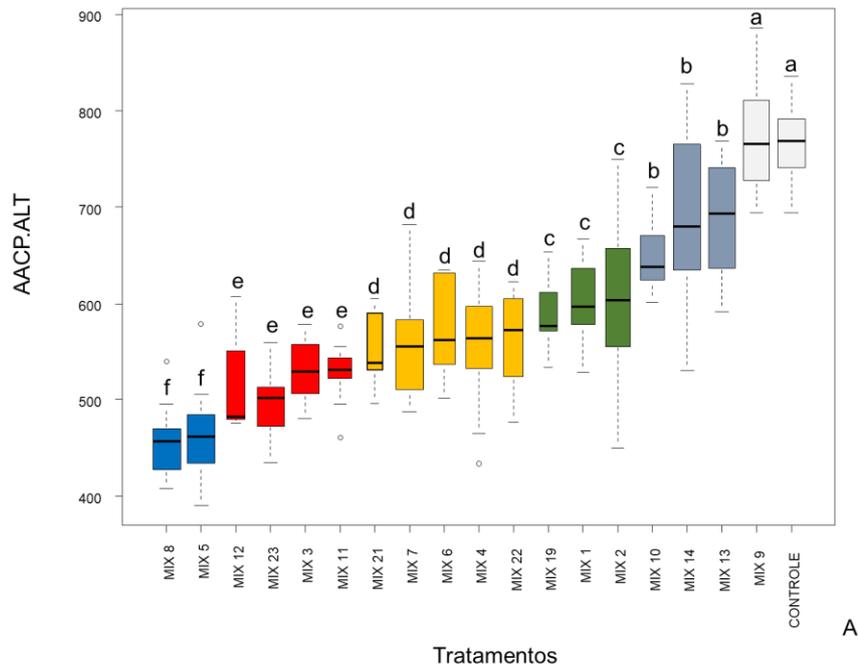
Foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos quanto ao crescimento das plantas decorrentes da microbiolização com microrganismos associados ao gênero *Ananas*.

A partir dos dados obtidos com o experimento realizado, calculou-se a área abaixo da curva de crescimento (AACP) refletindo o comportamento das plantas cv. 'BRS Imperial' para os diferentes tratamentos em função dos períodos de avaliação, os quais foram agrupados estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% (Figura 4. A-C).

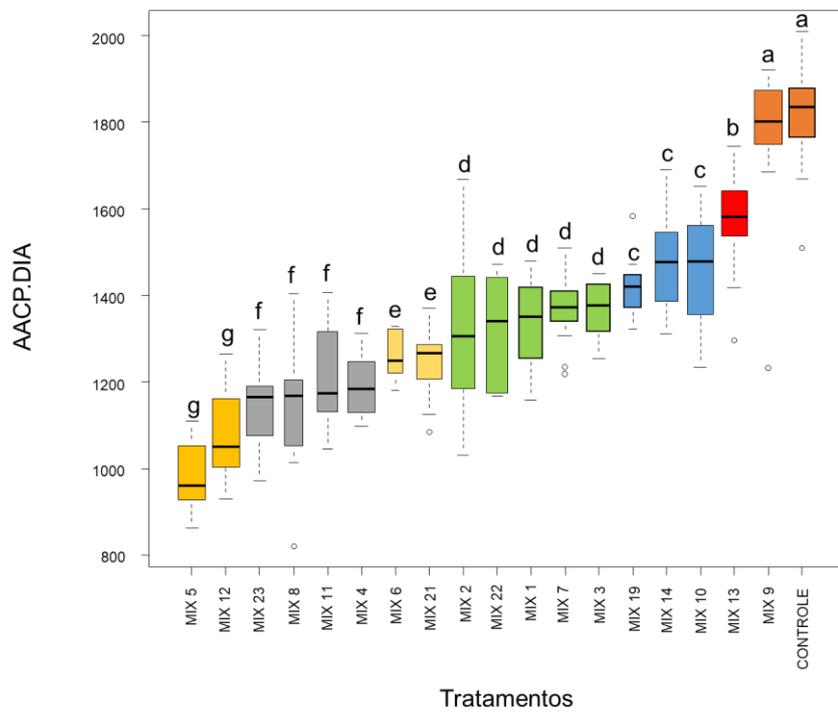
Para a variável altura da planta (Figura 4. A) o tratamento Controle, com plantas não microbiolizadas, e o Mix 9 (bactérias de solo de ambiente cultivado) promoveram os melhores resultados, ambos com desempenho semelhante, seguidos dos tratamentos com bactérias endofíticas de caule e folha (Mix 13 e Mix 14) e Mix 10, todos oriundos de ambiente cultivado. Resultado similar foi obtido tanto para a variável diâmetro da copa (Figura 4. B), quanto para o número de folhas (Figura 4. C) com Mix 9 e o controle sem diferenças estatísticas e com desempenho superior aos demais tratamentos.

Os menores valores de crescimento para essas variáveis foram observados, principalmente, com os tratamentos a partir de microrganismos endofíticos de raízes, como o Mix 5, Mix 12 e Mix 23, independente de se originar

de ambiente natural ou cultivado. Esses tratamentos atuaram quase como inibidores de crescimento das plantas.



A



B

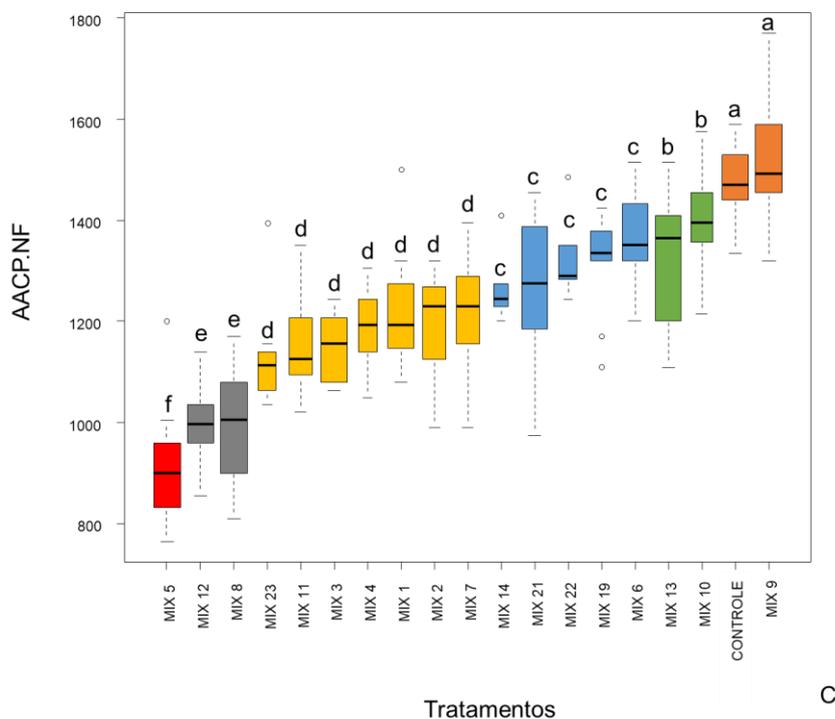


Figura 4. (A-C) Boxplot representativo das variáveis: A – AACP.ALT; B - AACP.DIA e C - AACP.NF e dos 19 tratamentos: Mix 1 (Bactérias totais de solo de ambiente natural); Mix 2 (Bactérias de solo de ambiente natural); Mix 3 (Bactérias de solo de ambiente natural); Mix 4 (Bactérias de solo de ambiente natural); Mix 5 (Bactérias endofíticas de raízes de ambiente natural); Mix 6 (Bactérias endofíticas de caule de ambiente natural); Mix 7 (Bactérias endofíticas de folha de ambiente natural); Mix 8 (Bactérias de solo de ambiente cultivado); Mix 9 (Bactérias de solo de ambiente cultivado); Mix 10 (Bactérias de solo de ambiente cultivado); Mix 11 (Bactérias de solo de ambiente cultivado); Mix 12 (Bactérias endofíticas de raízes de ambiente cultivado); Mix 13 (Bactérias endofíticas de caule de ambiente cultivado); Mix 14 (Bactérias endofíticas de folha de ambiente cultivado); Mix 19 (Fungos endofíticos de folha de ambiente natural); Mix 21 (Fungos de solo de ambiente cultivado); Mix 22 (Fungos de solo de ambiente cultivado); Mix 23 (Fungos endofíticos de raízes de ambiente cultivado); CONTROLE (Plantas não tratadas com microrganismos). Cruz das Almas, Bahia, Fevereiro de 2021.

A avaliação destrutiva realizada aos 150 dias de cultivo permitiu a quantificação da biomassa obtida a partir de cada tratamento (Tabela 2 e Figura 5), assim como de outras duas variáveis relacionadas à raiz.

Tabela 2. Valores médios obtidos de abacaxizeiros ‘BRS Imperial’ aos 150 dias de aclimatização. Cruz das Almas, Bahia, Fevereiro de 2021.

Trat.	Variáveis					
	Massa fresca das raízes (g)	Massa seca das raízes (g)	Comprimento da raiz principal(cm)	Número de raízes	Massa fresca das folhas (g)	Massa seca das folhas (g)
CONT.	1,92 b	0,49 b	22,66 b	21,66 a	30,78 a	3,40 a
Mix 2	3,14 a	0,79 a	31,82 a	23,00 a	31,82 a	3,46 a
Mix 9	2,91 a	0,62 b	24,90 b	25,33 a	31,33 a	3,66 a
Mix 13	2,12 b	0,42 c	30,01 a	21,66 a	30,01 a	3,05 a
Mix 6	0,92 c	0,19 c	18,33 c	18,33 b	20,82 b	1,92 b
Mix 8	1,42 c	0,37 c	29,73 a	15,00 c	9,82 c	1,03 c
Mix 1	0,58 c	0,17 c	13,90 c	16,33 b	18,38 b	1,77 b
Mix 3	1,06 c	0,20 c	15,66 c	20,00 a	21,51 b	1,99 b
Mix 10	1,67 b	0,34 c	23,42 b	20,33 a	23,42 b	2,36 b
Mix 11	1,39 c	0,39 c	28,50 a	17,00 b	10,17 c	1,12 c
Mix 4	1,83 b	0,34 c	23,26 b	20,33 a	23,26 b	2,26 b
Mix 5	1,07 c	0,27 c	8,30 d	13,33 c	8,30 c	0,85 c
Mix 12	1,20 c	0,31 c	31,80 a	13,00 c	10,28 c	1,01 c
Mix 7	0,79 c	0,21 c	15,50 c	17,33 b	22,25 b	2,12 b
Mix 14	1,93 b	0,35 c	25,17 b	19,66 a	25,17 b	2,62 a
Mix 19	1,06 c	0,28 c	19,84 c	18,00 b	19,84 b	1,95 b
Mix 23	1,95 b	0,32 c	20,43 c	18,66 b	20,94 b	2,09 b
Mix 21	1,55 c	0,35 c	24,86 b	19,66 a	24,86 b	2,77 a
Mix 22	1,87 b	0,41 c	24,50 b	21,00 a	28,29 a	2,94 a
CV%	33,31	33,06	18,31	13,76	18,34	22,11

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. (Abreviação: Trat. – Tratamento).

Para o comprimento das raízes, os tratamentos que promoveram os melhores resultados foram: Mix 2 (bactérias de solo de ambiente natural), Mix 13 (bactérias endofíticas de caule de ambiente cultivado), Mix 8 (bactérias de solo de plantas de ambiente cultivado), Mix 11 (bactérias de solo de ambiente cultivado) e Mix 12 (bactérias endofíticas de raiz de ambiente cultivado). Em contrapartida, para essa mesma variável vários tratamentos parecem ter afetado o comprimento da raiz principal.

O número de raízes foi beneficiado por vários tratamentos, com as maiores médias observadas para os grupos Mix 2 (bactérias de solo de ambiente natural), Mix 9 (bactérias de solo de ambiente cultivado), Mix 13 (Bactérias endofíticas de caule de ambiente cultivado), Mix 3 (bactérias de solo de ambiente natural), Mix 10 (bactérias de solo de ambiente cultivado), Mix 4 (bactérias de solo de ambiente natural), Mix 14 (bactérias endofíticas de folhas de ambiente cultivado), juntamente com Mix 21 (Fungos de solo de ambiente cultivado), Mix 22 (fungos de solo de ambiente cultivado), incluindo o controle.

Para massa fresca e seca das folhas o Mix 2 (bactérias de solo de ambiente natural), Mix 9 (bactérias de solo de ambiente cultivado) Mix 13 (bactérias endofíticas de caule de ambiente cultivado) e Mix 22 (fungos de solo de ambiente cultivado) promoveram os melhores resultados e não diferiram significativamente do controle. Para a massa seca das folhas, além desses tratamentos, o Mix 13 (bactérias endofíticas de caule de ambiente cultivado) e Mix 21 (fungos de solo de ambiente cultivado) também promoveram ganho de massa.

De forma geral, para todas as variáveis, o Mix 2 (bactérias de solo de ambiente natural) e Mix 9 (bactérias solo de ambiente cultivado) se destacaram com os maiores valores obtidos.

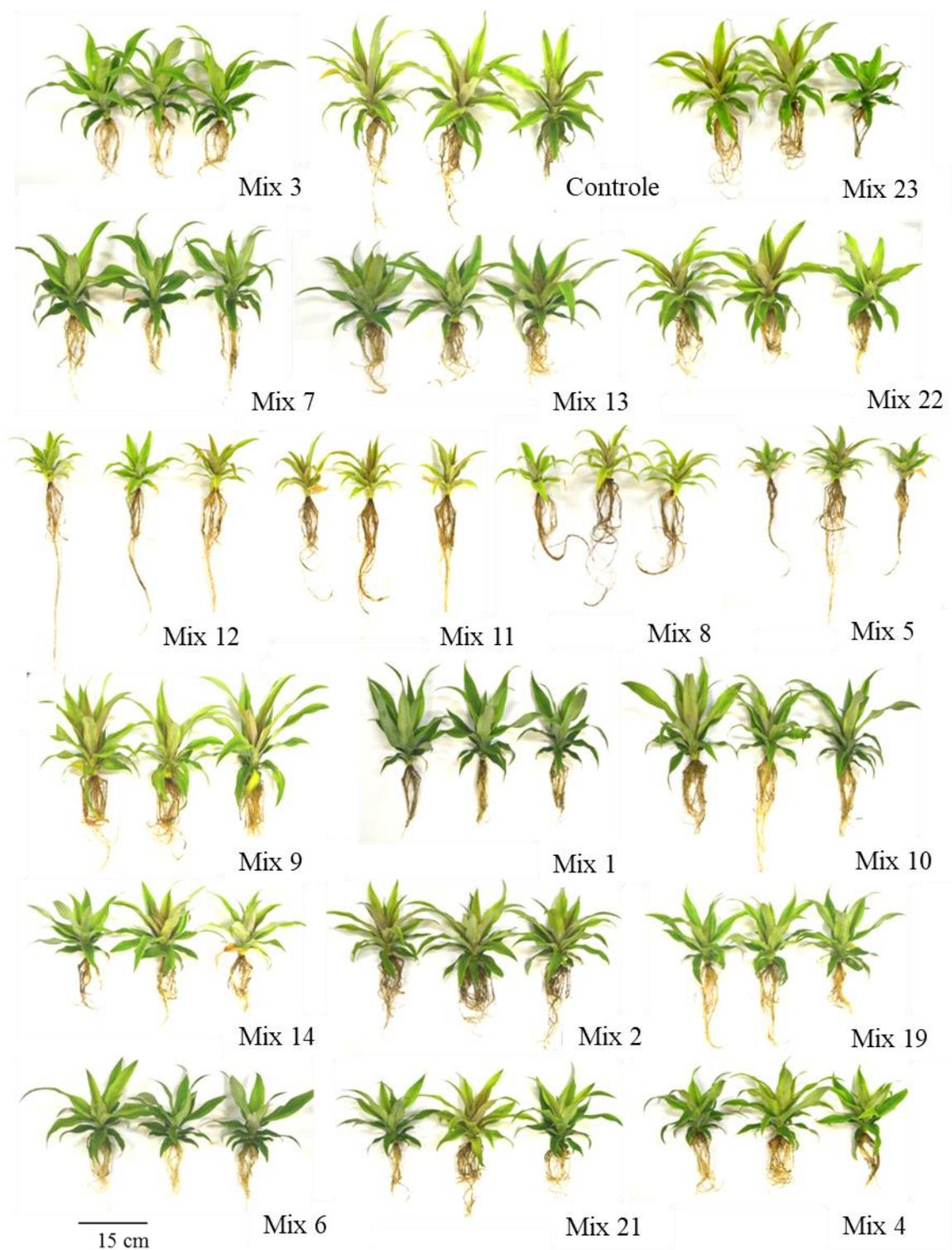


Figura 5. Abacaxizeiros cv. 'BRS Imperial' microbiolizados com microrganismos associados ao gênero *Ananas*.

A correlação entre as variáveis analisadas das plantas aclimatizadas, após 150 dias, encontra-se na Figura 6.

O conhecimento acerca dos coeficientes de correlação entre as variáveis é de grande importância e permite entender como a variação de uma afeta a outra. Nesse estudo foram identificadas correlações altamente significativas e positivas entre a massa fresca das raízes (MFR) com a massa seca de raízes (MSR), o número de raízes (NR) e a massa seca de folhas, mas também, em menor grau, com o comprimento da raiz principal (CR) e a massa fresca das folhas (MFF).

As variáveis massa fresca e seca das folhas (MFF e MSF) apresentaram forte correlação entre si, assim como com a altura da planta (ALT), diâmetro da copa (DIA) e número de folhas (NF).

Baixas correlações foram identificadas entre as variáveis relacionadas com o sistema radicular (MFR, MSR e CR) e as variáveis altura de planta (ALT), diâmetro da copa e número de folhas (NF). O comprimento da raiz principal (CR) não tem correlação com nenhuma das variáveis, com exceção da massa seca da raiz (MSR). Não foi identificada nenhuma correlação negativa entre as variáveis de crescimento avaliadas.

