

ESTRUTURA E FISIOLOGIA DA INTERAÇÃO ENTRE BACTÉRIAS  
DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS E EPIFÍTICAS COM  
ABACAXIZEIRO CULTIVAR VITÓRIA DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO

**LÍLIAN ESTRELA BORGES BALDOTTO**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

AGOSTO – 2009

**ESTRUTURA E FISIOLOGIA DA INTERAÇÃO ENTRE BACTÉRIAS  
DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS E EPIFÍTICAS COM  
ABACAXIZEIRO CULTIVAR VITÓRIA DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO**

**LÍLIAN ESTRELA BORGES BALDOTTO**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Doutor em Genética e Melhoramento  
de Plantas.

Orientador: Prof. Ricardo Bressan-Smith

Co-orientador: Prof. Fábio Lopes Olivares

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

AGOSTO – 2009

ESTRUTURA E FISIOLOGIA DA INTERAÇÃO ENTRE BACTÉRIAS  
DIAZOTRÓFICAS ENDOFÍTICAS E EPIFÍTICAS COM ABACAXIZEIRO  
CULTIVAR VITÓRIA DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO

**LÍLIAN ESTRELA BORGES BALDOTTO**

Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade  
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
como parte das exigências para obtenção do  
título de Doutor em Genética e Melhoramento  
de Plantas.

Aprovada em 20 de Agosto de 2009.

Comissão Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Patricia Noemi Piccoli (Doutora, Ciências Biológicas) –  
Universidad Nacional de Cuyo (UNCuyo)

---

Prof. Celso Valdevino Pommer (Doutor, Ciências) – UENF

---

Prof. Fábio Lopes Olivares (Doutor, Agronomia) – UENF  
(co-orientador)

---

Prof. Ricardo Bressan-Smith (Doutor, Fisiologia Vegetal) – UENF  
(orientador)

## AGRADECIMENTOS

Ao meu esposo Marihus, aos meus pais Antônio e Maeli e aos meus irmãos Lavínia e Leonardo, pelo apoio, incentivo, confiança e carinho, dedico esse trabalho.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, agradeço pela oportunidade de realização do doutoramento. Em especial, aos professores, funcionários e colegas do Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV) e do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT).

Aos Professores Ricardo Bressan-Smith (LMGV) e Fábio Lopes Olivares (LBCT), pela orientação e ensinamentos nesses anos de convívio.

Ao Prof. Alexandre Pio Viana (LMGV), pelos conselhos e auxílio na realização das análises multivariadas.

Ao Prof. Marihus Altoé Baldotto (Laboratório de solos, LSOL), pela colaboração durante todo o trabalho e, em especial, pelo auxílio nas análises estatísticas por contraste e análises de regressão.

Ao Prof. Pedro Henrique Monnerat (Laboratório de Fitotecnia, LFIT) e ao técnico José Acácio da Silva (LFIT), pela colaboração nas análises nutricionais.

Ao Prof. Gonçalo Apolinário de Souza Filho, à Dr<sup>a</sup>. Adriane Nunes de Souza e à técnica Valéria (GENOMA), pela colaboração nas análises de sequenciamento genético.

Ao Prof. Luciano Pasqualoto Canellas (LSOL), pelas críticas e sugestões na redação dos artigos científicas sobre ácidos húmicos.

À Prof<sup>a</sup>. Virgínia Silva Carvalho (LFIT) e ao Prof. Paulo Henrique Aragão Catunda (UEMA), pelas dicas em propagação de abacaxizeiro *in vitro*.

À Prof<sup>a</sup>. Lúcia Helena Boddey (LBCT) e ao Prof. Erineudo de Lima Canuto, por todos os auxílios e amizade.

À todos os colegas e técnicos que colaboraram nos trabalhos laboratoriais ou na coleta dos experimentos, em especial: Validoro, Karol, Gonzaga, Vanessa, Suellen, Manuella, Anderson, Robertinho, Adrianinha, Giovana e Beatriz.

À todos que cederam materiais para a realização desse trabalho. Ao Laboratório Biomudas e ao Sr. Marcos Athayde, pelo fornecimento das mudas *in vitro* do abacaxizeiro 'Vitória'. Ao Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa e à Dr<sup>a</sup>. Rose Adele Monteiro (UFPR), por cederem a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* RAM10. Ao Dr. Alexandre Cattelan (Embrapa Soja), por ceder a *Pseudomonas* sp. Ao M.Sc. Vicente Mussi-Dias (Clínica Fitossanitária, UENF), por ceder o fungo *Fusarium*.

Aos membros da comissão examinadora do projeto da tese, Prof<sup>a</sup>. Cláudia Sales Marinho (LFIT), Prof. Alexandre Pio Viana e Prof. Fábio Lopes Olivares; aos membros da comissão examinadora da tese, Prof. Celso Valdevino Pommer (LMGV), Prof<sup>a</sup>. Patrícia Noemi Picolli (UNCuyo, Argentina) e Prof. Fábio Lopes Olivares, por todas as críticas e sugestões.

A todos os colegas e alunos do Pré-Vestibular Teorema UENF e do Centro de Ciências e Educação Superior a Distância do Estado do Rio de Janeiro (CEDERJ), pelo apoio e amizade durante esses anos de trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro e à Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, pela bolsa concedida.

## SUMÁRIO

Resumo.....	vii
Abstract.....	ix
1. Introdução.....	1
2. Revisão de Literatura.....	4
2.1. A Cultura do abacaxizeiro.....	4
2.1.1. Origem e classificação botânica.....	4
2.1.2. Métodos de propagação.....	6
2.1.3. Aspectos nutricionais.....	8
2.2. Bactérias promotoras de crescimento e proteção de plantas.....	10
2.3. Inoculantes e biofertilizantes.....	11
2.4. Bioatividade dos ácidos húmicos.....	13
3.Trabalhos.....	15
SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO NO ABACAXIZEIRO 'VITÓRIA' DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO.....	15
Resumo.....	15
Summary.....	16
Introdução.....	17
Material e Métodos.....	18
Resultados.....	23
Discussão.....	25
Conclusões.....	27

Agradecimentos.....	28
Literatura citada.....	29
CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA INTERAÇÃO ENTRE A BACTÉRIA ENDOFÍTICA <i>Herbaspirillum seropedicae</i> RAM10 E PLÂNTULAS DE ABACAXIZEIRO DA CULTIVAR VITÓRIA.....	41
Resumo.....	41
Summary.....	42
Introdução.....	43
Material e Métodos.....	45
Resultados.....	47
Discussão.....	50
Conclusões.....	52
Agradecimentos.....	53
Literatura citada.....	53
DESEMPENHO DO ABACAXIZEIRO 'VITÓRIA' EM RESPOSTA À APLICAÇÃO DE ÁCIDOS HÚMICOS DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO.....	66
Resumo.....	66
Summary.....	67
Introdução.....	67
Material e Métodos.....	69
Resultados.....	72
Discussão.....	74
Conclusões.....	76
Agradecimentos.....	76
Literatura citada.....	77
PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DO ABACAXIZEIRO 'VITÓRIA' PELO USO CONJUNTO DE ÁCIDO HÚMICO E <i>Burkholderia spp.</i> DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO.....	90
Resumo.....	90
Summary.....	91
Introdução.....	92
Material e Métodos.....	93
Resultados.....	96
Discussão.....	97

Conclusões.....	100
Agradecimentos.....	101
Literatura citada.....	101
4. Resumo e Conclusões.....	111
5. Referências Bibliográficas.....	113
6. Apêndices.....	124
Apêndice A - Capítulo 1.....	125
Apêndice B - Capítulo 3.....	131
Apêndice C - Capítulo 4.....	134

## RESUMO

BALDOTTO, Lílian Estrela Borges; D.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Agosto de 2009; CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FISIOLÓGICA DA INTERAÇÃO ENTRE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EPIFÍTICAS E ENDOFÍTICAS COM ABACAXIZEIRO CULTIVAR VITÓRIA DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO; Orientador: Prof. Ricardo Bressan-Smith; Co-orientador: Prof. Fábio Lopes Olivares; Conselheiro: Prof. Alexandre Pio Viana.

Apesar das vantagens de produção de mudas saudáveis e uniformes de abacaxizeiro por propagação *in vitro*, a necessidade de um longo período de aclimatização onera essa prática agrícola. A inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas e epifíticas em conjunto com ácidos húmicos poderia ser uma estratégia viável na aclimatização de abacaxizeiros, tendo em vista o potencial de promoção de crescimento e de melhoria na eficiência de uso de nutrientes, diminuindo o tempo necessário para a transferência das mudas para as condições de campo. Os objetivos neste trabalho foram: (i) avaliar o potencial de 20 estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas ou epifíticas em solubilizar fosfato de cálcio e óxido de zinco, sintetizar compostos indólicos e possuírem atividade antagônica ao fungo *Fusarium subglutinans f. sp. ananas*, em ensaios *in vitro*; (ii) avaliar o crescimento da planta e o conteúdo de nutrientes foliares do abacaxizeiro 'Vitória' em resposta à inoculação bacteriana durante a aclimatização e, posteriormente, selecionar as estirpes promissoras para programas de desenvolvimento de inoculantes e biofertilizantes; (iii) caracterizar estruturalmente a interação entre a bactéria marcada com *gfp Herbaspirillum seropedicae* RAM10 e plântulas do abacaxizeiro 'Vitória'; (iv) avaliar as características anatômicas da lâmina foliar, o teor de pigmentos fotossintéticos, o crescimento da planta e o acúmulo de nutrientes foliares do abacaxizeiro 'Vitória' em resposta à aplicação de diferentes doses de

ácidos húmicos isolados de vermicomposto e de torta de filtro durante a aclimatização; (v) avaliar o crescimento da planta e o acúmulo de nutrientes foliares do abacaxizeiro 'Vitória' em resposta à aplicação conjunta de ácido húmico de vermicomposto e bactérias promotoras de crescimento selecionadas (*Burkholderia spp.*) durante a aclimatização. As bactérias diazotróficas diferiram na capacidade de sintetizar indol, solubilizar óxido de zinco e fosfato de cálcio e atuar antagonicamente ao *Fusarium*. Com auxílio da análise multivariada, foi possível diferenciar os tratamentos e gerar critérios para selecionar as estirpes promissoras (UENF 118503b, UENF 118503a, UENF 117221 e UENF 114111) com base nas características de crescimento e nutricionais do abacaxizeiro 'Vitória'. Os passos da interação entre a bactéria diazotrófica endofítica *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 e o abacaxizeiro 'Vitória' foram caracterizados por meio de microscopia ótica de campo claro, microscopia de fluorescência e microscopia eletrônica de varredura: 1) colonização epifítica nas raízes sob os pêlos e nas junções das células epidérmicas, na parte aérea nas flanges cuticulares, tricomas, complexos estomáticos; 2) penetração radicular através das cavidades formadas pelo rompimento das células epidérmicas durante a emergência de raízes laterais, na parte aérea através dos ostíolos; 3) colonização endofítica nas raízes nos espaços intercelulares do parênquima cortical, na parte aérea nas câmaras sub-estomáticas e espaços intercelulares do parênquima clorofiliano; 4) formação de biofilmes no rizopiano e filopiano. O ácido húmico isolado de vermicomposto se mostrou mais bioativo do que o de torta de filtro, uma vez que promoveu incrementos no crescimento, no acúmulo de nutrientes e na relação clorofila *a* / clorofila *b* do abacaxizeiro 'Vitória' com menor dose aplicada (15 mmol L<sup>-1</sup> de C). O uso conjunto de ácido húmico de vermicomposto e bactérias selecionadas (*Burkholderia spp.*) promoveram os maiores incrementos no crescimento da planta e nos conteúdos foliares de N, P, K, Ca e Mg do abacaxizeiro 'Vitória'. A promoção do crescimento das mudas de abacaxizeiro propagadas *in vitro* pela aplicação conjunta de bactérias selecionadas e ácidos húmicos pode melhorar a adaptação das plântulas ao ambiente *ex vitro*, reduzindo o período de aclimatização.

**Palavras-chave:** fruticultura, cultura de tecidos, nutrição mineral, bactérias promotoras de crescimento de plantas, proteína verde fluorescente, substâncias húmicas, inoculante.

## ABSTRACT

BALDOTTO, Lílian Estrela Borges; D.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, August 2009; STRUCTURAL AND PHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF THE INTERACTION OF EPIPHYTIC AND ENDOPHYTIC DIAZOTROPHIC BACTERIA WITH PINEAPPLE CULTIVAR VITÓRIA DURING ACCLIMATIZATION; Adviser: Prof. Ricardo Bressan-Smith; Co-adviser: Prof. Fábio Lopes Olivares; Committee member: Prof. Alexandre Pio Viana.