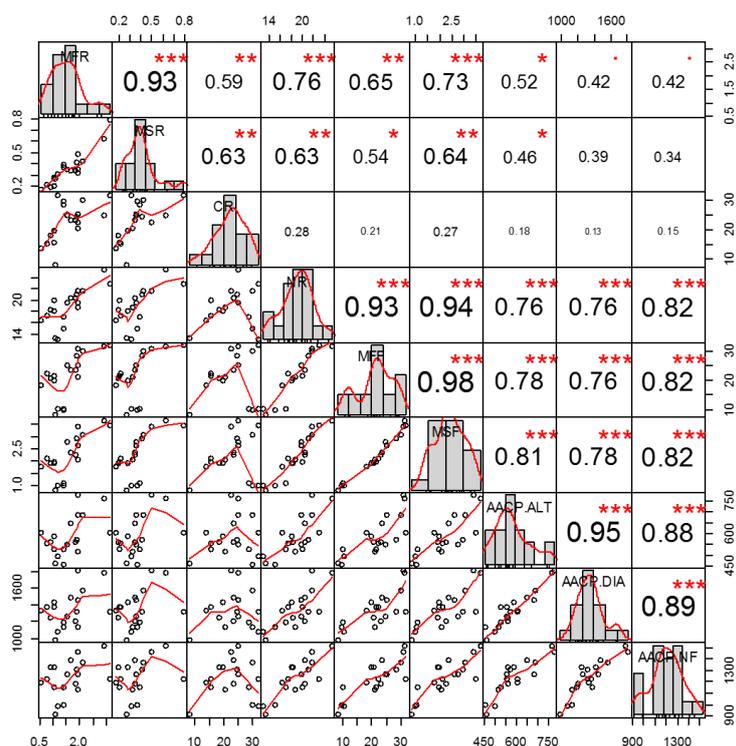


Figura 6. Correlação entre as variáveis analisadas das plantas aclimatizadas (AACP.ALT - altura da planta; AACP.DIA - diâmetro da copa; AACP.NF - número de folhas) e após 150 dias de aclimatização (MFR - massa fresca das raízes; MSR – massa seca das raízes; CR – comprimento da raiz principal; NR – número de raízes; MFF – massa fresca das folhas; MSF – massa seca das folhas). Cruz das Almas, Bahia, Fevereiro de 2021.

O *heatmap* indicou a formação de quatro grupos (Figura 7) com base nos resultados obtidos para as diferentes variáveis analisadas. No G1 encontram-se o Mix 2 e Mix 9, formados por bactérias de solo de ambiente natural e de cultivo, bem como estão presentes Mix 13 (bactérias endofíticas de caule de ambiente cultivado) e o controle. O G2 foi constituído predominantemente por microrganismos oriundos de ambientes de cultivo (Mix 14 (bactérias endofíticas de folhas de ambiente cultivado), Mix 10 (bactérias de solo de ambiente cultivado), Mix 22 (fungos de solo de ambiente cultivado), Mix 21 (fungos de solo de ambiente cultivado) e Mix 23 (fungos endofíticos de raízes de ambiente cultivado)), tanto

bactérias como fungos, com exceção de Mix 4 (bactérias de solo de ambiente natural), o qual é proveniente de ambiente natural.

No G3 agruparam-se os tratamentos cuja origem dos microrganismos se deu a partir de amostras provenientes de áreas de ocorrência natural, Mix 3 (bactérias de solo de ambiente natural), Mix 19 (fungos endofíticos de folhas de ambiente natural), Mix 6 (bactérias endofíticas de caule de ambiente natural), Mix 7 (bactérias endofíticas de folhas de ambiente natural) e Mix 1 (bactérias de solo de ambiente natural). O G4 foi constituído por bactérias oriundas do solo dos ambientes de cultivo e também por endofíticos de raízes dos ambientes de ocorrência natural e de cultivo (Mix 5 (bactérias endofíticas de raízes de ambiente natural), Mix 11 (bactérias de solo de ambiente cultivado), Mix 8 (bactérias de solo de ambiente cultivado) e Mix 12 (bactérias endofíticas de raízes de ambiente cultivado).

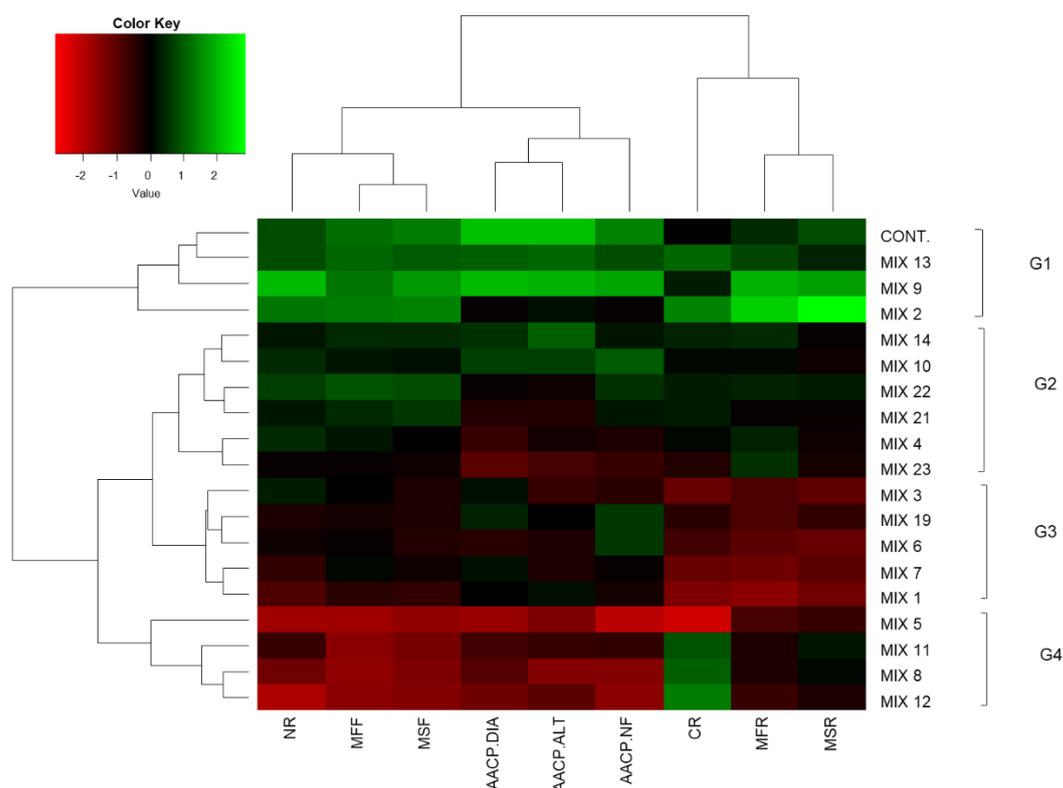


Figura 7. Heatmap gerado a partir de 19 tratamentos Mix 1 (Bactérias totais de solo de ambiente natural); Mix 2 (Bactérias de solo de ambiente natural); Mix 3 (Bactérias de solo de ambiente natural); Mix 4 (Bactérias de solo de ambiente

natural); Mix 5 (Bactérias endofíticas de raízes de ambiente natural); Mix 6 (Bactérias endofíticas de caule de ambiente natural); Mix 7 (Bactérias endofíticas de folha de ambiente natural); Mix 8 (Bactérias de solo de ambiente cultivado); Mix 9 (Bactérias de solo de ambiente cultivado); Mix 10 (Bactérias de solo de ambiente cultivado); Mix 11 (Bactérias de solo de ambiente cultivado); Mix 12 (Bactérias endofíticas de raízes de ambiente cultivado); Mix 13 (Bactérias endofíticas de caule de ambiente cultivado); Mix 14 (Bactérias endofíticas de folha de ambiente cultivado); Mix 19 (Fungos endofíticos de folha de ambiente natural); Mix 21 (Fungos de solo de ambiente cultivado); Mix 22 (Fungos de solo de ambiente cultivado); Mix 23 (Fungos endofíticos de raízes de ambiente cultivado); CONTROLE (Plantas não tratadas com microrganismos) e nove variáveis (AACP.ALT - altura da planta, AACP.DIA - diâmetro da copa, AACP.NF - número de folhas, MFR - massa fresca das raízes, MSR – massa seca das raízes, CR – comprimento da raiz principal, NR – número de raízes, MFF – massa fresca das folhas, MSF – massa seca das folhas). Cruz das Almas, Bahia, fevereiro de 2021.

Com base nos resultados obtidos pela análise dos componentes principais, os dois primeiros componentes foram responsáveis por 87,56% da variação total, em que o componente principal 1 foi responsável por 69,06% e o componente principal 2, por 18,50% das variações dos dados (Figura 8).

As variáveis MSR e MFR apresentaram contribuições semelhantes para o PCA 1, e isto pode ser verificado pelos vetores de maior comprimento e que foram mais próximos ao eixo deste componente, conforme mostrado na Figura 8.

Existem correlações altas entre as variáveis MSR e MFR, pois formaram ângulos agudos entre si, também as variáveis MSF e MFF, e entre as variáveis AACP.ALT, AACP.NF e AACP.DIA. Não existe correlação entre as variáveis CR e AACP.DIA e AACP.NF.

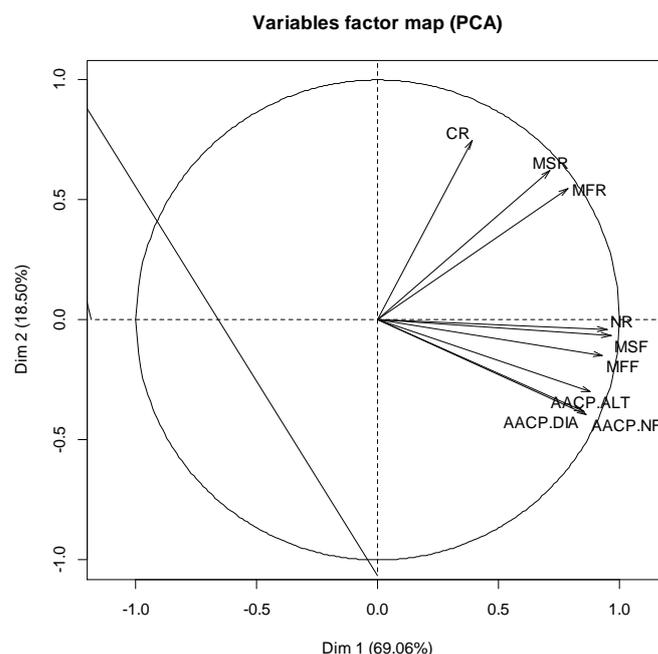


Figura 8. Gráfico do componente principal 1 × componente principal 2 sobre as variáveis CR (comprimento de raiz principal), MSR (massa seca das raízes), MFR (massa fresca das raízes), NR (número de raízes), MSF (massa seca das folhas), MFF (massa fresca das folhas), AACP.ALT (altura da planta), AACP.NF (número de folhas), AACP.DIA (diâmetro da copa) pela PCA. Cruz das Almas, Bahia, Fevereiro de 2021.

Densidade estomática

As diferenças encontradas quanto a densidade estomática nesse trabalho apareceu na formação de três grupos com diferenças estatísticas entre si (Figura 9). Os estômatos dos abacaxizeiros cv. 'BRS Imperial' estão distribuídos na face abaxial, sendo suas folhas hipoestomáticas (BARBOZA et al., 2006). A densidade estomática encontrada variou para cada tratamento, apesar de todos estarem submetidos às mesmas condições de fornecimento de luz, água e umidade. Esta foi superior nos tratamentos Mix 21, Mix 5, Mix 2, CONTROLE, Mix 8, Mix 9, Mix 23, Mix 19, Mix 13, Mix 6 e Mix 10.

Em contrapartida os menores valores encontrados para a densidade estomática foram para os tratamentos Mix 12, Mix 3, Mix 4, Mix 22, Mix 1 e Mix 14, sobretudo o tratamento Mix 11. As folhas das plantas apresentaram número de estômatos que variaram de 73,87 mm² para Mix 11, valor esse estatisticamente inferior aos observados para os demais tratamentos, sendo o maior número observado para Mix 10, 119, 13 mm².

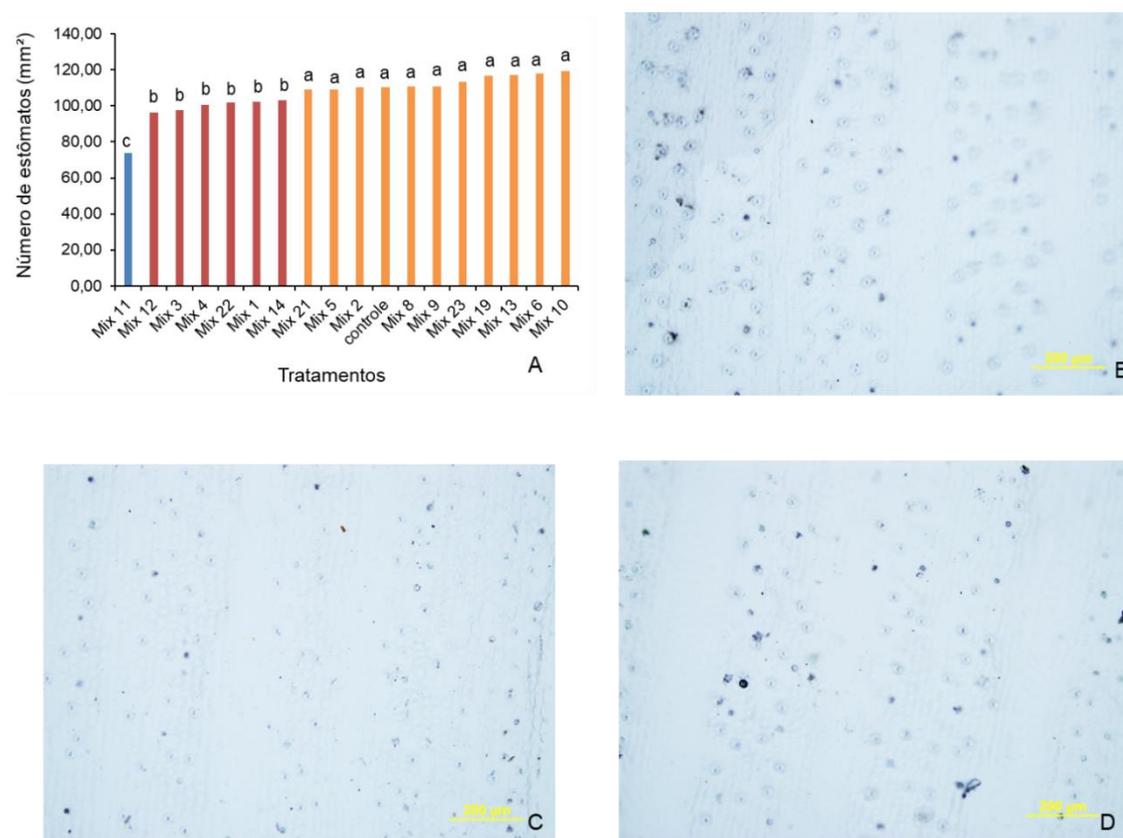


Figura 9. Densidade estomática de abacaxizeiros aclimatizados cv. ‘BRS Imperial’ microbiolizados com microrganismos associados ao gênero *Ananas*. A. Média da contagem de estômatos presentes nas folhas de abacaxizeiros; B. Estômatos em folhas de abacaxizeiros microbiolizados com Mix 10; B. Estômatos em folhas de abacaxizeiros microbiolizados com Mix 3 C. Estômatos em folhas de abacaxizeiros microbiolizados com Mix 11. Cruz das Almas, Bahia, Fevereiro de 2021.

Índice de Mulamba & Mock (1978)

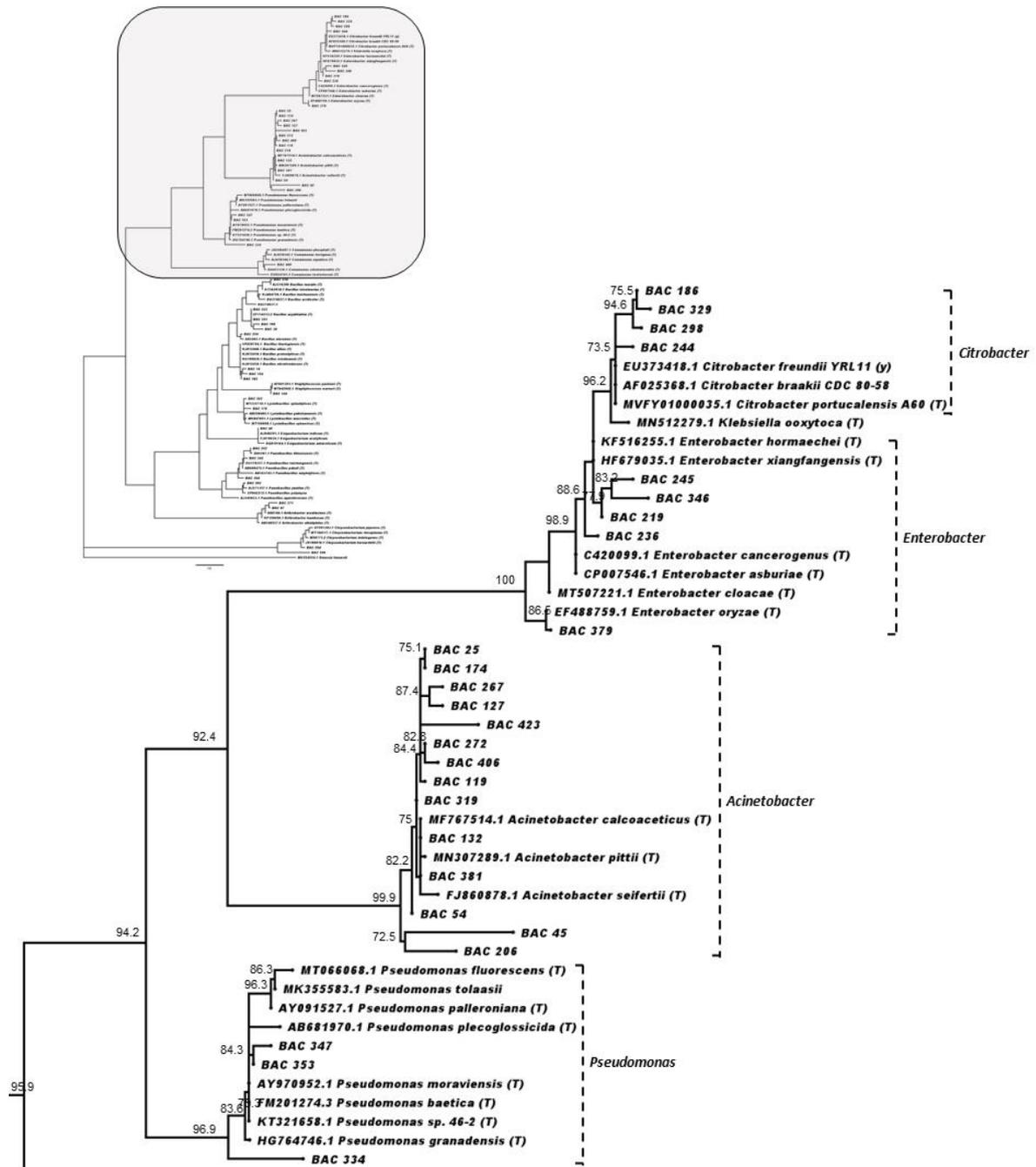
Com base nas avaliações realizadas nos diferentes períodos com os tratamentos, os dados foram analisados a partir do índice de Mulamba & Mock (1978), que se baseiam na soma dos “ranks” para classificar e hierarquizar os tratamentos, resultando em um valor geral, que para o caso em questão estimou os tratamentos com os melhores resultados nas diferentes etapas (*In vitro*, Aclimatização, Canteiro e Campo) (Tabela 3). Com esse resultado foram selecionados os tratamentos que tiveram os isolados submetidos ao sequenciamento a fim de conhecer a identificação genética dos mesmos. A partir desse índice foram selecionados 8 tratamentos, sendo eles: Mix 1, 2, 3, 4, 8, 9, 11 e 13.