Despite the advantages of the healthy, uniform pineapple plantlets produced *in vitro*, this agricultural practice is rather costly due to the long acclimatization period. The inoculation of diazotrophic endophytic and epiphytic bacteria combined with humic acids could be a viable strategy for a better pineapple acclimatization, in view of the potential to promote growth and enhance nutrient uptake efficiency, reducing the time until the plantlets can be transferred to the field. The objectives of this study were to (i) evaluate the potential of 20 diazotrophic endophytic and epiphytic bacteria strains in terms of solubilizing calcium phosphate and zinc oxide, synthesize indoles and be antagonistic to *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas*, in *in vitro* tests, (ii) evaluate plant growth and leaf nutrient contents of 'Vitória' pineapple in response to bacterial inoculation during acclimatization and then select promising strains for inoculant and biofertilizer programs, (iii) structurally characterize the interaction of bacteria with GFP-marked *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 and 'Vitória' pineapple plantlets, (iv) evaluate the anatomical leaf characteristics, photosynthetic pigment content, plant growth and foliar nutrient accumulation in 'Vitória' pineapple in response to the application of different doses of humic acids isolated from vermicompost and filter cake during acclimatization, (v) evaluate plant growth and leaf nutrient

accumulation of 'Vitória' pineapple in response to the combined application of humic acid from vermicompost and selected growth-promoting bacteria (*Burkholderia* spp.) during acclimatization. The diazotrophic bacteria differed in their ability to synthesize indole, solubilize zinc oxide and calcium phosphate and to be antagonistic to *Fusarium*. The treatments could be differentiated by multivariate analysis and criteria were established to select promising strains (UENF 118503b, UENF 118503a, UENF 117221, and UENF 114111), based on the growth and nutrient characteristics of the pineapple 'Vitória'. The steps of the interaction between the diazotrophic endophytic bacterium *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 and pineapple 'Vitória' were characterized by bright-field microscopy, fluorescence microscopy and scanning electron microscopy: 1) epiphytic root colonization under the hairs and junctions of epidermal cells; in the junctions of epidermal cells, trichomes and stomatal complexes of shoots, 2) root penetration through the cavities formed by the disruption of the epidermal cells during the emergence of lateral roots; in the shoot through the ostia, 3) endophytic root colonization in the intercellular spaces of the cortical parenchyma; foliar colonization in the sub-stomatal chambers and intercellular spaces of the chlorophyll parenchyma, 4) formation of biofilms on the rhizoplane and phylloplane. Humic acid isolated from vermicompost was more bioactive than filter cake, since it promoted increases in growth, nutrient uptake and the ratio chlorophyll a / chlorophyll b in pineapple 'Vitória' even at the lowest rate (15 mmol L<sup>-1</sup> C). The combined use of vermicompost humic acid and selected bacteria (*Burkholderia* spp.) resulted in the greatest increases in plant growth and highest foliar contents of N, P, K, Ca and Mg in pineapple 'vitória'. The growth of *in vitro* pineapple plants can be promoted by application of selected bacteria and humic acids to improve the adaptation of plantlets to *ex vitro* conditions, reducing the acclimatization period.

**Keywords:** fruit culture, tissue culture, mineral nutrition, plant growth-promoting bacteria, green fluorescent protein, humic substances, inoculant.

## 1. INTRODUÇÃO

A fruticultura representa um setor estratégico do agronegócio brasileiro, com um superávit de US\$ 267 milhões em 2003 (MAPA, 2009), gerando empregos por todo país. Dentre as frutas tropicais, o abacaxi se destaca, não apenas pelo aroma e sabor acentuado, apreciado em todo o mundo, mas também pela rentabilidade da cultura. Em 2007, o rendimento da abacaxicultura brasileira foi de 24.820 frutos por hectare, com uma área colhida de 71.886 hectares (IBGE, 2009).

Dentre os principais entraves para a contínua expansão da abacaxicultura, está a escassez de mudas isentas de pragas e doenças e de tamanho homogêneo. Como alternativa, a propagação *in vitro* do abacaxizeiro já está bem estabelecida (Teixeira et al., 2001), resultando na produção de uma maior quantidade de propágulos saudáveis e uniformes em um espaço reduzido. No entanto, a produção de mudas de abacaxizeiro *in vitro* ainda não é realizada comercialmente em grande escala, devido, entre outros fatores, ao longo período necessário de aclimatização.

O período de aclimatização do abacaxizeiro é considerado crítico devido à lentidão do crescimento do sistema radicular e da parte aérea, ao menor espessamento da cutícula e das paredes periclinais externas das células epidérmicas e menor densidade estomática (Barboza et al., 2006). A redução da umidade do ar e da disponibilidade de nutrientes durante a aclimatização são

também componentes limitantes para o abacaxizeiro, aumentando sua susceptibilidade a variações ambientais drásticas e ao ataque de pragas.

Nesse contexto, a elucidação dos mecanismos estruturais e fisiológicos da interação entre bactérias endofíticas e epifíticas com o abacaxizeiro é almejada, pois esses microrganismos podem promover o crescimento e proteção vegetal por meio de diferentes ações como, por exemplo, pela fixação biológica de nitrogênio, produção de fitohormônios, solubilização de fosfatos e ação antagônica a patógenos (Sturz et al., 2000). Logo, a inoculação de bactérias promotoras de crescimento e proteção vegetal em mudas propagadas *in vitro* de abacaxizeiro poderia acelerar o crescimento da planta e proporcionar a diminuição do período de aclimatização.

Além disso, nas regiões de clima tropical, a agricultura apresenta fatores limitantes como a baixa disponibilidade natural de N e P nos solos. O conhecimento da associação entre plantas e bactérias que possam solubilizar e disponibilizar esses nutrientes auxiliará no desenvolvimento de sistemas de manejo mais sustentáveis, já que a obtenção destes insumos necessita um alto gasto energético ou de jazidas não renováveis.

Nessa direção, a formulação de inoculantes e biofertilizantes contendo bactérias selecionadas para promoção de crescimento e proteção de plantas, em conjunto com frações bioativas de matéria orgânica na forma de ácidos húmicos, pode ser uma alternativa para redução dos custos de produção com base na maior eficiência de crescimento e nutricional. Notadamente, os ácidos húmicos favorecem o crescimento das plantas, estimulando o desenvolvimento do sistema radicular e o acúmulo de nutrientes (Chen et al., 2004). Portanto, a possibilidade de agregar valor em propágulos de abacaxizeiro ao inoculá-los com estirpes selecionadas e ácidos húmicos, supostamente dotará a abacaxicultura de maior competitividade na produção e comercialização de seus produtos agrícolas.