Tabela 3. Ranking dos tratamentos em diferentes fases de avaliação com base nos índices de Mulamba & Mock (1978). Cruz das Almas, Bahia, Fevereiro de 2021.

Tratamentos	InVitro	Aclimatização	Canteiro	Campo	SumRk
MIX 9	1	1	4	7	13
MIX 13	14	3	1	2	20
CONTROLE	6	2	3	10	21
MIX 3	5	12	7	2	26
MIX 4	11	8	2	5	26
MIX 21	15	6	5	3	29
MIX 1	8	15	6	1	30
MIX 22	10	4	5	11	30
MIX 14	13	5	5	9	32
MIX 2	4	3	12	13	32
MIX 7	9	11	9	4	33
MIX 10	18	7	7	6	38
MIX 11	3	13	8	15	39
MIX 19	12	13	10	8	43
MIX 8	2	14	14	14	44
MIX 6	17	9	13	12	51
MIX 23	19	10	11	11	51
MIX12	7	16	16	16	55
MIX 5	16	17	15	16	64

Análise filogenética

A árvore filogenética mostrando as relações entre os isolados bacterianos e as espécies de referência relacionadas são representados na Figura 10. A análise revelou as cepas filogeneticamente relacionadas aos isolados bacterianos associados ao microbioma de *Ananas*. As 110 sequências foram relacionadas a 12 gêneros diferentes. A análise evidenciou a natureza heterogênea da composição de cada mix, com a presença de isolados filogeneticamente relacionados a diferentes gêneros de importância agrícola. A seguir, se encontra a composição de cada mix com a identificação do isolado e o gênero relacionado: Mix 1 (BAC 334 *Pseudomonas*, BAC 408 *Comamonas* spp., BAC 182 *Bacillus* spp., BAC 144 *Staphylococcus*); Mix 2 (BAC 329 *Citrobacter*, BAC 127 *Acinetobacter*, BAC 132 *Acinetobacter*, BAC 45 *Acinetobacter*, BAC 202 *Paenibacillus*, BAC 371 *Arthrobacter*, BAC 353 *Pseudomonas*, BAC 351 *Bacillus* spp., BAC 196 *Bacillus* spp.); Mix 3 (BAC 347 *Pseudomonas*, BAC 178 *Lysinibacillus*, BAC 346 *Enterobacter*, BAC 174 *Acinetobacter*, BAC 423 *Acinetobacter*, BAC 119 *Acinetobacter*, BAC 319 *Acinetobacter*); Mix 4 (BAC 154 *Bacillus* spp., BAC 362 *Lysinibacillus*, BAC 342 *Paenibacillus*, BAC 364 *Paenibacillus*, BAC 186 *Citrobacter*); Mix 8 (BAC 245 *Enterobacter*, BAC 379 *Enterobacter*, BAC 206 *Acinetobacter*, BAC 14 *Bacillus* spp.); Mix 9 (BAC 40 *Exiguobacterium*, BAC 47 *Arthrobacter*, BAC 223 *Bacillus* spp., BAC 38 *Bacillus* spp., BAC 226 *Enterobacter*, BAC 54 *Acinetobacter*) Mix 11 (BAC 216 *Bacillus* spp., BAC 254 *Bacillus* spp., BAC 252 *Paenibacillus*, BAC 294 *Chryseobacterium*, BAC 296 *Chryseobacterium*); Mix 13 (BAC 298 *Citrobacter*, BAC 219 *Enterobacter*, BAC 25 *Acinetobacter*, BAC 267 *Acinetobacter*, BAC 272 *Acinetobacter*, BAC 406 *Acinetobacter*, BAC 381 *Acinetobacter*).



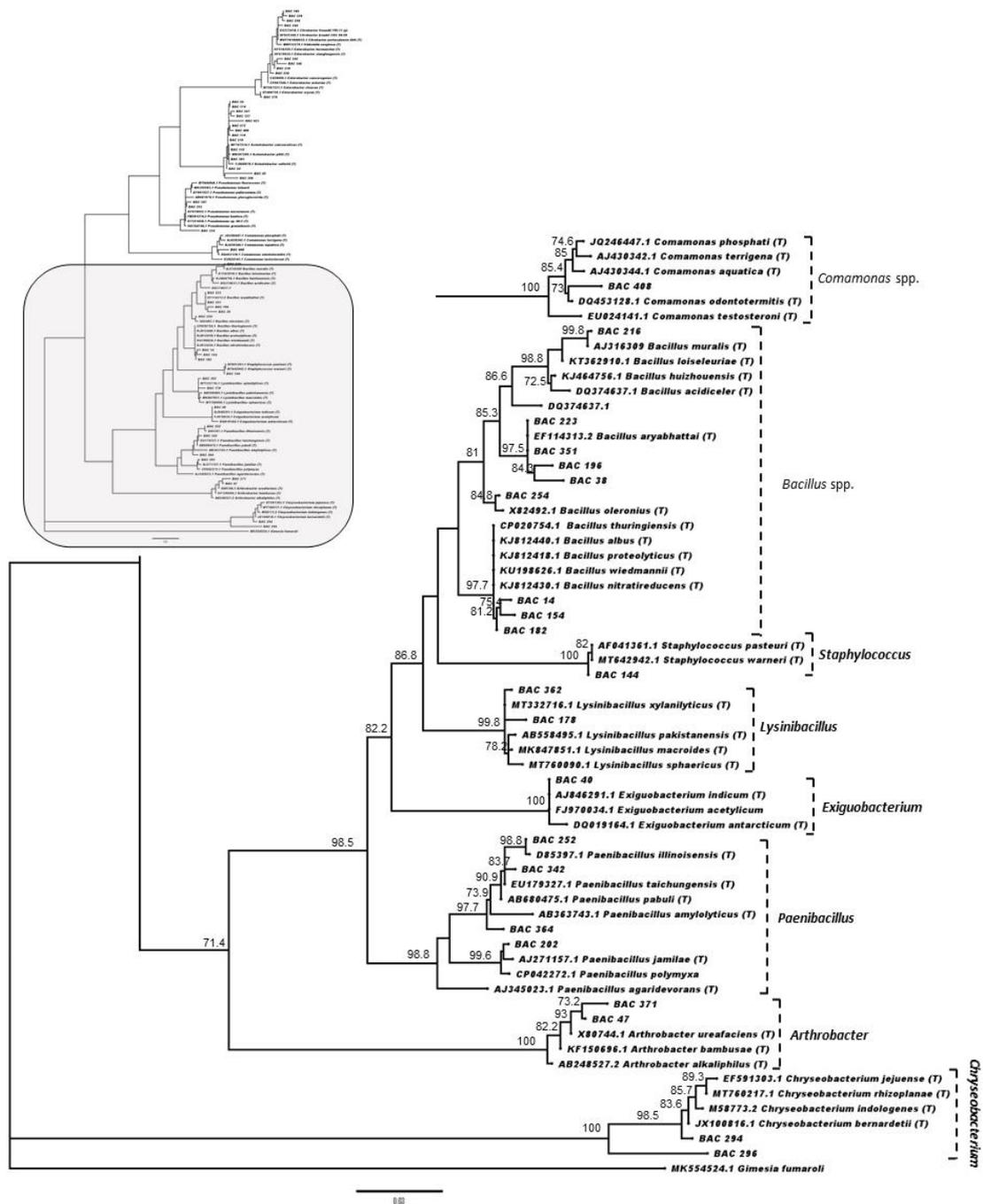


Figura 10. Árvore filogenética mostrando a relação das cepas utilizadas neste trabalho com as espécies-tipo do banco de dados Genbank. Valores de bootstrap acima de 70% são mostrados. A árvore foi gerada com sequências de rDNA 16S disponíveis no site LPSN (Lista de nomes procarióticos com posição na

nomenclatura - www.bacterio.net) e no NCBI. A análise filogenética molecular foi construída usando o método de Probabilidade de Maximun. Esta análise envolveu 110 sequências de nucleotídeos. A árvore foi inferida com 840 sites alinhados. O modelo de substituição de nucleotídeos usado foi TVMe + R3. As análises de bootstrap foram realizadas com 1.000 repetições. A árvore foi enraizada com a sequência 16S rDNA de *Gimesia fumaroli* (Planctomycetes Phylum). A barra de escala representa o número de substituições esperadas por site. As análises foram conduzidas no IQ-TREE 2 (MINH et al., 2020) e a árvore foi editada usando o programa FigTree v1.4.4 (RAMBAUT, 2012).

DISCUSSÃO

Efeitos da microbiolização na promoção de crescimento das plantas *in vitro* e desempenho na fase de aclimatização de mudas

Na fase de cultivo *in vitro*, as mudas de abacaxizeiros 'BRS Imperial' responderam diferentemente à microbiolização realizada com bactérias e fungos dos ambientes natural e de cultivo. Para a maioria das variáveis analisadas os tratamentos que mais se destacaram foram os de bactérias de ambiente cultivado principalmente, com os mixes 8 e 9. Foi observado que a maioria dos mixes compostos de fungos tanto os de solo, como endofíticos estavam relacionadas às maiores taxas de mortalidade, o que foi perceptível por meio da porcentagem de sobrevivência. Logo, algumas plantas não resistiram à colonização por fungos e morreram. Dentre esses tratamentos, as plantas microbiolizadas com os mixes 15, 16, 17, 18 e 24 não chegaram à etapa posterior de aclimatização. O contrário, no entanto, foi observado para os tratamentos compostos por bactérias.

A introdução de microrganismos associados ao gênero *Ananas* em plantas provenientes do cultivo *in vitro* lhes proporcionou a oportunidade de desenvolverem populações estáveis capazes de colonizar desde o ambiente rizosférico até a endosfera, e foi pressuposto que esses efeitos poderiam de certa forma persistir, assim como foi considerado que a exposição das plantas às

populações de microrganismos poderia prepará-las para as fases posteriores da aclimatização, com uma parte aérea sadia e vigorosa e com sistema radicular forte. Plantas com essas características foram obtidas nesse estudo, como também foi observado que alguns grupos de microrganismos apesar de não terem proporcionado crescimento da parte aérea suficiente, foram capazes de estimular o crescimento das raízes, que são fundamentais para a nutrição das plantas.

Os efeitos da microbiolização *in vitro* com microrganismos foram sentidos também em fase posterior à aplicação dos mesmos, como na aclimatização, com ênfase ao Mix 9 que se destacou nas duas fases. De acordo a análise filogenética a esse grupo pertencem bactérias dos gêneros *Exiguobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus* spp., *Enterobacter* e *Acinetobacter*.

Durante a fase de aclimatização foi observado desempenho diferenciado das plantas em relação aos diferentes tratamentos, o que pode estar relacionado, além da especificidade dos microrganismos envolvidos, a outros fatores. Importante destacar, principalmente, o estresse pelo qual essas plantas passam ao saírem do cultivo *in vitro* para a casa de vegetação, além de uma condição morfológica ainda alterada pela fase heterotrófica que a planta está submetida nas condições de laboratório. Um dos fatores que podem ser considerados aqui é a ausência de raízes ou, raízes muito pouco funcionais das plantas recém aclimatizadas, o que pode explicar o baixo desempenho dos tratamentos como Mix 5 (bactérias endofíticas de raízes de ambiente natural), Mix 12 (bactérias endofíticas de raízes de ambiente cultivado) e Mix 23 (fungos endofíticos de raízes de ambiente cultivado).

As plantas que mais se destacaram nesse trabalho foram as microbiolizadas com o Mix 9 (bactérias de solo de ambiente cultivado) para as variáveis relacionadas à altura de planta, número de folhas e diâmetro da copa assim como, para quase todas as variáveis destrutivas e o Mix 2 (bactérias de solo de ambiente natural) para todas as variáveis destrutivas relacionadas à biomassa de parte aérea e raiz, incluindo CR e NR. Os gêneros presentes nesses mixes, conforme mostrado na Figura 10 são grupos de bactérias que vem sendo estudadas para a promoção direta do crescimento das plantas, bem como suas habilidades para controlar/suprimir doenças de plantas.

Os mecanismos pelos quais as bactérias podem influenciarno crescimento da planta irão diferir entre espécies e cepas. Não existe apenas um mecanismo para promoção do crescimento vegetal, e sim uma combinação de vários mecanismos diretos e indiretos. Esses mecanismos podem estar atuando na mobilização e transporte de nutrientes para a planta pela fixação de nitrogênio e solubilização/ mineralização de fósforo, aumento da área de absorção das raízes, produção de reguladores de crescimento vegetal e de compostos orgânicos voláteis que estimulam o desenvolvimento vegetal e proteção das plantas contra patógenos (SPENCE; BAIS, 2015).

Estudos têm sido conduzidos em relação às habilidades de várias bactérias para promover o crescimento das plantas, dentre elas, as bactérias endofíticas (SOUZA et al., 2015). Neste trabalho, as bactérias endofíticas, principalmente as de ambiente cultivado (Mix 13) parecem ter atuado como promotoras de crescimento promovendo ganho de biomassa de folhas e podem ter relação com a densidade de estômatos registrada para esse tratamento.

Alguns autores relatam em seus estudos com abacaxizeiros que a aplicação de biofertilizantes contendo bactérias promotoras do crescimento de plantas podem acelerar o crescimento das mesmas durante a aclimatização (WEBER et al., 2003a, WEBER et al., 2003b; BALDOTTO et al., 2010a; BALDOTTO et al., 2010b), bem como a utilização de outras estratégias como a utilização de reguladores de crescimento (CATUNDA et al., 2008) e aplicação de ácidos húmicos (BALDOTTO et al., 2009) podem melhorar a performance das plantas durante esse período (MOREIRA et al., 2006; BERILLI et al., 2011; ARAGÓN et al., 2012; KUNZE et al., 2014).

Gêneros variados de microrganismos promovem o crescimento das plantas sob condições normais e de estresse, como por exemplo: *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Variovorax*, *Klebsiella*, *Burkholderia*, *Azospirillum*, *Serratia* e *Azotobacter* (KUMAR et al., 2018). Mello et al. (2002) avaliaram a eficiência de 19 isolados bacterianos na promoção de crescimento de mudas micropropagadas de abacaxi cv. Pérola utilizando diferentes métodos de bacterização. Neste trabalho foi demonstrado que a mistura de alguns isolados, aplicados via imersão

do sistema radicular, promoveram o aumento da biomassa de mudas de abacaxizeiro micropropagados, reduzindo a fase de aclimatização.

No presente trabalho os isolados bacterianos associados ao gênero *Ananas* foram relacionados filogeneticamente com diferentes gêneros de importância agrícola. Esses são relatados frequentemente associados a múltiplos benefícios nas plantas. A maioria dos isolados foram filogeneticamente relacionados ao gênero *Acinetobacter*. Em experimento de co-inoculação de *Acinetobacter junii* e fungos micorrízicos foi relatado aumento de duas vezes em termos de biomassa em *Solanum lycopersicum* e *Capsicum annuum*. Este aumento pode ser devido à maior absorção de P do solo e seu acúmulo para os brotos, resultando em biomassa vegetal aprimorada. Além disso, *Acinetobacter junii* demonstrou maior solubilização de fosfato e outras características de promoção de crescimento como produção de amônia, produção de IAA, GA e produção de HCN (PADMAVATHI et al., 2015). Em nosso trabalho também foram encontrados resultados promissores em plantas tratadas com os Mixes 2, 9 e 13 que continham bactérias do gênero *Acinetobacter* na composição.

Um número representativo de sequências foi relacionado ao gênero *Bacillus* spp.. Em estudos com mudas de trigo, Selvakumaret al. (2008) relataram a capacidade de cepas de *Bacillus* e *Enterobacter* na produção de ácido indol acético e outros atributos como promoção de crescimento e influência positiva em parâmetros de absorção de nutrientes.

No presente trabalho ocorreram também sequências relacionadas filogeneticamente a *Citrobacter*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Chryseobacterium*, *Lysinibacillus*, *Exiguobacterium*, *Comamonas* spp. e *Staphylococcus*, porém em menor proporção. Esses grupos foram relatados em diferentes trabalhos relacionados a múltiplas funções e benefícios para as plantas. O gênero *Paenibacillus* sp. foi relatado como o mais citado globalmente no segmento de promoção de crescimento vegetal, ciclagem de nutrientes, produção de exopolissacarídeos, e metabólitos bioativos para controle biológico e propósitos industriais (DAUD et al., 2019). Cepas de *Arthrobacter* TF1 e TF7 e *Bacillus megaterium* TF2 e TF3, isolados de *Tamarix chinensis*, *Suaeda salsa* e *Zoysia sinica* foram capazes de hidrolisar caseína e solubilizar fosfato, e

apresentaram pelo menos um gene relacionado à promoção de crescimento vegetal, indicando seu potencial na promoção do crescimento de plantas (FAN et al., 2016).

Domenech et al. (2006) afirmaram que o uso combinado de *Bacillus licheniformis* CECT 5106, *Pseudomonas fluorescens* CECT 5398 e *Chryseobacterium balustinum* CECT 5399 com LS213 tiveram um efeito sinérgico na promoção do crescimento e biocontrole de tomate e pimenta contra murcha de *Fusarium* e *Rhizoctonia*. Verma et al. (2016) isolaram bactérias cultiváveis do filo Bacilli presentes na rizosfera de trigo de zonas agroecológicas na Índia, e com base no sequenciamento do gene 16S rRNA foram identificados 8 grupos de Bacilli e dentre eles os gêneros *Exiguobacterium*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus* e *Staphylococcus*. Essas bactérias apresentam atributos de promoção de crescimento de plantas, que incluem promoção de crescimento direta e indireta. De modo semelhante esses grupos também foram identificados em nosso trabalho associados ao gênero *Ananas*. Até onde sabemos, este é o primeiro relato de estudo dessa natureza com a identificação de microrganismos associados ao solo e endofíticos. Essas bactérias podem posteriormente ser estudadas mais a fundo a fim de serem utilizadas como inoculantes para culturas afins.

No que se refere à promoção do crescimento com exceção do controle, foi notório que os melhores resultados foram obtidos pelo tratamento onde foram empregadas as bactérias provenientes dos tratamentos Mix 9 (bactérias de solo de ambiente cultivado) e Mix 2 (bactérias de solo de ambiente natural), mas também Mix 13 (bactérias endofíticas de ambiente cultivado), como mostra a análise de agrupamento. Esse resultado mostra que apesar de, no ambiente natural ocorrerem menos interferência das ações antrópicas, permitindo maior diversificação dos microrganismos, no ambiente de cultivo, devido às constantes intervenções e práticas agrícolas, existem microrganismos que podem apresentar relações bem estabelecidas com a cultura.

Esse desempenho é um indicativo de que possivelmente os isolados lograram êxito em estabelecer interações com as plantas, favorecendo-as em alguns aspectos. Esses microrganismos são frequentemente relatados na

literatura com atuações e funções de interesses múltiplos para as culturas (PARK et al., 2015), (SOUZA et al., 2016), sendo seu uso refletido no desempenho das mesmas.

E como foi observado aqui, os microrganismos utilizados independentemente da sua origem, influenciaram as plantas em diferentes aspectos, estabelecendo relações com resultados positivos, bem como foram observados desempenhos pouco satisfatórios promovidos por alguns tratamentos, o que pode estar atrelado a certa patogenicidade de alguns isolados ou por reações das plantas a fatores abióticos.

Quanto à densidade estomática, essa pode variar dentro de folhas, plantas e indivíduos de uma única espécie, assim como variar devido a fatores ambientais, como luz, umidade do ar, disponibilidade de água e concentração atmosférica de CO₂ (PARADISO et al., 2017), influenciando na fotossíntese e acúmulo de biomassa vegetal. Essa variação parece existir entre variedades de um mesmo cultivo também. Em um trabalho realizado com abacaxizeiros cv. 'Pérola', Barboza et al. (2006) relataram que aos seis meses em casa de vegetação foram encontrados nas folhas das plantas uma média de 62 estômatos mm², valor esse que difere bastante do encontrado em nosso trabalho aos 5 meses em casa de vegetação para os abacaxizeiros cv. 'BRS Imperial'.

Esses resultados, em relação à densidade estomática, apesar de promissores, deixam evidente que são necessários outros parâmetros que envolvem eficiência fotossintética para se chegar a conclusões mais consistentes (PARADISO et al., 2017).

Foram observados incrementos nas plantas relacionados a variáveis importantes como altura e biomassa da parte aérea e crescimento de raízes, essas variáveis estão diretamente relacionadas à qualidade das mudas. Tais características são decisivas na retirada das mudas da casa de vegetação, o que pode ser determinante para obtenção de mudas mais vigorosas que responderão melhor as etapas seguintes de plantio e colheita.

Finalmente, os resultados obtidos nesse trabalho podem ser considerados promissores e com potencial para ser aplicado *in vitro* e na etapa de aclimatização

de mudas micropropagadas de abacaxizeiro visando promoção de crescimento e afetando diretamente na produção de mudas de forma sustentável.

CONCLUSÕES

- Com a análise dos dados foi mostrado que os microrganismos presentes nos mixes 8 e 9 foram mais eficientes na promoção do crescimento de plantas *in vitro*;

- Plantas de abacaxizeiro micropropagadas tratadas com microrganismos na fase *in vitro* apresentaram efeito de promoção de crescimento também na fase de aclimatização;

- Na aclimatização foi evidenciado que as plantas microbiolizadas com os mixes 2, 9 e 13 apresentaram os melhores resultados para as variáveis analisadas.

- As bactérias associadas ao microbioma de *Ananas* são diversificadas e foram associadas filogeneticamente a gêneros de importância agrícola.

REFERÊNCIAS

ALVES, K. A.; LONDE, L. N.; MELO, E. F.; RODRIGUES, G. B. Multiplicação de abacaxizeiros ornamentais em diferentes concentrações de BAP e períodos de avaliação do desenvolvimento *in vitro*. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 1, p. 188-198, 2014.

ARAGÓN, C.; CARVALHO, L.; GONZÁLEZ, J.; ESCALONA, M.; AMANCIO, S. The physiology of ex vitro pineapple (*Ananas comosus* L. Merr. var MD-2) as CAM or C3 is regulated by the environmental conditions. **Plant Cell Reports**, v. 31, n. 4, p. 757–769, 2012.

BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; CANELLAS, L. P.; BRESSAN-SMITH, R.; OLIVARES, F. L. Growth promotion of pineapple 'Vitória' by humic acids and *Burkholderia* spp. during acclimatization. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 1593-1600, 2010b.

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

BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; OLIVARES, F. L.; VIANA, A. P.; BRESSAN-SMITH, R. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 2, p. 349-360, 2010a.

BARBOZA, S. B. S. C.; GRACIANO-RIBEIRO, D.; TEIXEIRA, J. B.; PORTES, T. A.; SOUZA, L. A. C. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v. 41, p. 185-194, 2006.

BASHAN, Y.; BASHAN, L. E.; PRABHU, S. R.; HERNANDEZ, J. B. Advances in plant growth promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives. **Plant and Soil**, v. 378, p. 1-33, 2014.

BERG G, SMALLA K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 68, p. 1–13, 2009.

BERG, G.; ERLACHER, A.; SMALLA, K.; KRAUSE, R. Vegetable microbiomes: is there a connection between opportunistic infections, human health and our 'gut feeling'? **Microbiology Biotechnol** v.7, p. 487-495, 2014.

BERILLI, S. S. CARVALHO A. J. C.; FREITAS S. J.; FARIA, D. C.; MARINHO, C. S. Avaliação do desenvolvimento de diferentes tamanhos de mudas micropropagadas de abacaxizeiro, após aclimação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 208-214, 2011.

BEZERRA, G. A.; GABRIEL, A. V. M. D.; MARIANO, E. D.; CARDOSO, J. C. *In vitro* culture and greenhouse acclimatization of *Oncidium varicosum* (Orchidaceae) with microorganisms isolated from its roots. **Ornamental Horticulture**, v. 25, n. 4, p. 407-416, 2019.

BOTELLA, J. R.; HAMILL, S.; KO, H.; MATSUMOTO, T.; SOUZA, F. V. D. Biotechnology. The Pineapple: Botany, Production and Uses. 2ed. Herndon: **CAB International**, v. 1, p. 123-132, 2018.

BULGARELLI, D.; OTER, R. G.; MÜNCH, P. C.; WEIMAN, A.; DRÖGE, J.; PAN, Y.; MCHARDY, A. C.; SCHULZE-LEFERT, P. Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. **Cell Host Microbe**, v. 17, p. 392–403, 2015.

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

COMPANT, S.; SAMAD, A.; FAIST, H.; SESSITSCH, A. A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. **Journal of Advanced Research**, v. 19, p. 29-37, 2019.

CRESTANI, M.; BARBIERI, R. L.; HAWERROTH, F. J.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A. C. Das Américas para o Mundo - origem, domesticação e dispersão do abacaxizeiro. **Ciência Rural**, v.40, n.6, p.1473-1483, 2010.

CUNHA, J. de F.; PICOLI, E. A. de T.; ALFENAS, A. C.; GONCALVES, R. C. Efeito "in vitro" de antibióticos e rizobactérias no controle de bactérias fitopatogênicas ao *Eucalyptus* spp. **Revista Árvore**, v.30, n.6, p.871-876, 2006.

DAUD, N. S.; DIN, A. R. J. M.; ROSLI, M. A.; AZAM, Z. M.; OTHMAN, N. Z.; SARMIDI, M. R. *Paenibacillus polymyxa* bioactive compounds for agricultural and biotechnological applications. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 18, 101092, 2019.

DIN, M.; NELOFER, R.; SALMAN, M.; ABDULLAH; KHAN, F. H.; KHAN, A.; AHMAD, M.; JALIL, F.; DIN, J. U.; KHAN, M. Production of nitrogen fixing Azotobacter (SR-4) and phosphorus solubilizing *Aspergillus niger* and their evaluation on *Lagenaria siceraria* and *Abelmoschus esculentus*. **Biotechnology Reports**, v. 22, 2019.

DOMENECH, J.; REDDY, M. S.; KLOPPER, J. W.; Ramos, B.; Gutierrez-Mañero, J. Combined Application of the Biological Product LS213 with Bacillus, Pseudomonas or Chryseobacterium for Growth Promotion and Biological Control of Soil-Borne Diseases in Pepper and Tomato. **Biocontrol**, v. 51, p. 245-258, 2006.

DUHAMEL, M.; VANDENKOORNHUYSE, P. Sustainable agriculture: possible trajectories from mutualistic symbiosis and plant neodomestication. **Trends in plant science**, p. 597-600, 2013.

FAN, P.; CHEN, D.; HE, Y.; ZHOU, Q.; TIAN, Y.; GAO, L. Alleviating salt stress in tomato seedlings using *Arthrobacter* and *Bacillus megaterium* isolated from the rhizosphere of wild plants grown on saline–alkaline lands. **International Journal of Phytoremediation**, v. 18, p. 1113-1121, 2016.

FIERER, N. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, p. 579-590, 2017.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO) Database, United States: Database.United States: **FAO/FAOSTAT**, Disponível em: <http://faostat.fao.org>, Acesso em: 18/09/2018.

GOMES E. A.; SILVA C. U.; OLIVEIRA C. A.; LANA U. P.; MARRIEL I. E.; SANTOS, V. L. Microrganismos promotores do crescimento de plantas. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2016. 51 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 208).

HARTMANN, A.; FISCHER, D.; KINZEL, L.; CHOWDHURY, S. P.; HOFMANN, A.; BALDANI, J. I.; ROTHBALLER, M. Assessment of the structural and functional diversities of plant microbiota: Achievements and challenges – A review, **Journal of Advanced Research**, v. 19, p. 3-13, 2019.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo agropecuário. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pam/tabelas>.

KUMAR, A.; VERMA, J. P. Does plant—Microbe interaction confer stress tolerance in plants: A review? **Microbiological Research**, v. 207, p. 41-52, 2018.

KUNZE, A.; LOVATO, P. E.; COSTA, M. D.; DAL VESCO, L. L. Pineapple (*Ananas comosus*) cv. Pérola *ex vitro* growth and mycorrhizal colonization affected by *in vitro* sucrose concentration. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 3, p. 766-770, 2014.

LEFF, J. W.; LYNCH, R. C.; KANE, N. C.; FIERER, N. Plant domestication and the assembly of bacterial and fungal communities associated with strains of the common sunflower, *Helianthus annuus*. **New Phytologist**, v. 214, p. 412–423, 2016.

LOCATELLI, L. M.; LOVATO, P. E. Inoculação micorrízica e aclimatização de dois porta-enxertos de macieira micropropagados. **Pesquisa Agropecuária Brasília**, v. 37, n. 2, p. 177-184, 2002.

LOPEZ, B. R.; PALACIOS, O. A.; BASHAN, Y.; HERNÁNDEZ-SANDOVAL, BASHAN, L. E. Riboflavin and lumichrome exuded by the bacterium *Azospirillum brasilense* promote growth and changes in metabolites in *Chlorella sorokiniana* under autotrophic conditions. **Algal Research**, v. 44, p.1-8, 2019.

MELLO, M. R. F., MARIANO, R. L. R., MENEZES, M., CÂMARA, T. R.; ASSIS, S. M. P. Seleção de bactérias e métodos de bacterização para promoção de crescimento em mudas de abacaxizeiro micropropagadas. **Summa Phytopathologica**, v. 28, p.222-228, 2002.

MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJMAKERS, M. J. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 634-663, 2013.

MORAES, T. A. L.; MELO, N. F.; YANO-MELO, A. M. OLIVEIRA, J. R. de G. Fungos micorrízicos arbusculares e rizobactérias promotoras de crescimento na aclimatização de *Zingiber spectabile*. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 3, p. 687-694, 2010.

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

PADMAVATHI, T.; DIKSHIT, R.; SESHAGIRI, S. Effect of *Rhizophagus* spp. and plant growth-promoting *Acinetobacter junii* on *Solanum lycopersicum* and *Capsicum annum*. **Brazilian Journal of Botany**, v. 38, p. 273–280, 2015.

PARADISO, R.; ARENA, C.; DE MICCO, V.; GIORDANO, M.; ARONNE, G.; DE PASCALE, S. Changes in Leaf Anatomical Traits Enhanced Photosynthetic Activity of Soybean Grown in Hydroponics with Plant Growth-Promoting Microorganisms. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 674-687, 2017.

PARK, Y-S.; DUTTA, S.; ANN, M.; RAAIJMAKERS, J. M.; PARK, K. Promotion of plant growth by *Pseudomonas fluorescens* strain SS101 via novel volatile organic compounds. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 461, p. 361-365, 2015.

PASQUAL, M.; SANTOS, F. C.; FIGUEIREDO, M. A.; JUNQUEIRA, K. P.; REZENDE, J. C.; FERREIRA, E. A. Micropropagação do abacaxizeiro ornamental. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n.1, p. 45-49, 2008.

PEREIRA, F. D.; PINTO, J. E. B. P.; RODRIGUES, H. C. A.; ROSADO, L. D. S.; BEIJO, L. A.; LAMEIRA, O. A. Proliferação in vitro de brotos de curauá utilizando diferentes volumes de meio de cultura. **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 2, n. 2, p. 102-106, 2006.

PEREZ-JARAMILLO, J. E.; MENDES, R.; JRAAIJMAKERS, J. E. Impact of plant domestication on rhizosphere microbiome assembly and functions. **Plant Molecular Biology**, v. 90, p. 635-644, 2016.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria, 2017. (<https://www.r-project.org/>).

REGALADO, J. J.; VIGNALE, M. V.; NOVAS, M. V.; PITTA-ALVAREZ, S. I.; IANNONE, L. J. *Epichloë occultans* enhances micropropagation efficiency in *Lolium multiflorum*. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v. 130, p. 37-46, 2017.

SANTOS, P. B.; BARBOSA, F. S.; VIEIRA, C. F.; CARVALHO, A. C. P. P. Número de explantes, meio de cultura e fotoperíodo na micropropagação de abacaxizeiro ornamental. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 46, n. 4, p. 749-754, 2015.

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

SOUZA, E. H.; SOUZA, F. V. D.; COSTA, M. A. P. C.; COSTA JUNIOR, D. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; AMORIM, E. P.; LEDO, C. A. S. Genetic variation of the *Ananas* genus with ornamental potential. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 59, n. 7, p. 1357-1376, 2012a.

SOUZA, E. H.; SOUZA, F. V. D.; SILVA, M. J.; SOUZA, A. S.; COSTA, M. A. P. C. Growth regulators and physical state of culture media in the micropropagation of ornamental pineapple hybrids. **Plant Cell Culture and Micropropagation**, v. 8, n. 1-2, p. 10-17, 2012b.

SOUZA, F. V. D.; SOUZA, A. S.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, E. H.; JUNGHANS, T. G.; SILVA, M. J. Micropropagação do Abacaxizeiro e Outras Bromeliáceas. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. (Org.). **Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas**. 2ed. Brasília: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, v. 1, p. 189-218, 2013.

SOUZA, J. T.; TROCOLI, R. O.; MONTEIRO, F. P. Plants from the Caatinga biome harbor endophytic Trichoderma species active in the biocontrol of pineapple fusariosis. **Biological Control**, v. 94, p. 25-32, 2016.

SPENCE, C.; BAIS, H. The role of plant growth regulators as chemical signals in plant–microbe interactions: a double edged sword. **Current Opinion Plant Biology**, v. 27, p. 52-58, 2015.

STRINGLIS, L. A.; PROIETTI, S.; HICKMAN, R.; VERK, M. C. V.; ZAMIOUDIS, C.; PIETERSE, C.M. J. Root transcriptional dynamics induced by beneficial rhizobacteria and microbial immune elicitors reveal signatures of adaptation to mutualists. **The Plant Journal**, v. 93, p. 166-180.

VERMA, P.; YADAV, A. N.; KHANNAM, K. S.; KUMAR, S.; SAXENA, A. K.; SUMAN, A. Molecular diversity and multifarious plant growth promoting attributes of *Bacilli* associated with wheat (*Triticum aestivum* L.) rhizosphere from six diverse agro-ecological zones of India. **Journal Basic Microbiology**, v. 56, p. 44-58, 2016.