Diante do exposto, no presente trabalho objetivou-se: (i) avaliar o potencial de 20 estirpes de bactérias diazotróficas em solubilizar fosfato de cálcio e óxido de zinco, sintetizar compostos indólicos, possuírem atividade antagônica ao fungo *Fusarium subglutinans f. sp. ananas*, em ensaios *in vitro*; (ii) avaliar o crescimento da planta e o conteúdo de nutrientes foliares do abacaxizeiro 'Vitória' em resposta à inoculação bacteriana durante a aclimatização e, posteriormente, selecionar as estirpes promissoras; (iii) caracterizar estruturalmente a interação entre a bactéria

marcada com *gfp Herbaspirillum seropedicae* RAM10 e plântulas do abacaxizeiro 'Vitória'; (iv) avaliar as características anatômicas da lâmina foliar, o teor de pigmentos fotossintéticos, o crescimento da planta e o acúmulo de nutrientes foliares do abacaxizeiro 'Vitória' em resposta à aplicação de diferentes doses de ácidos húmicos isolados de vermicomposto e de torta de filtro durante a aclimatização; (v) avaliar o crescimento da planta e o acúmulo de nutrientes foliares do abacaxizeiro 'Vitória' em resposta à aplicação conjunta de ácido húmico de vermicomposto e bactérias promotoras de crescimento selecionadas (*Burkholderia spp.*) durante a aclimatização.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A Cultura do abacaxizeiro

#### 2.1.1. Origem e classificação botânica

O abacaxizeiro é uma planta herbácea pertencente ao:

Reino Plantae;

Divisão Magnoliophyta;

Classe Liliopsida;

Ordem Poales;

Família Bromeliaceae;

Gênero *Ananas*;

Espécie *Ananas comosus* (L.) Merrill.

O centro de origem do gênero *Ananas* corresponde às regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, Norte da Argentina e do Paraguai, localizada na área entre 15 °N a 30 °S de latitude e 40 °L a 60 °W de longitude (Collins, 1960).

O Brasil é considerado um dos principais centros de diversidade genética do abacaxizeiro, pois todas as formas cultivadas e várias formas silvestres são encontradas em diferentes regiões brasileiras (Ferreira & Cabral, 1993). Apesar da variabilidade genética existente, a cultura do abacaxi se restringe a poucas cultivares, tornando a cultura vulnerável à ocorrência de fatores bióticos e abióticos adversos (Cabral et al., 1999).

As cultivares de abacaxizeiro mais plantadas no mundo estão reunidas nos grupos Cayenne, Spanish, Queen, Pernambuco e Perolera. Tais grupos se diferenciam principalmente em relação ao número de filhotes, comprimento das folhas, presença de espinhos, comprimento do pedúnculo, peso médio do fruto, coloração da polpa, teor de açúcar e acidez (Manica, 1999; D'Eeckenbrugge & Leal, 2003).

A cultivar Pérola, pertencente ao grupo Pernambuco, apresenta hábito de crescimento ereto, folhas com espinhos nos bordos, produz muitas mudas do tipo filhote. O seu fruto é cônico, com polpa branca, rica em açúcares e com acidez moderada. A cultivar Pérola é tolerante à murcha provocada por cochonilha (*Dysmicoccus brevipes*) (Cunha & Cabral, 1999).

A cultivar Smooth Cayenne, pertencente ao grupo Cayenne, apresenta porte semi-ereto, folhas sem espinho nos bordos, produz poucas mudas do tipo filhote. O seu fruto é cilíndrico, com polpa amarela, rica em açúcar e com acidez moderada. É sensível à murcha associada à cochonilha (Cunha & Cabral, 1999).

No Brasil, as cultivares mais plantadas são Pérola e Smooth Cayenne, ambas suscetíveis a fusariose, doença causada pelo fungo *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* (Ventura et al., 1993) e que representa o principal problema fitossanitário da abacaxicultura no país (Cunha & Cabral, 1999; Manica, 1999). O fato de as cultivares mais plantadas serem suscetíveis à fusariose e constituírem base genética estreita dificulta os programas de melhoramento (Py et al., 1984).

Para minimizar o problema da fusariose várias medidas têm sido estudadas como controle cultural, controle químico e o melhoramento genético visando resistência à fusariose. O uso de cultivares de abacaxizeiro resistentes é uma das alternativas mais viáveis para o controle da doença (Matos & Cabral, 1988; Matos et al., 1991).

A Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical começou, em 1984, um programa de melhoramento genético do abacaxizeiro visando desenvolver cultivares resistentes à fusariose com características comerciais. Foram selecionadas as variedades Perolera, Primavera e Roxo-de-tefé como parentais resistentes e cruzadas com as cultivares comerciais suscetíveis Pérola e Smooth Cayenne (Cabral, 1999). Como resultado desse trabalho, foi lançada, em 2003, a cultivar Imperial, híbrido resultante do cruzamento de Perolera (resistente) com Smooth Cayenne (suscetível, comercial). Esse genótipo resistente à fusariose,

não possui espinhos nos bordos da folha, facilitando o manejo pelos produtores, além de minimizar a ocorrência de ferimentos no contato entre plantas, que usualmente formam aberturas passíveis de penetração por patógenos. O seu fruto possui polpa amarela, com elevados teores de açúcar (Cabral & Matos, 2003).

Em 2006, a Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, em parceria com o Instituto Capixaba de Pesquisa Assistência Técnica e Extensão Rural, lançaram a cultivar Vitória, também resistente à fusariose e apresentando como características folhas sem espinhos, frutos cilíndricos com casca amarelada, polpa branca com elevado teor de açúcar e bom perfilhamento (INCAPER, 2006), caracteres promissores para aceitação por produtores e consumidores.

### **2.1.2. Métodos de propagação**

O sistema de reprodução do abacaxizeiro pode ser definido pela coexistência de um sistema sexual alógamo e funcional e de um sistema de propagação assexual dominante (Cabral et al., 1999). Logo, a propagação é predominantemente vegetativa e a propagação seminífera é restrita aos programas de melhoramento (Teixeira et al., 2001).

Para implantação dos abacaxizais, a propagação vegetativa ocorre por meio de mudas do tipo plântula (muda obtida a partir de gemas de seções do caule ou por cultura de tecidos), filhote (brotação do pedúnculo), filhote-rebentão (brotação da região da inserção do pedúnculo no caule), rebentão (brotação do caule) e coroa (brotação do ápice do fruto) (Reinhardt & Cunha, 1999; D'Eeckenbrugge & Leal, 2003).

A sanidade e uniformidade do material propagativo são fundamentais para o sucesso da cultura do abacaxi, pois evita a ocorrência de fusariose, fator limitante, que drasticamente reduz a produtividade e qualidade dos frutos (Reinhardt & Cunha, 1999; Teixeira et al., 2001). Com exceção das mudas propagadas por cultivo *in vitro*, todos os outros tipos de mudas apresentam difícil controle fitossanitário.

Dentro desse contexto, a produção de mudas de abacaxizeiro via cultura de tecidos é uma alternativa promissora para elevar a qualidade e a produtividade da abacaxicultura. Dentre as vantagens da produção de mudas *in vitro* de

abacaxizeiro, destacam-se: alto vigor e uniformidade das mudas, controle de pragas e doenças, mudas enraizadas e precisão no estabelecimento de cronogramas de produção e comercialização (Teixeira et al., 2001). No entanto, a propagação *in vitro* do abacaxizeiro ainda tem se demonstrado onerosa, devido à necessidade de instrumentos e infra-estrutura adequada, demanda por pessoal capacitado e, principalmente, ao longo período de aclimatização em casa de vegetação (Teixeira et al., 2001).