WALLENSTEIN, M. D. Managing and manipulating the rhizosphere microbiome for plant health: A systems approach. **Rhizosphere**, v. 3, p. 230-232, 2017.

WEBER, O. B.; CORREIA, D.; ROCHA, M. W.; ALVEZ, G. C.; OLIVEIRA, E. M.; SÁ, E. G. Resposta de plantas micropropagadas de abacaxizeiro à inoculação de bactérias diazotróficas em casa de vegetação. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 38, n. 12, p. 1419-1426, 2003b.

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

WEBER, O. B.; LIMA, R. N.; CRISÓSTOMO, L. A.; FREITAS, J. A. D.; CARVALHO, A. C. P. P.; MAIA, A. H. N. Effect of diazotrophic bacterium inoculation and organic fertilization on yield of Champaka pineapple intercropped with irrigated sapota. **Plant Soil**, v. 327, p. 355-364, 2010.

WEBER, O. B.; VIDEIRA, S. S.; ARAÚJO, J. L. S. Identification of culturable endophytes in 'Champaka' pineapple grown in an organic system. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, n. 26, p. 3422-3430, 2013.

ARTIGO III

**EFEITO DE BACTÉRIAS PROVENIENTES DO MICROBIOMA FUNCIONAL
DE *Ananas comosus* NO CRESCIMENTO DA CV. 'BRS IMPERIAL'**

¹Artigo a ser ajustado para posterior submissão ao comitê editorial do periódico científico Applied Microbiology and Biotechnology

Efeito de bactérias provenientes do microbioma funcional de *Ananas comosus* no crescimento da cv. 'BRS Imperial'

Resumo: O interesse na aplicação de microrganismos como biofertilizantes está aumentando devido a sua eficiência de absorção de nutrientes, além disso podem atuar também na promoção do crescimento. Nesse sentido, o estudo teve por objetivo avaliar o uso de biofertilizantes à base de bactérias provenientes do microbioma associado ao gênero *Ananas*, na promoção do crescimento em abacaxizeiros cv. 'BRS Imperial', em canteiro e vasos. Para tanto, foram preparadas as suspensões bacterianas. Para o experimento 1 foram considerados os tratamentos: bactérias endofíticas de caule (BECPAC), bactérias de solo (BASAC), BECPAC + BASAC e o controle. No experimento 2, as bactérias, 18 no total e o controle, foram testadas individualmente em abacaxizeiros 'BRS Imperial' em vasos. As plantas foram mantidas em canteiros por 90 dias e ao final desse período foram feitas as avaliações. Já as plantas em vasos passaram por avaliações periódicas (0, 30, 60 e 90 dias) com as variáveis de crescimento: altura da planta (cm), diâmetro da roseta (cm), número de folhas, comprimento da folha D (cm), largura da folha D (cm). Para as avaliações destrutivas foram coletados os dados de massa fresca (g) e seca (g) da parte aérea e raízes. Em canteiros o tratamento BECPAC formulado à base de bactérias endofíticas de caule, foi o que esteve relacionado ao melhor resultado, seguido de BASAC. Em vasos, aos 90 dias foi observado que todos os isolados foram relacionados à promoção de crescimento de pelo menos uma variável, o que foi observado também para as taxas de crescimento. O BAC406 e BAC45 se destacaram quanto à promoção de crescimento. O tratamento BECPAC promoveu o crescimento das plantas em canteiro e promoveu aumento de biomassa da parte aérea e raízes em canteiro. Todas as bactérias associadas ao gênero *Ananas* foram capazes de promover o crescimento até certo grau, durante o desenvolvimento das plantas, melhorando significativamente os parâmetros de crescimento.

Palavras-chave: biofertilizantes, microrganismos, abacaxizeiros.

Effect of bacteria from the functional microbiome of *Ananas comosus* on the growth of cv. 'BRS Imperial'

Abstract: The interest in the application of microorganisms as biofertilizers is increasing due to their nutrient absorption efficiency, in addition they can also act in promoting growth. In this sense, the study aimed to evaluate the use of biofertilizers based on bacteria from the microbiome associated with the genus *Ananas*, in promoting growth in pineapples cv. 'BRS Imperial', in seed beds and pots. For that, bacterial suspensions with isolates were prepared. For experiment 1 the treatments were considered: BECPAC, BASAC, BECPAC + BASAC and the control with plants that did not receive the mixture of biofertilizers in beds. In experiment 2, the bacterial isolates, 18 in total and the control, were individually tested in 'BRS Imperial' pineapples in pots. The experimental design was completely randomized, in both experiments. The plants were kept in beds for 90 days and at the end of that period, evaluations were made. Potted plants, on the other hand, underwent periodic evaluations (0, 30, 60 and 90 days) with growth parameters: plant height (cm), rosette diameter (cm), number of leaves, leaf length D (cm), sheet width D (cm). For destructive assessments, fresh (g) and dry (g) mass data from the aerial part and roots were collected. In beds, the BECPAC treatment formulated based on stem endophytic bacteria was the one that was related to the best result, followed by BASAC. In pots, at 90 days it was observed that all isolates were related to the promotion of growth of at least one variable, which was also observed for growth rates. BAC406 and BAC45 stood out in terms of promoting growth. The BECPAC treatment promoted the growth of plants in the seed bed and increased the biomass of the aerial part and roots in the seeds bed. All the bacteria associated with the genus *Ananas* were able to promote growth to a certain degree, during the development of the plants, significantly improving the parameters of growth.

Keywords: biofertilizers, microorganisms, pineapples.

INTRODUÇÃO

A complexidade das interações ocorridas entre plantas e microrganismos tem despertado o interesse da comunidade científica, gerando estudos que evidenciam os efeitos benéficos dessa associação quanto aos aspectos de crescimento, desenvolvimento, nutrição, doenças e produtividade (MENDES et al., 2013), que não se restringem apenas aos microrganismos presentes na rizosfera (CALVO et al., 2014), mas também aos endofíticos (GLICK, 2014; WALITANG et al., 2017).

Estudos iniciais relacionados à compreensão dos mecanismos de ação das bactérias promotoras do crescimento de plantas passaram por numerosos desafios. Esses vão desde o entendimento dos processos bioquímicos e genéticos que caracterizam a base para a promoção do crescimento de plantas, como também a ecologia da interação com as plantas hospedeiras como fundamento da ação benéfica, com a finalidade de aplicar essas bactérias como biofertilizantes ou bioestimulantes para o estabelecimento de um manejo agrícola sustentável (HARTMANN et al., 2019).

Diversos estudos relatam sobre a utilização de microrganismos benéficos em culturas de importância agrícola (EKIN et al., 2019; DIAS et al., 2017; WALITANG et al., 2017), aplicados a partir de uma única cepa ou com várias cepas. O crescente interesse na aplicação de microrganismos como biofertilizantes tem aumentado devido a sua eficiência de absorção de nutrientes, além disso podem atuar também na promoção de crescimento (ZHANG et al., 2021; OLANREWAJU et al., 2017) e na redução de doenças de plantas (HU et al., 2016; BERNAL et al., 2017).

A utilização de biofertilizantes a partir de microrganismos funcionais pode ser considerada uma alternativa eficaz e segura ao uso dos fertilizantes sintéticos (WU et al., 2018). Com isso, muitos estudos tem sido realizados com diferentes grupos de microrganismos. A exemplo, pesquisadores testaram a aplicação de biofertilizante a base de *Bacillus subtilis* e concluíram que o seu uso é uma estratégia promissora para reduzir a emissão de NH₃ agrícola, mantendo o alto rendimento da safra e mitigando os distúrbios ambientais (SUN et al., 2020). A

utilização de biofertilizantes a base de microrganismos foi relacionada também ao aumento da biomassa em *Medicago Sativa* (ZHANG et al., 2020), ou ainda à supressão de doenças (FU et al., 2017).

Nesse sentido, o estudo teve por objetivo avaliar o uso de biofertilizantes bacterianos provenientes do microbioma associado a *Ananas* spp., na promoção do crescimento em abacaxizeiros cv. 'BRS Imperial', em canteiro e vasos.

MATERIAL E MÉTODOS

Mudas micropropagadas de abacaxizeiros cv. 'BRS Imperial' foram utilizadas para avaliar o efeito da aplicação de bactérias. As mudas que compuseram o experimento foram fornecidas pela Biofábrica da Bahia. O experimento foi conduzido na área experimental da Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizada na cidade de Cruz das Almas, Bahia. O município está situado a 12°40'19" de Latitude Sul e 39°06'22" de Longitude Oeste a 220 m acima do nível do mar. Segundo a classificação de Köppen (1936), o clima é tropical quente e úmido, com temperatura média anual de 24,5 °C, umidade relativa de 80% e precipitação média de 1.249,7 mm anuais.

As mudas que compuseram os experimentos 1 e 2 foram plantadas em canteiros, com espaçamento de 10 x 10 cm, a céu aberto. Após 30 dias de estabelecidas foram separadas para montagem dos dois experimentos descritos a seguir:

Experimento 1: Aplicação de biofertilizantes à base de mixes de bactérias em abacaxizeiros 'BRS Imperial' em canteiro

As bactérias coleção biológica de microrganismos associados a *Ananas* spp. foram reativadas retirando-se 100 µL da suspensão celular de cada isolado que se encontrava armazenado em meio nutriente líquido acrescido de glicerol a 30% em freezer a -22 °C, os quais foram adicionados a erlenmeyers contendo 200 mL de caldo nutriente cuja composição por litro é: 1000 ml de água destilada, 1,5 g de extrato de carne, 5,0 g de peptona, 5,0 g de NaCl, 1,5 g de levedura. Feito

isso, os erlenmeyres foram alocados em mesas agitadoras onde permaneceram por 24 h sob agitação constante e em temperatura ambiente entre 22 °C e 31 °C.

As suspensões obtidas de cada erlenmeyer com diferentes bactérias foram reunidas em diferentes béqueres para cada uma das suspensões, as quais foram padronizadas com base no valor de absorbância e ajustadas para uma densidade ótica ($D.O._{540} = 1$) que corresponde a 10^8 UFC mL⁻¹. Ao todo foram preparados 400 mL de cada isolado bacteriano. A cada preparo foi adicionada uma solução de 3,6 L de MgCl₂ a 10 Mm, totalizando 4,0 L de cada isolado bacteriano. Em seguida foram misturados em bombonas com capacidade de 50 L conforme os tratamentos: BECPAC (Bactérias Endofíticas de Caule de Plantas de Ambiente Cultivado), BASAC (Bactérias de Solo de Ambiente Cultivado), BECPAC + BASAC (Bactérias Endofíticas de Caule de Plantas de Ambiente Cultivado + Bactérias de Solo de Ambiente Cultivado) e o controle com plantas que não receberam a mistura de bactérias. A aplicação da mistura biofertilizante nas plantas foi realizada com o auxílio de regador, e as plantas receberam essa mistura uma única vez.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com o total de 250 plantas em cada canteiro, sendo três tratamentos e o controle. As plantas foram mantidas em canteiros por 90 dias e ao final desse período foram feitas as avaliações para as seguintes variáveis de crescimento: altura da planta (cm), diâmetro da copa (cm), número de folhas, comprimento da folha D (cm), largura da folha D (cm). Para as avaliações destrutivas foram coletados os dados de massa fresca da parte aérea (g) e massa fresca de raízes (g), em seguida as amostras foram alocadas em estufas de ventilação durante 72 h para estabilização dos dados de massa seca da parte aérea (g) e massa seca de raízes (g). Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas com base no teste de Scott-Knott a 5 % de probabilidade utilizando programa estatístico SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2008).

Experimento 2: Aplicação de bactérias testadas individualmente em abacaxizeiros 'BRS Imperial' cultivados em vasos

As mudas foram inseridas em vasos plásticos (20 x 17 cm), cuja capacidade foi 3,3 L, contendo solo (Latosolo amarelo de textura franco-argilo-arenosa) e após o pegamento as suspensões bacterianas foram adicionadas.

As bactérias da coleção biológica de microrganismos associados a *Ananas* spp. foram reativadas retirando-se 100 µL da suspensão celular de cada isolado que se encontrava armazenado em meio nutriente líquido acrescido de glicerol a 30% em freezer a -22 °C, os quais foram adicionados a erlenmeyers contendo 100 mL de meio nutriente líquido cuja composição por litro é a seguinte: 1000 ml de água destilada, 1,5 g de extrato de carne, 5,0 g de peptona, 5,0 g de NaCl, 1,5 g de levedura. Feito isso, os erlenmeyers foram alocados em mesas agitadoras onde permaneceram por 24h sob agitação constante e em temperatura ambiente.

As suspensões bacterianas obtidas de cada erlenmeyer foram reunidas em diferentes béqueres para cada uma das suspensões, as quais foram padronizadas com base no valor de absorbância e ajustadas para uma densidade ótica D.O. ₅₄₀ = 1) que corresponde a 10⁸ UFC mL⁻¹. Uma alíquota de 250 mL de cada cultura bacteriana foi adicionada ao solo contido em vasos plásticos, bem como nesse momento também as plantas foram regadas com essa solução.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com o total de 285 plantas em vasos, sendo 18 tratamentos (isolados bacterianos) e o controle (não tratado com bactérias). Cada tratamento foi composto por 15 plantas (Tabela 1). As plantas foram mantidas nos vasos ao ar livre durante 90 dias e receberam adubação foliar com o fertilizante Nifhokam, (Fênix Agro), durante esse período a cada 30 dias.

O efeito da microbiolização foi avaliado por meio das variáveis de crescimento da parte aérea: altura da planta (cm), diâmetro da copa (cm), número de folhas, comprimento da folha D (cm), largura da folha D (cm). Com os dados obtidos foram gerados boxplots para comparação entre os tratamentos, análise de correlação e análise de cluster para o agrupamento dos tratamentos utilizando o programa estatístico R (R Development Core Team, 2017).

Tabela 1. Descrição dos isolados utilizados nos experimentos 1 e 2. Cruz das Almas, Bahia, Fevereiro de 2021.

Isolado	Nicho de ocupação	Identificação taxonômica ao nível de gênero (BLAST-NCBI)
BAC25	Bactérias endofíticas ¹	<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 ²
BAC45	<i>Acinetobacter</i>	
BAC47	<i>Arthrobacter</i>	
BAC54	<i>Acinetobacter</i>	
BAC222	-	
BAC223	<i>Bacillus spp.</i>	
BAC226	<i>Enterobacter</i>	
BAC400	-	

¹Bactérias isoladas a partir de fragmentos do caule de plantas coletadas em áreas de cultivo de *Ananas comosus*.

²Bactérias isoladas a partir de solo rizosférico de plantas coletadas em áreas de cultivo de *Ananas comosus*.



Figura 1. a. ativação dos isolados imersos em meio nutriente líquido durante 24 h em mesa agitadora; b - c. padronização das suspensões bacterianas com base no valor de absorbância em espectrofotômetro; d – e. microbiolização do solo com as suspensões bacterianas; f. transferência das plantas para local do experimento; g. plantas aleatorizadas em área experimental. Cruz das Almas, Bahia, Fevereiro de 2021.

RESULTADOS

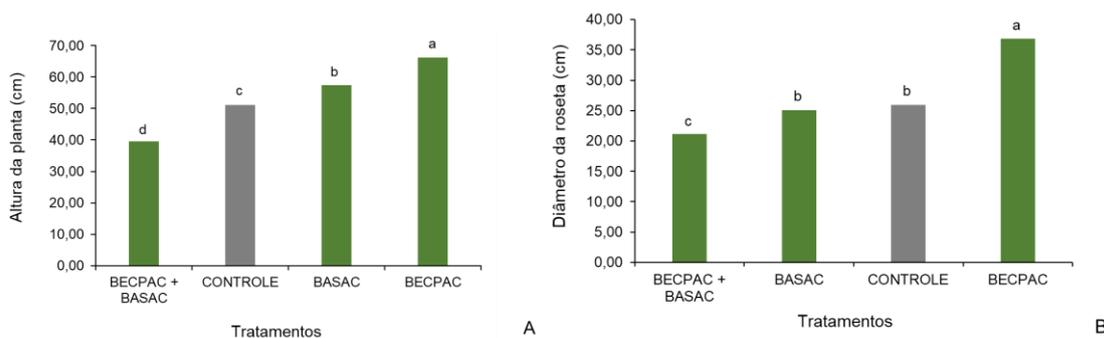
Efeito da aplicação de biofertilizantes à base de mixes de bactérias em abacaxizeiros ‘BRS Imperial’ em canteiro

Os resultados da análise de crescimento para os tratamentos testados são apresentados na Figura 2 (A-E).

Para as variáveis altura da planta (Figura 2.A) e comprimento da folha D (Figura 2.C) o tratamento BECPAC formulado à base de bactérias endofíticas de caule, foi o que esteve relacionado ao melhor resultado, seguido de BASAC que é composto de bactérias de solo, que também diferiu significativamente do controle. No entanto, as plantas microbiolizadas com o tratamento formulado a partir da mistura dos mixes BECPAC + BASAC, responderam negativamente para a variável altura da planta.

Quanto ao diâmetro da copa (Figura 2.B) o BECPAC também se destacou com os melhores resultados, já o tratamento BASAC juntamente com o controle não diferiram estatisticamente entre si para essa variável. O tratamento BECPAC + BASAC foi o que esteve relacionado a resultados inferiores aos demais. Resultados semelhantes foram observados também para a variável número de folhas (Figura 2.D).

Ao analisar a variável largura da folha, mais uma vez foi observado melhor resultado para o tratamento BECPAC, seguido de BASAC. Já o controle não diferiu estatisticamente do tratamento BECPAC + BASAC para essa variável (Figura 2.E).



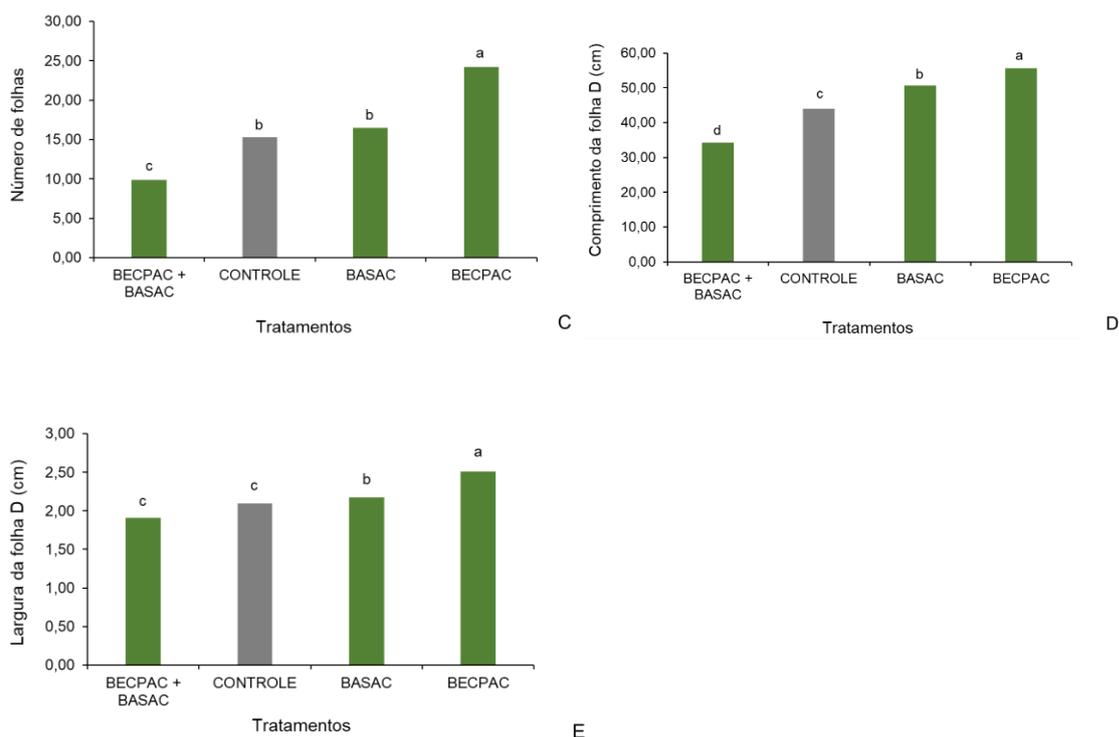


Figura 2. Representação gráfica dos parâmetros de crescimento avaliados e os tratamentos. A. altura da planta (cm); B. diâmetro da copa (cm); C. número de folhas; D. comprimento da folha D (cm); E. largura da folha D (cm). CONTROLE: plantas que não foram tratadas com microrganismos; BASAC: bactérias de solo de ambiente cultivado; BECPAC: bactérias endofíticas de caule de plantas de ambiente cultivado; BECPAC + BASAC: Mixes de bactérias endofíticas de caule de plantas de ambiente cultivado somado a bactérias de solo de ambiente cultivado. Médias seguidas por mesma letra pertencem ao mesmo grupo pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Cruz das Almas, Bahia, Fevereiro de 2021.

Na tabela 2 são observados os efeitos da aplicação de biofertilizantes à base de bactérias endofíticas e de solo em abacaxizeiros 'BRS Imperial' (Figura 3), mas sobre as variáveis de biomassa da parte aérea e raízes. Para todas as variáveis analisadas, massa fresca e seca da parte aérea e raízes o único tratamento que diferiu estatisticamente dos demais com os melhores resultados observados foi o tratamento BECPAC. Os outros tratamentos testados não diferiram do controle.

Tabela 2. Massa fresca e seca de folhas e raízes de abacaxizeiros 'BRS Imperial' sob efeito da aplicação de biofertilizantes à base de bactérias provenientes do microbioma associado à *Ananas*. Cruz das Almas, Bahia, Fevereiro de 2021.

Tratamento	Folhas		Raízes	
	Massa fresca (g)	Massa seca (g)	Massa fresca (g)	Massa seca (g)
CONTROLE	160,19 b	29,61 b	2,62 b	2,08 b
BASAC	217,72 b	31,74 b	2,05 b	1,51 b
BECPAC	322,03 a	50,93 a	4,05 a	3,05 a
BECPAC + BASAC	110,96 b	23,97 b	2,07 b	1,59 b
CV%	33,22	16,43	33,07	32,97

Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade. Controle: plantas que não foram tratadas com bactérias; BASAC: bactérias de solo de ambiente cultivado; BECPAC: bactérias endofíticas de caule de plantas de ambiente cultivado; BECPAC + BASAC: Mixes de bactérias endofíticas de caule de plantas de ambiente cultivado somado a bactérias de solo de ambiente cultivado.

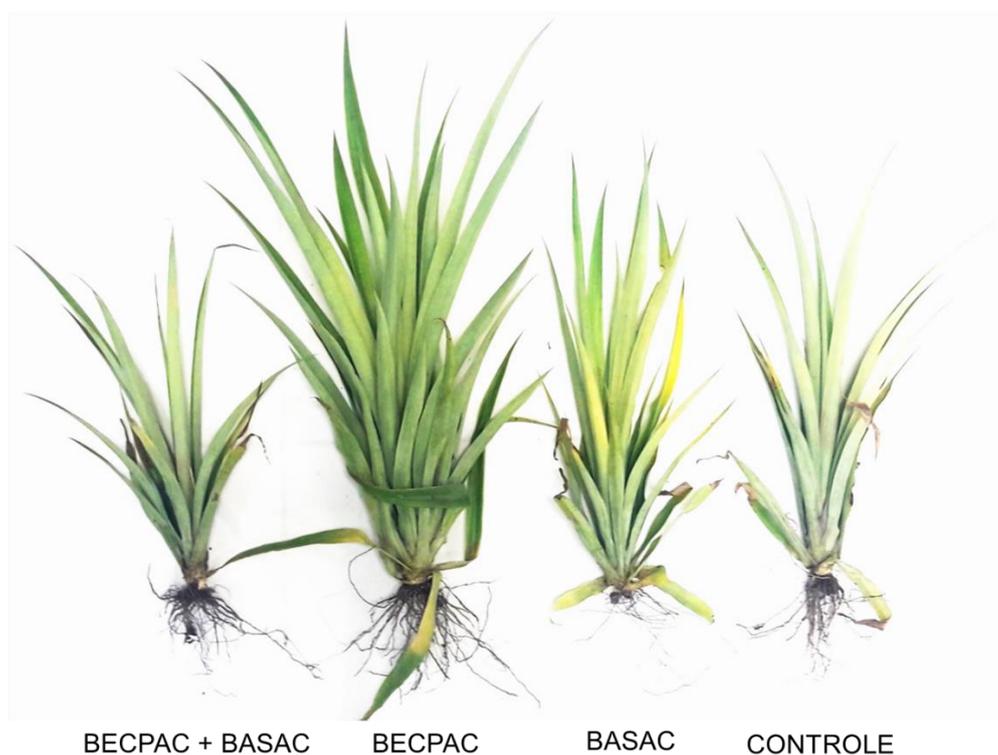


Figura 3. Imagem comparativa das plantas 90 dias após aplicação de biofertilizantes à base de microrganismos e o controle. Cruz das Almas, Bahia, Fevereiro de 2021.

Efeito da aplicação de bactérias testadas individualmente em abacaxizeiros 'BRS Imperial' cultivados em vasos

Os efeitos da aplicação das bactérias testadas em abacaxizeiros 'BRS Imperial' podem ser observados na Figura 4 (A-D).

O boxplot comparativo entre as amostras para a variável altura das plantas mostra a variação existente entre os tratamentos e assimetria presente na distribuição dos dados para a maioria dos tratamentos.

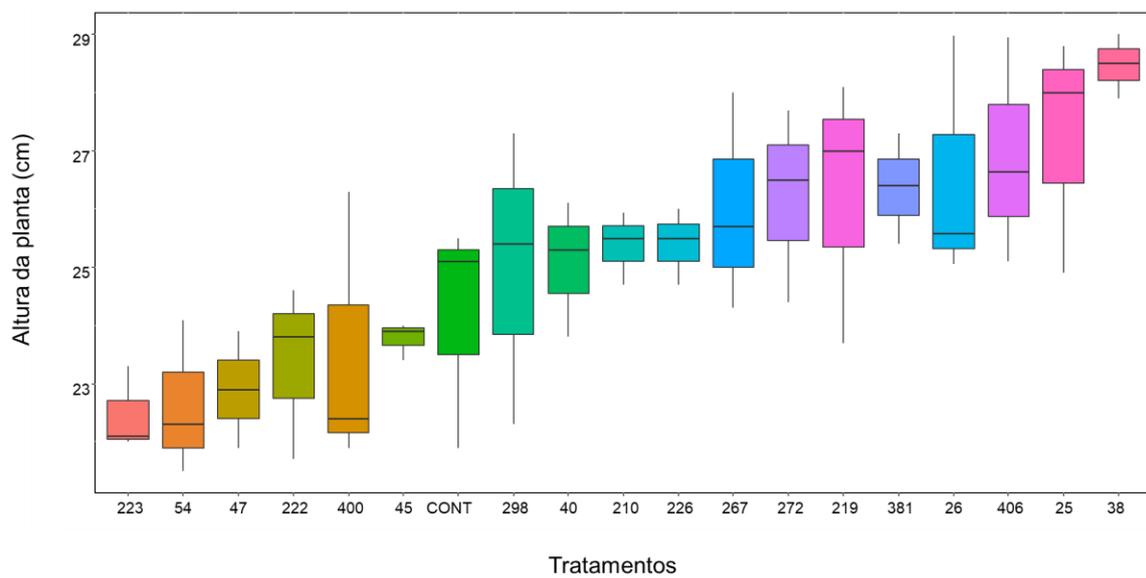
Acréscimos na altura das plantas podem ser observados no sentido da distribuição dos tratamentos no boxplot, crescente do tratamento 223 a 38 (Figura 4.A). Os isolados BAC298, BAC40, BAC210, BAC226, BAC267, BAC272, BAC219, BAC381, BAC26, BAC406, BAC25 e BAC38 promoveram acréscimos na altura da planta em comparação ao controle, com destaque para BAC38, já os isolados BAC45, BAC400, BAC222, BAC47, BAC54 e BAC223 estão relacionados a decréscimos para a mesma variável, sobretudo para o BAC223.

Quando comparados os tratamentos para a variável diâmetro da copa, os melhores resultados foram promovidos pelos tratamentos BAC400, BAC45 e BAC222, com destaque para o último em que foi observado maior promoção de crescimento. Comportamento semelhante ao controle foi observado para os tratamentos BAC223, BAC298, BAC40 e BAC406. Os demais tratamentos proporcionaram redução do diâmetro da copa com destaque para o BAC267 (Figura 4.B).

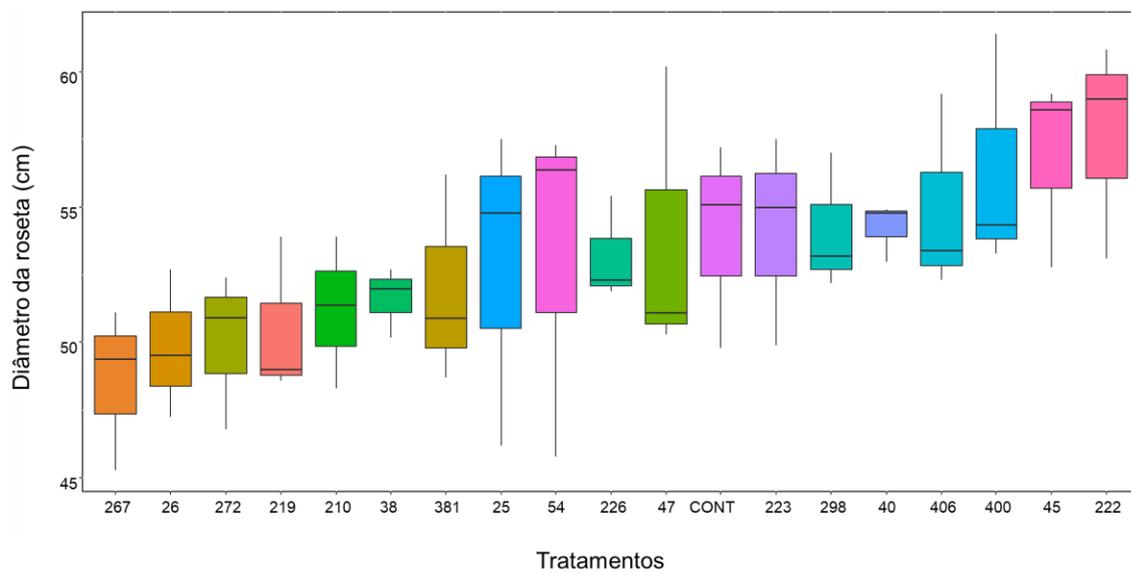
Em relação a variável número de folhas, podem ser observados aumentos crescentes no sentido BAC267 a BAC45. Os isolados BAC222, BAC406 e BAC45 produziram os melhores resultados, com destaque para o último citado, no entanto resultados semelhantes ao controle foram obtidos para os tratamentos BAC47, BAC296 e BAC226. Os demais tratamentos apresentaram-se inferiores aos acima citados, com destaque para BAC267 e BAC38 (Figura 4.C).

Para a largura da folha D foram observadas variações discretas entre os tratamentos, com aumentos no sentido crescente dos tratamentos BAC219 a BAC45. Os piores resultados foram registrados para os tratamentos BAC219, BAC223 e o controle, os demais tratamentos estão relacionados aos melhores

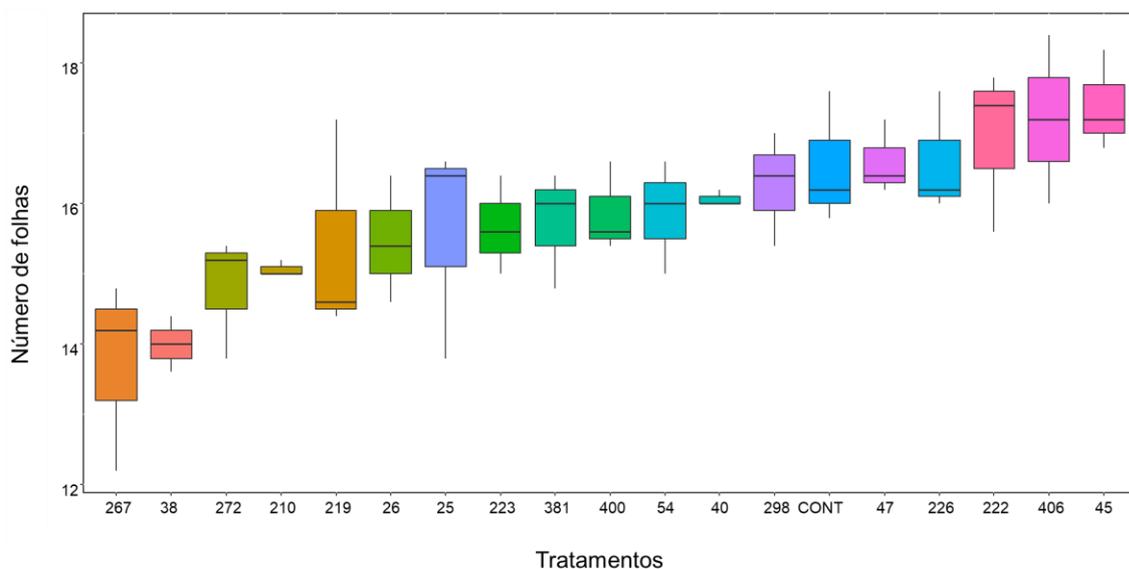
resultados com destaque os tratamentos BAC45, BAC298, BAC222 e BAC25 (Figura 4.D).



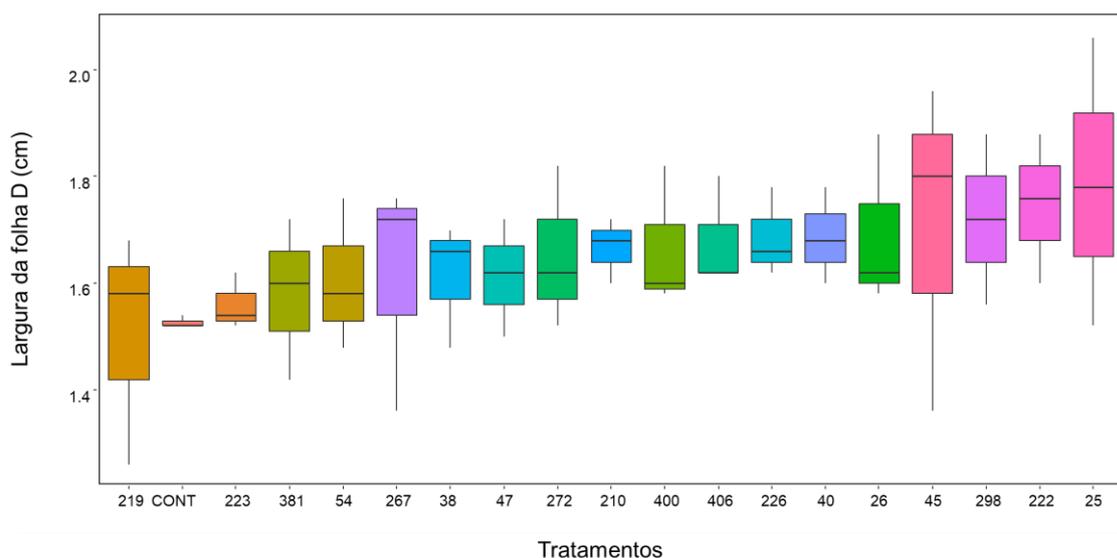
A



B



C



D

Figura 4. A-D. Boxplot representativo das variáveis de crescimento comparando-se os tratamentos. A - Altura da planta; B – diâmetro da copa; C – Número de Folhas; D - Largura da folha D. Tratamentos: BAC25; BAC26; BAC210; BAC219; BAC267; BAC272, BAC298, BAC381, BAC388, BAC406, BAC40, BAC45, BAC47, BAC54, BAC222, BAC223, BAC226, BAC400. Cruz das Almas, Bahia, Fevereiro de 2021.