A metodologia de produção *in vitro* de mudas de abacaxizeiro já é bem estabelecida (Guerra et al., 1999; Teixeira et al., 2001; Almeida et al., 2002; Barboza et al., 2004) e pode ser resumida cronologicamente nas seguintes etapas: estabelecimento do estoque de plântulas a partir de gemas axilares (2 a 3 meses), multiplicação das gemas (3 a 5 meses), enraizamento (2 meses), aclimatização (6 a 8 meses), totalizando, em média, 13 a 18 meses (Teixeira et al., 2001).

O longo período de aclimatização é necessário, pois plantas crescidas *in vitro* de abacaxizeiro apresentam características anatômicas e fisiológicas desfavoráveis para enfrentar as condições edafoclimáticas no campo, como, por exemplo, metabolismo heterotrófico (Moreira, 2001), menor espessamento da cutícula e das paredes periclinais externas das células epidérmicas e menor densidade estomática (Barboza et al., 2006). Além disso, as condições de alta umidade e alto teor de nutrientes tornam as mudas suscetíveis ao ataque de pragas, patógenos e estresses abióticos. Portanto, o longo período de aclimatização representa um entrave à produção de mudas propagadas *in vitro* de abacaxizeiro. Estudos que visam traçar estratégias para reduzir tal período poderiam alavancar o uso comercial dessa tecnologia.

Diversos estudos têm sido realizados objetivando diminuir o período de aclimatização do abacaxizeiro, como o intuito de acelerar o crescimento da planta, como, por exemplo, aplicação foliar de macro e micronutrientes (Moreira et al., 2007; Bregonci et al., 2008), aplicação de reguladores de crescimento (Catunda et al., 2008), tipos de recipientes usados no enraizamento (Souza Júnior et al., 2001; Bregonci et al., 2008) e de substratos (Souza Júnior et al., 2001; Weber et al., 2003; Moreira et al., 2006; Catunda et al., 2008) e a inoculação de bactérias promotoras de crescimento e proteção vegetal (Mello et al., 2002; Weber et al., 2003).

O cultivo *in vitro* minimiza a ação de patógenos, mas também minimiza a ação da microbiota benéfica que auxilia no crescimento e proteção das plantas (Nowak et al., 1998). A seleção e reintrodução de isolados bacterianos endofíticos e epifíticos promotores de crescimento e proteção vegetal em mudas micropropagadas de abacaxizeiro pode se tornar uma alternativa viável para reduzir o período de aclimatização (Mello et al., 2002; Weber et al., 2003a; Weber et al., 2003b).

Weber et al. (2003b), por exemplo, verificaram que a inoculação de *Burkholderia cepacia* AB213 em plântulas de a cultivar Smooth Cayenne incrementou em 15 % a matéria seca da parte aérea. O efeito benéfico da associação entre bactéria e abacaxizeiro também foi verificado na interação entre a bactéria *Asaia bogorensis* e plântulas da cultivar Cayenne Champac. Após quatro meses de aclimatização os abacaxizeiros já estavam aptos para o transplante no campo (Weber et al., 2003a).

Mello et al. (2002) verificaram que a aplicação de uma mistura de isolados bacterianos endofíticos promoveu o aumento da biomassa de mudas micropropagadas da cultivar Pérola, também reduzindo o período de aclimatização.

### **2.1.3. Aspectos nutricionais**

O estado nutricional do abacaxizeiro tem grande influência no crescimento e desenvolvimento da planta e, conseqüentemente, na tolerância a fatores bióticos e abióticos, proporcionando incrementos na produtividade e qualidade dos frutos (Malézieux & Bartholomew, 2003).

A abacaxicultura é muito exigente em nutrientes quando comparada com outras culturas comerciais (Aquino et al., 1986). Em média, as quantidades de NPK extraídas pelo abacaxizeiro, considerando diferentes autores, são de 178 kg ha<sup>-1</sup> de N, 21 kg ha<sup>-1</sup> de P e 445 kg ha<sup>-1</sup> de K (Souza, 1999). As extrações de macronutrientes pelo abacaxizeiro, em ordem decrescente, são: K, N, Ca, Mg, S e P; dos micronutrientes: Mn, Fe, Zn, B, Cu e Mo (Malavolta, 1982; Souza, 1999).

N e K, os nutrientes mais exigidos pelo abacaxizeiro (Malavolta, 1982; Paula et al., 1998; Souza, 1999; Malézieux & Bartholomew, 2003; Ramos, 2006), influenciam, respectivamente, no tamanho e qualidade dos frutos (Souza, 1999).

Plantas com deficiência de N crescem lentamente, atrasam a floração, apresentam folhas estreitas, pequenas e em quantidade reduzida (Manica, 1999). Os frutos são menores (Gonçalves & Carvalho, 2000; Ramos, 2006), mais ácidos (Paula et al., 1998; Malézieux & Bartholomew, 2003) e podem apresentar descoloração da polpa (Ramos, 2006). Em situações extremas as plantas podem apresentar clorose generalizada e necrose no ápice das folhas mais velhas (Ramos, 2006).

A adubação é a forma dominante de fornecimento de N. No entanto, a presença de bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio, também denominadas bactérias diazotróficas, já foi relatada no abacaxizeiro (Weber, 1999; Tapia-Hernández et al., 2000). A otimização da interação entre bactérias diazotróficas e planta hospedeira pode proporcionar incrementos na produtividade, como já tem sido demonstrado para outras espécies vegetais (Boddey et al., 2003). A minimização da aplicação de adubos nitrogenados representa uma economia aos produtores e ao ambiente, uma vez que a produção desses insumos requer um alto gasto energético. Além disso, a adubação nitrogenada apresenta baixa eficiência, devido às perdas de N por lixiviação e volatilização.

Com relação ao P, nutriente mais limitante em solos tropicais (Leal & Velloso, 1973; Novais & Smyth, 1999), este apresenta importância, principalmente, na fase de diferenciação floral e no desenvolvimento do fruto (Souza, 1999). A deficiência de fósforo acarreta a formação de frutos pequenos, com coloração avermelhada (Gonçalves & Carvalho, 2000; Ramos, 2006). Quando a deficiência é muito severa pode não ocorrer formação de frutos, rebentos e filhotes e pode ocorrer clorose acentuada nas folhas mais velhas (Manica, 1999).

Os microrganismos atuam no ciclo do P de várias maneiras, como, por exemplo, por meio da solubilização de fosfatos (Nautiyal, 1999; Rodríguez & Fraga, 1999; Gyaneshwar et al., 2002). Bactérias solubilizadoras de fosfatos são almejadas como inoculantes visando a incrementos na produção vegetal (Rodríguez & Fraga, 1999; Vazquez et al., 2000; Gyaneshwar et al., 2002). Já foi demonstrada na literatura a relação entre bactérias solubilizadoras de fosfatos com a promoção de crescimento de plantas em diferentes interações, como por exemplo, *Rhizobium leguminosarum* em milho (Chabot et al., 1998), *Azotobacter*

*chroococcum* em trigo (Kumar & Narula, 1999) e *Pseudomonas fluorescens* em feijão (Katiyar & Goel, 2003).

## **2.2. Bactérias promotoras de crescimento e proteção de plantas**

As plantas podem ser consideradas microecossistemas complexos, possuindo diferentes habitats, explorados por bactérias benéficas, como as simbióticas, e por bactérias malélicas, como as fitopatogênicas.

Há mais de 50 anos, diversos trabalhos têm demonstrado que as bactérias presentes endofiticamente, no interior das plantas (Hallmann et al., 1997; Sturz et al., 2000; Lodewyckx et al., 2002), e epifiticamente, na superfície externa das plantas (Andrews & Harris, 2000; Baldotto & Olivares, 2008), podem ser isoladas de tecidos vegetais saudáveis, não estabelecendo de forma clara as interações simbióticas ou patogênicas.

Recentemente, foi constatado que essas bactérias podem proporcionar vários benefícios aos seus hospedeiros, tais como a promoção do crescimento e proteção vegetal, maior resistência a condições de estresse biótico e abiótico, além de apresentarem amplo potencial biotecnológico (Sturz et al., 2000; Whipps, 2001; Andrews & Harris, 2000; Zahir et al., 2003).

Os mecanismos de promoção de crescimento e proteção vegetal incluem ações diretas como a fixação biológica de nitrogênio (Baldani et al., 1997; Reis et al., 2000; Kennedy et al., 2004; KuKlinsky-Sobral et al., 2004), biossíntese de fitohormônios (Lucangeli & Bottini, 1997; Dobbelaere et al., 1999; Koenig et al., 2002; Patten et al., 2002; Arkhipova, 2005; Karadeniz et al., 2006), solubilização de fosfatos (Chabot et al., 1998; Kumar & Narula, 1999; Verma et al., 2001; Katiyar & Goel, 2003; KuKlinsky-Sobral et al., 2004), e ações indiretas como o controle biológico (May et al., 1997; Benhamoul et al., 1998; Kloepper et al., 1999; Alström, 2001; Siddiqui & Shaukat, 2003; Singh et al., 2004; Özaktan & Bora, 2004; Han et al., 2005; Byrne et al., 2005), produção de sideróforos (Lodewyckx et al., 2002) e indução de resistência sistêmica na planta hospedeira (Kloepper et al., 1999; Jetiyanon & Kloepper, 2002).

A biossíntese de fitohormônios, como auxinas, que atuam em diversos processos como alongamento celular, formação de raízes laterais, desenvolvimento de frutos (Taiz & Zeiger, 1991), já foi relatada em bactérias dos

gêneros *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chryseobacterium*, *Erwinia*, *Glucanacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Pantoea* e *Pseudomonas* (Patten & Glick, 1996; Fuentes-Raminrez et al., 1998; Bastián et al., 1998; Dobbelaere et al., 1999; Verma et al., 2001; Patten & Glick, 2002; Karadeniz et al., 2006; Tsavkelova, 2006), logo é um mecanismo amplamente distribuído em bactérias associadas às plantas.

Outro fator importante associado à presença de bactérias endofíticas e epifíticas é a solubilização de fosfatos, que já foi relatada em bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Azotobacter* e *Erwinia* (Goldstein et al., 1999; Rodriguez & Fraga, 1999; Rodriguez et al., 2000; Verma et al., 2001; Garg et al., 2001).

Alguns outros exemplos do uso de bactérias endofíticas e epifíticas na biotecnologia incluem a produção de antibióticos e outras moléculas bioativas (Sturz et al., 2000; Strobel, 2002). Tais mecanismos parecem estar intimamente relacionados aos efeitos antagônicos da microbiota benéfica contra os microrganismos patogênicos (Sturz et al., 2000). Adicionalmente, as bactérias endofíticas e epifíticas são aplicadas nos processos de bioremediação (Lodewyckx et al., 2002) e nas técnicas de transgenia (Baldani et al., 2002).

### **2.3. Inoculantes e biofertilizantes**

Bactérias endofíticas e epifíticas que promovem o crescimento e proteção de plantas podem, potencialmente, serem usadas nas formulações de inoculantes e biofertilizantes (Vessey, 2003; Bucher & Reis, 2008).

Segundo a legislação brasileira (Lei Nº 6.984 de 1980, regulamentada pelo Decreto Nº 4.954 de 2004), considera-se como inoculante o produto que contenha microrganismos com atuação favorável ao crescimento de plantas, entendendo-se como: (i) suporte: material excipiente e esterilizado, livres de contaminantes segundo os limites estabelecidos, que acompanha os microrganismos e tem a função de suportar ou nutrir, ou ambas as funções, o crescimento e a sobrevivência destes microrganismos, facilitando a sua aplicação; (ii) pureza do inoculante: ausência de qualquer tipo de microrganismo que não sejam os especificados. De acordo com o mesmo decreto, o termo biofertilizante se refere ao produto que contenha princípio ativo ou agente orgânico, isento de substâncias

agrotóxicas, capaz de atuar, direta ou indiretamente, sobre toda a planta ou parte das plantas cultivadas, elevando a sua produtividade, sem ter em conta o seu valor hormonal ou estimulante.

Atualmente, o termo biofertilizante está sendo empregado de forma generalizada para todos os microrganismos capazes de influenciar o desenvolvimento das plantas de forma positiva, incluindo os inoculantes de bactérias diazotróficas (Bucher & Reis, 2008). Segundo Bashan (1998), a crescente substituição do termo inoculante bacteriano por biofertilizante pode estar relacionada à maior facilidade de registro do produto para uso comercial.

Okon & Labandera-Gonzalez (1994) argumentam que o termo biofertilizante não pode ser utilizado para representar organismos rizosféricos que propiciam o acúmulo de nutrientes nas plantas, mas não repõem os nutrientes no solo. Vessey (2003), ao contrário, propõe o uso do termo biofertilizante para todas as substâncias que possuem organismos vivos, e que, quando aplicadas nas sementes, na superfície de plantas, ou no solo, colonizam a rizosfera ou o interior dos tecidos vegetais, promovendo o crescimento das plantas pelo aumento do suprimento ou disponibilidade de nutrientes.