A análise de correlação para as variáveis altura da planta (ALT), diâmetro da copa (DIA), Número de folhas (NF) e Largura da folha D (LF) consta na Figura

5. A variável ALT não foi correlacionada com as variáveis DIA e NF, apresentou apenas baixa correlação com LFD. Já a variável DIA foi correlacionada com NF e também LFD. Foram observadas correlações entre NF e LFD.

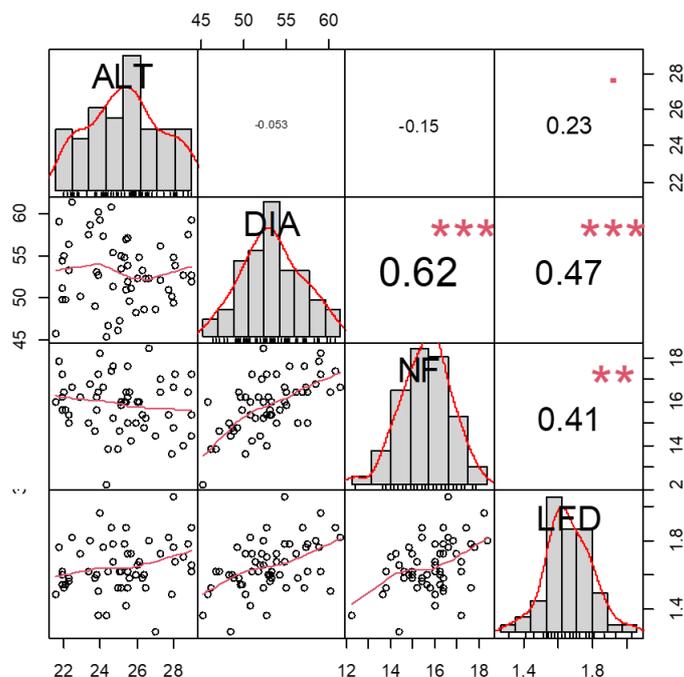


Figura 5. Correlação entre as variáveis analisadas dos abacaxizeiros ‘BRS Imperial’ aos 90 dias em vasos. ALT – altura da planta; DIA – diâmetro da copa; NF – número de folhas; LFD: largura da folha D. Cruz das Almas, Bahia, Fevereiro de 2021.

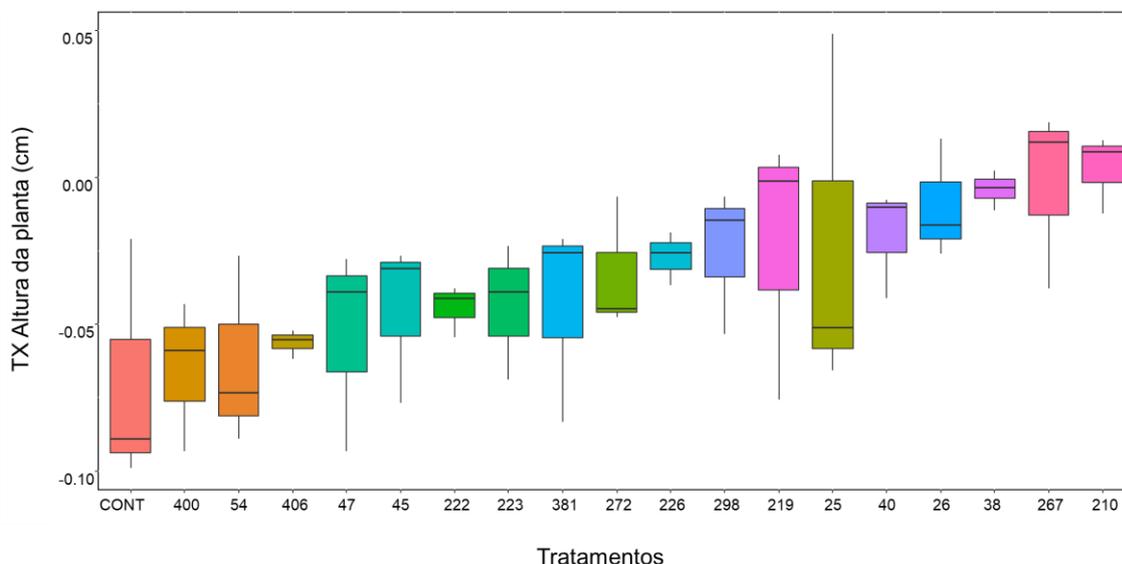
As variáveis de crescimento analisadas ao longo do tempo (0-90 dias) foram submetidas à aplicação da taxa de crescimento, onde foram observadas variações entre os tratamentos (Figura 6.A-D). A taxa de crescimento aplicada a variável altura da planta, representada no boxplot, mostra incremento no sentido crescente do controle para o tratamento BAC210. Os tratamentos com resultados semelhantes ao controle foram BAC400, BAC54 e BAC406. As maiores taxas de crescimento para essa variável foram observadas para os tratamentos BAC267 e BAC210 (Figura 6.A).

Dentre os tratamentos, as taxas de crescimento obtidas para a variável diâmetro da copa seguem no sentido crescente do tratamento BAC272 ao

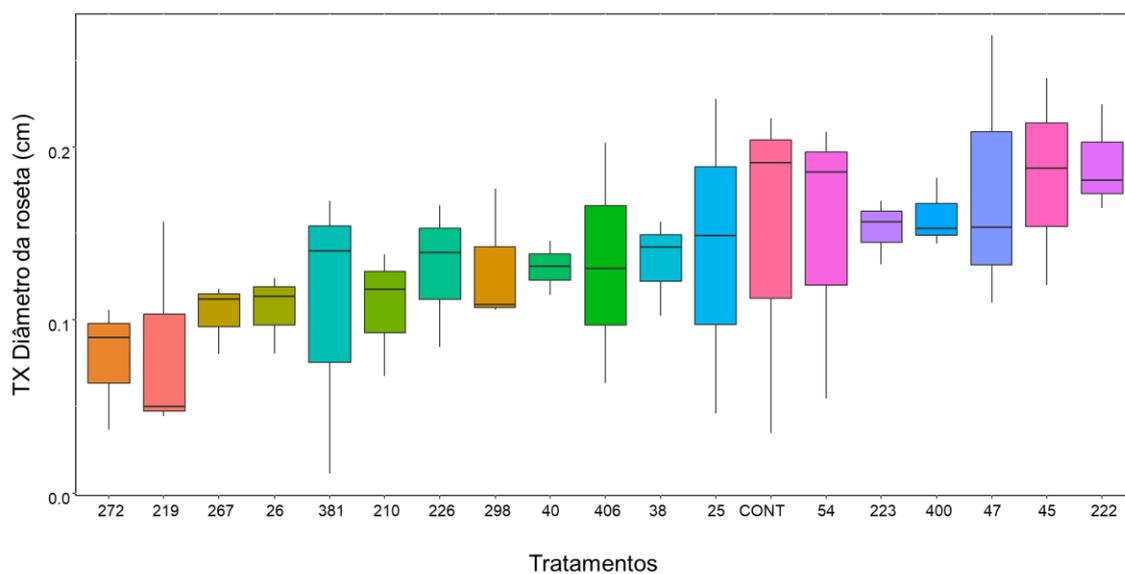
BAC222 (Figura 6.B). As taxas que se diferenciaram do controle positivamente foram observadas para os tratamentos BAC54, BAC223, BAC400, BAC47, BAC45 e BAC222, com destaque para o último citado. Os demais obtiveram taxas de crescimento menores que o controle, sobretudo os tratamentos BAC272 e BAC215.

Variações discretas foram observadas entre as taxas de crescimento para o comprimento da folha D (Figura 6.C). Apesar disso, os tratamentos BAC406, BAC38, BAC40 e BAC210 apresentaram os melhores resultados.

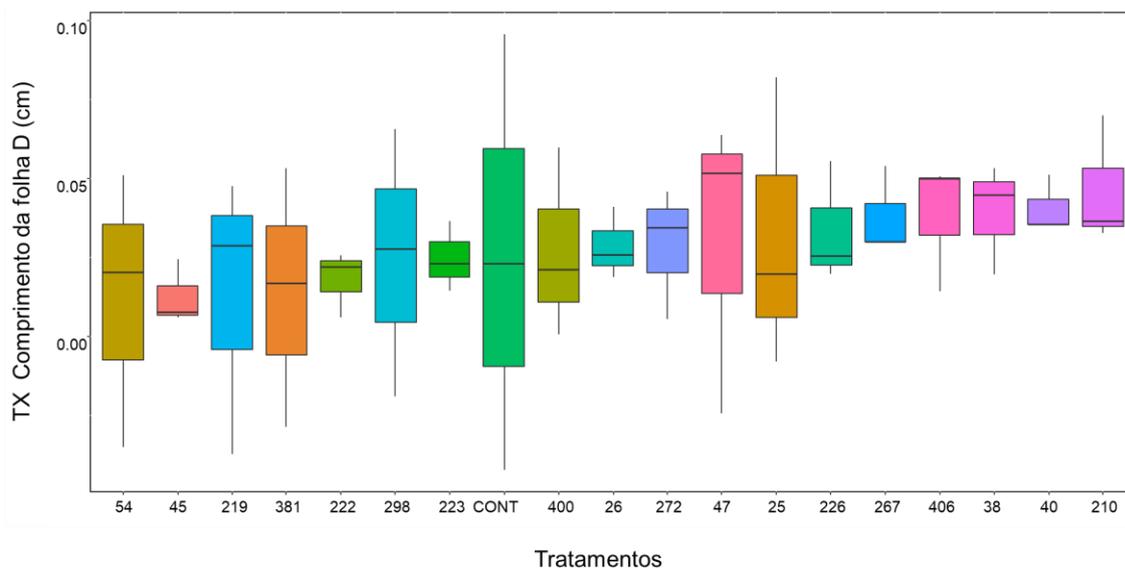
Quanto às taxas de crescimento considerando a variável largura da folha, as plantas obtiveram resultados mais satisfatórios com os tratamentos BAC45, BAC47, BAC298 e BAC54, no entanto além desses, os tratamentos BAC40, BAC267, BAC210, BAC272, BAC38, BAC222, BAC400, BAC223 e BAC226 apresentaram-se mais semelhantes ao controle. Os demais tratamentos estão relacionados aos piores resultados, sobretudo o tratamento BAC219 (Figura 6.D).



A



B



C

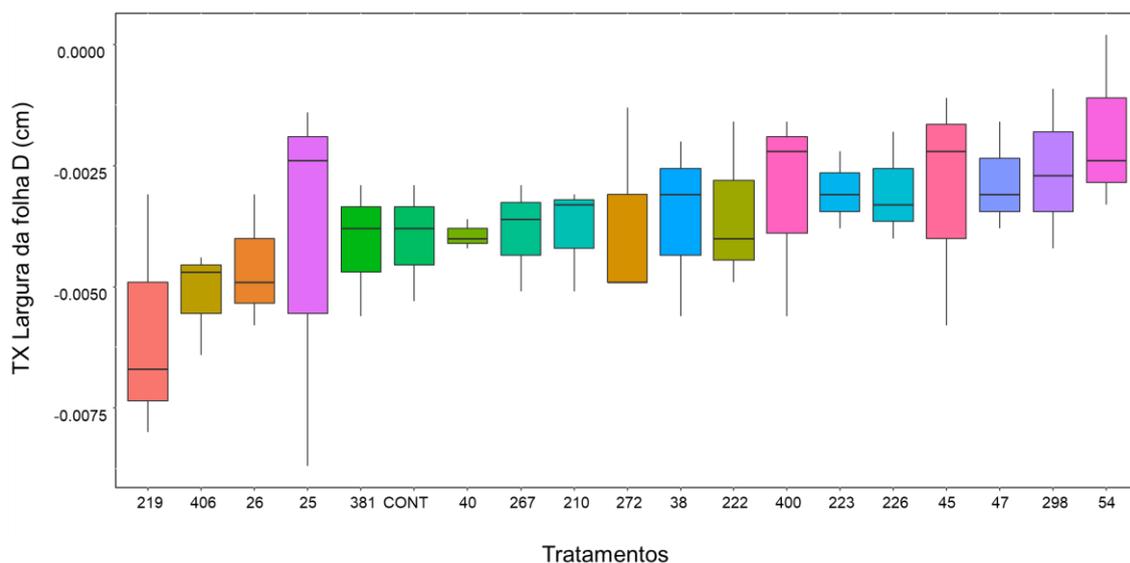


Figura 6. A-D – Boxplot representativo das taxas de crescimento comparando-se os tratamentos. A - Altura da planta; B – Diâmetro da copa; C –Comprimento da folha D; D - Largura da folha D. Tratamentos: BAC25; BAC26; BAC210; BAC219; BAC267; BAC272, BAC298, BAC381, BAC388, BAC406, BAC40, BAC45, BAC47, BAC54, BAC222, BAC223, BAC226, BAC400.

A análise conjunta dos dados correlacionando-se as taxas de crescimento e os tratamentos encontra-se na Figura 7. O grupo I é composto pelos tratamentos BAC226 (*Enterobacter*), BAC298 (*Citrobacter*) e BAC25 (*Acinetobacter*). As variáveis que mais contribuiram para formação desse grupo foram TXALT e TXDIAM, com resultados poucos satisfatórios para essas taxas. No grupo 2 encontram-se os tratamentos BAC38 (*Bacillus* spp.) e BAC40 (*Exiguobacterium*), cujas variáveis que influenciaram nessa composição foram TXALT, TXDIAM e TXCFD, sendo observados resultados promissores para as taxas de crescimento relacionadas à altura da planta e comprimento da folha D. Para a formação do grupo 3, as variáveis que mais influenciaram na composição foram TXDIA e TXALT, com os melhores resultados relacionados a TXALT. Nesse grupo encontram-se os tratamentos BAC210 (Gênero não identificado), BAC267 (*Acinetobacter*) e BAC26 (Gênero não identificado). No grupo 4 encontram-se os tratamentos BAC272 (*Acinetobacter*), BAC219 (*Enterobacter*) e BAC381

(*Acinetobacter*), e as variáveis que influenciaram esse agrupamento foram TXALT e TXDIAM, com resultados pouco expressivos para essas taxas.

Para a formação do grupo 5, as variáveis que mais contribuíram foram também TXALT e TXDIAM, com a representação dos tratamentos BAC400 (Gênero não identificado), controle, BAC54 (Gênero não identificado), BAC223 (*Bacillus* spp.) e BAC406 (*Acinetobacter*). Esses tratamentos apresentaram resultados satisfatórios para a variável TXDIAM, com exceção do BAC406. Para TXALT, esses tratamentos apresentaram resultados pouco satisfatórios. Para as demais taxas os resultados variaram entre os tratamentos.

O grupo 6, formado pelos tratamentos BAC222 (Gênero não identificado), BAC45 (*Acinetobacter*) e BAC47 (*Arthrobacter*), apresentou os melhores resultados para TXDIA. Entretanto, quanto às outras variáveis, como TXALT e TXCFD esses tratamentos não responderam positivamente. Bons resultados foram observados também para LFD.

Tabela 3. Valores médios obtidos de abacaxizeiros ‘BRS Imperial’ cultivados em vasos. Cruz das Almas, Bahia, Fevereiro de 2021.

TRATAMENTOS	Variáveis			
	Massa fresca da parte aérea (g)	Massa seca da parte aérea (g)	Massa fresca das raízes (g)	Massa seca das raízes (g)
BAC54	31,34 a	6,69 a	4,82 b	4,32 a
BAC47	36,31 a	7,40 a	6,60 b	5,76 a
BAC226	41,62 a	8,80 a	4,83 b	4,09 a
BAC272	45,51 a	13,53 a	13,76 a	7,12 a
BAC400	46,19 a	11,81 a	7,96 b	5,92 a
BAC210	47,28 a	10,72 a	14,40 a	10,43 a
BAC40	47,87 a	12,21 a	6,94 b	6,01 a
BAC267	49,42 a	13,73 a	3,96 b	3,34 a
BAC45	50,94 a	11,81 a	12,04 a	9,03 a
BAC26	55,50 a	13,45 a	5,39 b	4,57 a
BAC223	55,81 a	10,23 a	7,19 b	5,80 a
BAC388	57,06 a	12,67 a	6,45 b	5,72 a
BAC381	57,14 a	18,54 a	4,26 b	3,69 a
BAC298	58,10 a	10,31 a	6,15 b	5,38 a
BAC219	62,90 a	14,50 a	6,41 b	5,45 a
BAC222	72,20 a	12,27 a	8,16 b	6,74 a
BAC25	74,28 a	17,54 a	9,20 b	7,37 a
BAC406	87,45 a	18,35 a	7,32 b	6,05 a
CONTROLE	59,39 a	16,92 a	5,48 b	4,26 a
CV%	28,61	34,05	36,76	36,9

*Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

DISCUSSÃO

Aplicação de mixes de bactérias em abacaxizeiros ‘BRS Imperial’ em canteiros

Este estudo investigou a promoção de crescimento vegetal relacionado à bactérias endofíticas cultiváveis e de solo provenientes do microbioma associado à *Ananas* spp.. Com a análise das variáveis de crescimento foi possível quantificar diferenças entre os tratamentos e avaliar a potencialidade dos biofertilizantes na promoção do crescimento dos abacaxizeiros ‘BRS Imperial’. As variáveis avaliadas mostraram a eficiência das bactérias no crescimento das plantas.

As bactérias que compuseram o tratamento BECPAC foram eficientes em promover o crescimento das plantas em canteiro, e esses resultados foram obtidos em todas as variáveis de crescimento avaliadas, além disso foi o único tratamento que promoveu aumento de biomassa da parte aérea e raízes, com resultados expressivos. As bactérias de solo rizosférico (BASAC) associadas ao gênero *Ananas* também promoveram o crescimento das plantas, contudo os resultados foram inferiores ao BECPAC e reproduziram resultados semelhantes ao controle para algumas variáveis.

Já os resultados da combinação dos mixes BECPAC + BASAC foram relacionados à redução do crescimento das plantas avaliadas. O que pode estar associado à competição entre as populações bacterianas, gerando efeito negativo no crescimento.