A formulação de inoculantes e biofertilizantes deve levar em consideração várias características, tais como: uso de microrganismos competitivos, quantidade de células viáveis que permita a rápida colonização da planta, características físico-químicas uniformes, biodegradabilidade, facilidade de produção e manejo e a reprodutibilidade dos resultados e custos (Bashan, 1998; Daeker et al., 2004).

O principal obstáculo para a difusão do uso de inoculantes e biofertilizantes está na baixa reprodutibilidade dos resultados, devido, principalmente, à influência das condições edafo-climáticas, às interações com a biota do solo, à influência do suporte e forma de aplicação, e à escassez de programas de seleção de estirpes (Bucher & Reis, 2008). Por conta desses fatores, poucos produtos à base de bactérias promotoras de crescimento têm sido recomendados para plantas não leguminosas, restringindo-se, principalmente, aos produtos à base de estirpes do gênero *Azospirillum* (Okon & Labandera-Gonzalez, 1994; Okon & Itzigsohn, 1995). No Brasil, de forma inovadora, foi lançado em 2008, pela Embrapa Agrobiologia, o primeiro inoculante para cana-de-açúcar, contendo cinco estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas (*Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum*

*amazonense* e *Burkholderia tropica*) e tendo como suporte turfa estéril (Embrapa, 2009).

Dentro desse contexto, a formulação de inoculantes e/ou biofertilizantes contendo bactérias promotoras de crescimento e ácidos húmicos pode ser uma estratégia viável para aumentar a biomassa e produção das plantas cultivadas. Marques Júnior et al. (2008) constataram que a aplicação de inoculantes constituídos por bactérias promotoras de crescimento (*Herbaspirillum seropedicae*) e ácidos húmicos em microtoletes de cana-de-açúcar tratados termicamente resultou em incrementos na biomassa vegetal. Em abacaxizeiro, o uso dessa mesma tecnologia de aplicação conjunta de ácidos húmicos e bactérias promotoras de crescimento pode ser uma estratégia viável na aclimatização de plantas propagadas *in vitro*, buscando promover maior crescimento e redução do tempo necessário para a transferência das plantas para o campo.

#### **2.4. Bioatividade dos ácidos húmicos**

As substâncias húmicas constituem a maior parte da matéria orgânica dos solos e, de acordo com sua solubilidade, podem ser fracionadas em: humina (fração insolúvel em meio alcalino e ácido), ácidos fúlvicos (solúvel em meio alcalino e ácido) e ácidos húmicos (solúvel em meio alcalino e insolúvel em meio ácido) (Kononova, 1982; Stevenson, 1994; Guerra, 2008).

Notadamente, as substâncias húmicas alteram o desenvolvimento das plantas (Chen & Avid, 1990; Façanha et al., 2002; Nardi et al., 2002; Zandonadi et al., 2007). Interferem indiretamente no metabolismo vegetal pelos efeitos ocasionados no solo, como complexação de metais, aumento da capacidade de troca catiônica, fornecimento de nutrientes e retenção de umidade (Rocha & Rosa, 2003). E atuam, também, diretamente, por influenciarem o transporte de íons, a atividade respiratória, o conteúdo de clorofila, a síntese de ácidos nucléicos e a atividade de várias enzimas (Nannipieri et al., 1983). Esses efeitos das substâncias húmicas, principalmente da fração bioativa dos ácidos húmicos (AH), sobre o desenvolvimento vegetal, são dependentes da fonte, da dose e do genótipo da planta (Vaughan & Malcolm, 1985; Rodda et al., 2006).

Apesar de a estrutura dos ácidos húmicos ainda não estar completamente elucidada, sabe-se que essas substâncias são formadas por agregados moleculares heterogêneos estabilizados por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas (Picollo et al., 2001). Atuam principalmente favorecendo o desenvolvimento do sistema radicular (Façanha et al., 2002; Rodda et al., 2006; Zandonadi et al., 2007) e o acúmulo de nutrientes (Vaughan & Malcolm, 1985; Chen & Avid, 1990; Chen et al., 2004). Grande parte dos efeitos bioestimulantes dos ácidos húmicos tem sido creditada à sua atividade similar a auxinas (Chen & Avid, 1990; Canellas et al., 2002; Façanha et al., 2002), hormônios sintetizados pelas plantas que, em pequenas concentrações, estimulam a atividade da bomba eletrogênica  $H^+$ -ATPase de membrana plasmática (Hager et al., 1991; Frias et al., 1996). Com a acidificação do apoplasto, enzimas degradadoras de parede celular ficariam ativas, tornando as células mais susceptíveis à ação da pressão de turgescência vacuolar, acarretando expansão celular (Rayle & Cleland, 1992). Os AH também ativam transportadores secundários, acarretando aumento da absorção de macro e micronutrientes (Sondergaard et al., 2004), mecanismo que pode ser explicado pela ação das  $H^+$ -ATPases na despolarização da membrana plasmática e, conseqüentemente, na ativação de transportadores.

Estudos sobre aplicação foliar de AH vêm demonstrando a possibilidade do seu uso em solução para a promoção do crescimento de diversas culturas, tais como, arroz (Tejada & Gonzalez, 2004), trigo (Delfine et al., 2005) e videira (Ferrara & Brunetti, 2008). Em abacaxizeiro, o uso de AH poderia ser uma estratégia viável na aclimatização de plantas propagadas *in vitro*.

### 3. TRABALHOS

#### SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO NO ABACAXIZEIRO 'VITÓRIA' DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO<sup>(1)</sup>

Lílian Estrela Borges Baldotto<sup>(2)</sup>, Marihus Altoé Baldotto<sup>(3)</sup>, Fábio Lopes Olivares<sup>(4)</sup>,  
Alexandre Pio Viana<sup>(5)</sup>, Ricardo Bressan-Smith<sup>(5)</sup>

#### RESUMO

**A propagação *in vitro* do abacaxizeiro resulta na produção de uma grande quantidade de mudas sadias e homogêneas. Apesar dessas vantagens, a necessidade de um longo período de aclimatização onera essa prática agrícola. A aceleração do crescimento das plantas pela**

---

<sup>(1)</sup> Parte da Tese de Doutorado da primeira autora. Recebido para publicação em 24/06/2009.