O biofertilizante que destacou-se neste trabalho foi preparado à base de bactérias endofíticas isoladas de caules de *Ananas* spp., o qual tem em sua composição a predominância de bactérias do gênero *Acinetobacter*, no entanto nessa mesma composição encontram-se bactérias do gênero *Enterobacter* e *Citrobacter*. De modo semelhante ao presente estudo, em que verificamos a promoção de crescimento por bactérias, foram observados variados estudos que mostram a capacidade de bactérias dos gêneros aqui testados em promoverem incremento para as diversas culturas.

Bactérias do gênero *Acinetobacter* tem sido objeto de diversas pesquisas, desde o seu uso como bactérias promotoras do crescimento de plantas à utilização para biorremediação em solos contaminados. Estudos mostram que a espécie *Acinetobacter calcoaceticus* SE370 foi relacionada ao aumento no crescimento de pepino, couve chinesa e margarida, induzido pela produção do ácido giberélico secretado pela bactéria. Além disso, foi constatado que a promoção do crescimento das plantas também estava relacionada à conversão do fósforo insolúvel do solo em formas solúveis que estão prontamente disponíveis para as plantas (KANG et al., 2009).

A fim de investigar as propriedades de promoção de crescimento como a produção de ácido indol acético (IAA), solubilização de fosfato e óxido de zinco e a produção de sideróforos, cepas de *Acinetobacter* foram isoladas da rizosfera de

milheto. Os resultados obtidos nesse estudo corroboram a hipótese de que as cepas de *Acinetobacter* tem o potencial de atuar como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e podem aumentar o crescimento do milheto, particularmente sob condições ambientais estressantes, onde o ferro, fontes de fosfato ou zinco podem ser limitadas (ROKHBAKHSH-ZAMIN et al., 2011).

Na literatura encontram-se poucos relatos de ocorrência do gênero *Acinetobacter* em abacaxizeiros (ESPOSITO-POLESI et al., 2017), e além disso, não foram encontrados estudos referentes à aplicação de bactérias desse gênero, bem como de *Citrobacter* e *Enterobacter* em abacaxizeiros com a finalidade de promoção do crescimento.

O gênero *Citrobacter* é citado na literatura, em variados estudos, relacionado à espécies causadoras de patologias em humanos (LIYUN et al., 2018; WARD et al., 2021), assim como o gênero *Enterobacter* (MASHALY et al., 2021; PRUSAKOV et al., 2021), no entanto, a essas bactérias também podem ser atribuídas outras finalidades (HAYAT et al., 2010). Ambos os gêneros citados pertencem a família Enterobacteriaceae, e são bactérias diazotróficas com atividades de promoção de crescimento (KENNEDY et al., 2004).

Dentre as atividades diretamente relacionadas à promoção do crescimento por bactérias do gênero *Enterobacter*, encontram-se a solubilização de fósforo no solo, fixação do nitrogênio, produção de antibióticos, entre outras. Estas competências podem torná-las adequadas ao uso para o crescimento de plantas. Além disso, cepas de *Enterobacter* já foram desenvolvidas comercialmente como promotores de crescimento de plantas e agentes de biocontrole (JHA et al., 2011)

Aplicação de bactérias testadas individualmente em abacaxizeiros 'BRS Imperial' cultivados em vasos

No presente estudo foi realizado um bioensaio, a partir do uso de bactérias endofíticas e de solo associadas ao microbioma de *Ananas* spp., testadas individualmente quanto à sua capacidade na promoção de crescimento em abacaxizeiros 'BRS Imperial' cultivados em vasos. No microbioma de *Ananas* existem grupos diversos de endófitos bacterianos cultiváveis, bem como bactérias

de solo rizosférico (SOUZA et al., 2019) e esses grupos bacterianos apresentaram respostas variadas para as diferentes variáveis de crescimento.

As diferentes respostas observadas para cada tratamento em virtude das variáveis analisadas podem ser atribuídas ao fato de que os microrganismos utilizados, pertencem a diferentes gêneros, e esses podem estar envolvidos em diversas atividades no solo ou na planta, devido à especificidade de cada um.

De acordo aos resultados obtidos nesse estudo, foi observado que para cada variável analisada, diferentes tratamentos se destacaram, mostrando a capacidade de promoção de crescimento para variáveis específicas. No entanto, quando considerados os boxplots formados em função da análise realizada para os tratamentos 90 dias após a aplicação das bactérias é possível identificar tratamentos que foram eficientes na promoção de todas as variáveis de crescimento, a exemplo do BAC406, filogeneticamente relacionado à *Acinetobacter calcoaceticus*. Os tratamentos BAC298 (*Citrobacter*), BAC40 (*Exiguobacterium*), BAC226 (*Enterobacter*), BAC222 (Gênero não identificado) e BAC45 (*Acinetobacter*) promoveram o crescimento de três das quatro variáveis estudadas. Os outros tratamentos promoveram crescimento de duas ou apenas uma das variáveis. O tratamento BAC45 além da promoção de crescimento observada para o diâmetro da copa, número de folhas e largura da folha D, também foi eficiente em promover incremento na biomassa das raízes.

Quando observadas as taxas de crescimento que consideram a avaliação final menos a inicial, é possível verificar que houve incremento na promoção do crescimento para todos os tratamentos, em pelo menos uma das variáveis adotadas, com destaque para BAC400 (Gênero não identificado) e BAC47 (*Arthrobacter*) que promoveram incremento no crescimento para todas as variáveis analisadas. Foi observado ainda que os tratamentos BAC54, BAC45, BAC222, BAC223, BAC272, BAC226, BAC40, BAC388, BAC267 e BAC210 foram eficientes na promoção de três das quatro variáveis, já o BAC406, BAC298 e BAC26 duas variáveis e BAC381 juntamente com o BAC219 apenas uma. Esses resultados mostram que as bactérias testadas conseguiram colonizar e estabelecer interações benéficas com as plantas.

Todas as bactérias testadas neste estudo pertencem a gêneros bacterianos que já foram relatados na literatura em diversos trabalhos com a capacidade de promoção de crescimento de plantas, como *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, já citadas anteriormente e também *Bacillus* e *Exiguobacterium*. Bactérias do gênero *Bacillus* são amplamente utilizadas, desde o seu uso no controle biológico de patógenos de plantas (BRANDI et al., 2018; FIRA et al., 2018), à sua utilização como agentes promotores de crescimento de plantas para as diversas espécies agrícolas (BEN et al., 2018).

O gênero *Exiguobacterium* tem se destacado em diversas pesquisas na agricultura, meio ambiente e indústria (KASANA; PANDEY, 2018). Alguns isolados possuem capacidade de promoção de crescimento de plantas (KUMAR; VERMA, 2018), e atualmente estão sendo explorados para aumentar a produção agrícola. Foi também relatada melhora na germinação e nos parâmetros iniciais de crescimento de diferentes espécies de plantas em condições de cultivo em vaso (ZHANG et al., 2013), como no presente estudo.

Estudos envolvendo a seleção e estabelecimento das diversas espécies de bactérias benéficas, bem como seu modo de atuação e substâncias ativas, ajudarão na formulação de biofertilizantes para aplicação em produções agrícolas.

Os isolados mostraram grande potencial de uso para a cultura do abacaxizeiro como promotores de crescimento. Todas as bactérias associadas a *Ananas* spp. foram capazes de promover o crescimento até certo grau, durante o desenvolvimento das plantas, melhorando significativamente os parâmetros de crescimento. Essas informações podem ser de grande valia para condução de estudos futuros e possíveis aplicações destes isolados como biofertilizantes a fim de melhorar os resultados obtidos em campo com o plantio de mudas de abacaxizeiros.

Esses resultados demonstraram a importância da utilização dos microrganismos associados ao gênero *Ananas*, os quais poderão ser explorados a fim de promoverem o crescimento de plantas e possivelmente aumentar a sua produtividade. Promover o crescimento das plantas por meio do aproveitamento do microbioma do solo possui um enorme potencial para fornecer uma solução ambientalmente correta para as crescentes demandas de alimentos.

Portanto, pesquisas adicionais sobre as interações dinâmicas entre as plantas cultivadas, o microbioma associado e o meio ambiente são necessárias para melhor orientar o aproveitamento do microbioma visando aumentar o rendimento e a qualidade das culturas.

CONCLUSÕES

- O tratamento BECPAC promoveu o crescimento das plantas em canteiro e promoveu aumento de biomassa da parte aérea e raízes em canteiro;
- A combinação dos mixes BECPAC com BASAC reduziu o crescimento de abacaxizeiros 'BRS Imperial' em canteiro;
- O tratamento BAC406 promoveu o crescimento das plantas para todas as variáveis analisadas aos 90 dias;
- O tratamento BAC45 além da promoção de crescimento observada para o diâmetro da copa, número de folhas e largura da folha D, também foi eficiente em promover incremento na biomassa das raízes aos 90 dias;
- Para as taxas de crescimento os tratamentos BAC400 e BAC47 promoveram incremento no crescimento para todas as variáveis analisadas.

REFERÊNCIAS

BEN, F.; CONG, W.; XIAOFENG, S.; XIAOLEI, D.; LIMING, W.; HUIJUN, W.; XUEWEN, G.; RAINER, B. *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The Gram-Positive Model Strain for Plant Growth Promotion and Biocontrol. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2491, 2018.

BERG, G.; RYBAKOVA, D.; GRUBE, M.; KÖBERL, M. The plant microbiome explored: implications for experimental botany. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, p. 995–1002, 2016.

BERNAL, P.; ALLSOPP, L.P.; FILLOUX, A.; LLAMAS, M. A. The *Pseudomonas putida* T6SS is a plantwarden against phytopathogens. **ISME J.**, v. 11, p.972-987, 2017.

BRANDI, F.; HECK, D. W.; FERREIRA, T. C.; BETTIOL, w. Commercial formulations of *Bacillus* spp. for sugarcane pineapple disease control and growth promotion. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 53, n.12, p.1311-1319, 2018.

CALVO, P.; NELSON, L.; KLOEPPER, J. W. Agricultural uses of plant biostimulants. **Plant and Soil**, v. 383, p. 3-41, 2014.

DIAS, M. P.; BASTOS, M. S.; XAVIER, V. B.; CASSEL, E.; ASTARITA, L. V.; SANTARÉM, E. R. Plant growth and resistance promoted by *Streptomyces* spp. in tomato. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 118, p. 479-493, 2017.

EKIN, Z. Integrated Use of Humic Acid and Plant Growth Promoting Rhizobacteria to Ensure Higher Potato Productivity in Sustainable Agriculture. **Sustainability**, v. 11, p. 3417, 2019.

ESPOSITO-POLESI, N. P.; ABREU-TARAZI, M. F.; ALMEIDA, C. V.; TSAI, S. M.; ALMEIDA, M. Investigation of Endophytic Bacterial Community in Supposedly

Axenic Cultures of Pineapple and Orchids with Evidence on Abundant Intracellular Bacteria. **Curr Microbiol**, v. 74, p. 103-113, 2017.

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

FIRA, D.; DIMKIĆ, I.; BERIĆ, T.; LOZO, J.; STANKOVIĆ, S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. **Journal of Biotechnology**, v. 285, p. 44-55, 2018.

FU, L.; PENTON, C. R.; RUAN, Y.; SHEN, Z.; XUE, C.; LI, R.; SHEN, Q. Inducing the rhizosphere microbiome by biofertilizer application to suppress banana Fusarium wilt disease. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 104, p. 39-48, 2017.

GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiol Res**. v. 169, p. 30-39, 2014.

HAYAT, R.; ALI, S.; AMARA, U. et al. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals Microbiology**, v. 60, p. 579-598, 2010.

HARTMANN, A.; FISCHER, D.; KINZEL, L.; CHOWDHURY, S. P.; HOFMANN, A.; BALDANI, J. I.; ROTHBALLER, M. Assessment of the structural and functional diversities of plant microbiota: Achievements and challenges – A review, **Journal of Advanced Research**, v. 19, p. 3-13, 2019.

HU, J.; WEI, Z.; FRIMAN, V. P.; GU, S. H.; WANG, X. F.; EISENHAUER, N.; YANG, T. J.; MA, J.; SHEN, Q. R.; XU, Y.; JOUSSET, C. A. Probiotic diversity enhances rhizosphere microbiome function and plant disease suppression. **mBio**, v. 7, p. e01790-16, 2016.

JHA, C. K.; AERON, A.; PATEL, B. V.; MAHESHWARI, D. K.; SARAF, M. *Enterobacter*. Role in Plant Growth Promotion. In: Maheshwari D. (eds)

Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses. Springer, Berlin, Heidelberg, 2011.

KANG, S.-M.; JOO, G.-J.; HAMAYUN, M.; NA, C.-I.; SHIN, D.-H.; KIM, H. Y.; HONG, J.-K.; LEE, I.-J. Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 277–281, 2009.

KASANA, R. C.; PANDEY, C. B. *Exiguobacterium*: an overview of a versatile genus with potential in industry and agriculture. **Critical Reviews Biotechnology**, v. 38, p. 141-156, 2018.

KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A. I. M. A.; KECSKES, M. L. Non-Symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n. 8, p. 1229-1244, 2004.

KUMAR, A.; VERMA, J. P. Does plant-Microbe interaction confer stress tolerance in plants: a review? **Microbiological Research**, v. 207, p. 41-52, 2018.

LIYUN, L.; DAOLI, C.; LIQIN, L.; RUITING, L.; SHUAI, H.; WENJIE, J.; HUI, S.; YITING, W.; YING, L.; JIANGUO, X. Genetic Diversity, Multidrug Resistance, and Virulence of *Citrobacter freundii* From Diarrheal Patients and Healthy Individuals. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 233, 2018.

LUGTENBERG, B. Principles of plant-microbe interactions: microbes for sustainable agriculture. Springer International Publishing, Switzerland, 2015.

MASHALY, G. E.-S.; MASHALY, M. E.-S. Colistin-heteroresistance in carbapenemase-producing *Enterobacter* species causing hospital-acquired infections among Egyptian patients. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 24, p. 108-113, 2021.

MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJMAKERS, M. J. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 634–663, 2013.

OLANREWAJU, O. S.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 33, p. 197, 2017.

PRUSAKOV, P.; GOFF, D. A.; WOZNIAK, P. S. et al. A global point prevalence survey of antimicrobial use in neonatal intensive care units: The no-more-antibiotics and resistance (NO-MAS-R) study. **EClinicalMedicine**, v. 32, 100727, 2021.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing, **R Foundation for Statistical Computing**. Vienna, Austria, 2017, (<https://www.r-project.org/>). Accessed on 18/10/2018.

ROKHBAKHSH-ZAMIN, F.; SACHDEV, D.; KAZEMI-POUR, N.; ENGINEER, A.; PARDESI, K. R.; ZINJARDE, S.; DHAKEPHALKAR, P. K.; CHOPADE, B. A. Characterization of Plant-Growth-Promoting Traits of *Acinetobacter* Species Isolated from Rhizosphere of *Pennisetum glaucum*. **Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 21, n.6, p. 556–566, 2011.

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

SUN, B.; BAI, Z.; BAO, L.; XUE, L.; ZHANG, S.; WEI, Y.; ZHANG, Z.; ZHUANG, G.; ZHUANG, X. *Bacillus subtilis* biofertilizer mitigating agricultural ammonia emission and shifting soil nitrogen cycling microbiomes. **Environment International**, v. 144, 105989, 2020.

WALITANG, D. I., KIM, K., MADHAIYAN, M. et al. Characterizing endophytic competence and plant growth promotion of bacterial endophytes inhabiting the seed endosphere of Rice. **BMC Microbiol**, v. 17, p. 209 2017.

WARD, H. H.; LAUBER, P.; LAUBACH, L. T.; FISHBEIN, J.; GREENBERG, M. R. *Citrobacter koseri* meningitis with cerebral edema and pneumocephalus in a neonate. **Radiology Case Reports**, v. 16, p. 528-530, 2021.

WU, S.; ZHUANG, G.; BAI, Z.; CEN, Y.; XU, S.; SUN, H.; HAN, X.; ZHUANG, X. Mitigation of nitrous oxide emissions from acidic soils by *Bacillus amyloliquefaciens*, a plant growth-promoting bacterium. **Global Change Biology**, v. 24, p. 2352-2365, 2018.

ZHANG, F.; XU, X.; WANG, G.; WU, B.; XIAO, Y. Medicago sativa and soil microbiome responses to Trichoderma as a biofertilizer in alkaline-saline soils. **Applied Soil Ecology**, v. 153, 103573, 2020.

ZHANG, J.; COOK, J.; NEARING, J. T.; ZHANG, J. RAUDONIS, R.; GLICK, B. R.; LANGILLE, MORGAN G. I.; CHENG, ZHENYU. Harnessing the plant microbiome to promote the growth of agricultural crops. **Microbiological Research**, v. 245, 126690, 2021.

ZHANG, Y.; SHI, P.; MA, J., *Exiguobacterium* spp. and their applications in environmental remediation. **Chinese Journal of Applied & Environmental Biology**, v. 19, p. 898-904, 2013.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As plantas vivem em associação com uma grande variedade de microrganismos, e a fim de entender como essas relações se estabelecem, os pesquisadores tem se dedicado em inúmeros estudos sobre a composição dos microbiomas nos diferentes ambientes e relacionados a diferentes culturas, bem como as suas funções e os fatores que influenciam na composição e dinâmica dos microbiomas nas plantas e no solo. No entanto, apesar dos inúmeros estudos, ainda há muito a ser descoberto e entendido. E, com a finalidade de ampliar esse conhecimento esse estudo foi realizado.

No presente trabalho foi observado como os diferentes ambientes influenciam na composição e dinâmica dos microbiomas dos compartimentos das plantas e também dos solos rizosféricos, apesar disso as plantas compartilham em certo grau alguns grupos específicos de microrganismos. Além disso, foi visto como os microrganismos associados ao gênero *Ananas* podem ser utilizados em benefício da cultura do abacaxizeiro.

Finalmente, todas as informações obtidas nesse trabalho são relevantes e promissoras, e poderão ser utilizadas a fim de melhorar o cultivo do abacaxizeiro, considerando uma nova abordagem de plantio, que é sustentável, através da manipulação e uso dos microbiomas em benefício da cultura.