<sup>(2)</sup> Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Av. Alberto Lamago, 2000, CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes, RJ. E-mail: liborges@uenf.br

<sup>(3)</sup> Professor do Laboratório de Solos da UENF. E-mails: marihus@uenf.br

<sup>(4)</sup> Professor do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da UENF. E-mail: fabioliv@uenf.br

<sup>(5)</sup> Professor do Laboratório de Genética e Melhoramento de Plantas da UENF. E-mails: pirapora@uenf.br; bressan@uenf.br

inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas e epifíticas pode ser útil para diminuir esse período. O objetivo neste trabalho foi avaliar o potencial de 20 estirpes de bactérias diazotróficas em sintetizar compostos indólicos, solubilizar fosfato de cálcio e óxido de zinco e atuar antagonicamente ao fungo fitopatogênico *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* e, posteriormente, avaliar o desempenho do abacaxizeiro ‘Vitória’ propagado por cultura de tecidos em resposta à inoculação bacteriana durante o período de aclimatização em casa de vegetação. Foram medidas as características de crescimento da parte aérea, do sistema radicular e o conteúdo de nutrientes foliares do abacaxizeiro. Os resultados mostraram diferenças na capacidade das bactérias de sintetizar compostos indólicos, solubilizar fosfato de cálcio e óxido de zinco e atuar antagonicamente ao *Fusarium*. Foram também constatadas diferenças na capacidade das bactérias em promover o crescimento da parte aérea, do sistema radicular e o acúmulo foliar de N, P, K, Ca e Mg no abacaxizeiro. A inoculação das bactérias diazotróficas selecionadas promove o crescimento das mudas durante o período de aclimatização, melhorando a adaptação do abacaxizeiro ao ambiente *ex vitro*.

**Termos de indexação:** *Ananas comosus*, bactérias diazotróficas, bactérias solubilizadoras de fosfato, fusariose, auxina, análise multivariada.

**SUMMARY:** *SELECTION OF BACTERIA GROWTH PROMOTERS IN PINEAPPLE 'Vitória' DURING ACCLIMATIZATION*

*The in vitro propagation of pineapple results in the production of large numbers of healthy and homogeneous plantlets. Despite these advantages, the need for a long acclimatization period makes this agricultural practice rather expensive. Accelerating plant growth by inoculation with diazotrophic endophytic and epiphytic bacteria may be useful to reduce this period. The objective of this study was an evaluation of the potential of 20 diazotrophic strains to synthesize indole, solubilize calcium phosphate and zinc oxide and be antagonistic to plant disease fungus *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas*, and later evaluate the response of ‘Vitória’ pineapple plantlets to bacterial inoculation during acclimatization in the greenhouse. The shoot and root growth characteristics and leaf nutrient contents of pineapple were measured. Results indicated differences in the ability of bacteria to synthesize indole, solubilize calcium phosphate and zinc oxide and be antagonistic to *Fusarium*. Differences were also found in the ability of bacteria for shoot and root growth promotion and foliar accumulation of N, P, K, Ca, and Mg. The inoculation of selected*

*diazotrophic bacteria promotes plantlets growth during the acclimatization period, improving the adaptation of pineapple to the ex vitro environment.*

*Index terms: Ananas comosus, tissue culture, diazotrophic bacteria, phosphate solubilizing bacteria, fusariose, auxin, multivariated analysis.*

## INTRODUÇÃO

O abacaxi é fruta tropical apreciada em todo o mundo devido ao sabor e aroma característico somados às suas propriedades nutricionais e medicinais. A produção mundial de abacaxi é de aproximadamente 6 milhões de toneladas e os principais países produtores são Tailândia, Filipinas, China e Brasil (FAO, 2007). No Brasil, os abacaxizeiros são plantados em solos de baixa fertilidade natural e a cultura apresenta, ainda, como fatores limitantes, a doença fusariose e a escassez de material propagativo de boa qualidade. Nesse contexto, a produção de mudas por propagação *in vitro* é uma alternativa utilizada para incrementar a qualidade e produtividade da abacaxicultura, uma vez que possibilita a obtenção de grande quantidade de propágulos sadios e homogêneos.

A produção *in vitro* de mudas de abacaxizeiro já é bem estabelecida (Teixeira et al., 2001). Após as plantas atingirem desenvolvimento adequado sob condições *in vitro*, elas são aclimatizadas em condições *ex vitro* para posterior adaptação às condições de campo. O período de aclimatização é necessário, pois abacaxizeiros crescidos *in vitro* apresentam características anatômicas e fisiológicas desfavoráveis para enfrentar as condições edafoclimáticas no campo, como, por exemplo, metabolismo heterotrófico, menor espessamento da cutícula e das paredes periclinais externas das células epidérmicas e menor densidade estomática (Barboza et al., 2006). A aclimatização do abacaxizeiro é um processo lento. É necessário um período variável entre 6 a 8 meses em casa de vegetação para que as plantas atinjam o tamanho entre 20 a 30 cm de altura, adequado para a transferência para o campo (Teixeira et al., 2001).

Diversos estudos têm sido realizados objetivando diminuir o período de aclimatização do abacaxizeiro, com o intuito de acelerar o crescimento da planta, como, por exemplo, aplicação de reguladores de crescimento (Catunda et al., 2008), tipos de substratos usados no enraizamento (Weber et al., 2003; Catunda et al., 2008), aplicação de ácidos húmicos (Baldotto et al., 2009) e a inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal (Mello et al., 2002; Weber et al., 2003).

Em relação ao uso de inoculantes, ainda são escassos os trabalhos com abacaxizeiros, no entanto, é consenso que bactérias epifíticas, que habitam a superfície vegetal (Baldotto & Olivares,

2008), e as bactérias endofíticas, que habitam o interior dos tecidos vegetais (Halmann et al., 1997), podem promover o crescimento da planta hospedeira, como já descrito para diversas culturas, por exemplo, arroz (Verma et al., 2001), soja (Cattelan et al., 1999; Kuklinsky-Sobral et al., 2004) e milho (Chabot et al., 1998). Os mecanismos de promoção de crescimento pelas bactérias epifíticas e endofíticas incluem diferentes ações como a fixação biológica de nitrogênio (Kuklinsky-Sobral et al., 2004), solubilização de fosfatos (Chabot et al., 1998; Verma et al., 2001), biossíntese de fitohormônios (Lucangeli & Bottini, 1997), influência na atividade enzimática da ACC deaminase (Rothballer et al., 2008), controle biológico (Byrne et al., 2005), síntese de sideróforos (Lacava et al., 2008) e a indução de resistência sistêmica na planta hospedeira (Kloepper et al., 1999).

Tais efeitos podem ser verificados para abacaxicultura, pois os relatos de promoção do crescimento vegetal foram atribuídos, principalmente, à inoculação de bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico (Weber et al., 2003). Já foram isoladas de abacaxizeiros bactérias diazotróficas pertencentes aos gêneros *Burkholderia* (Weber et al., 1999), *Acetobacter* (Tapia-Hernández et al., 2000) e *Asaia* (Weber et al., 2003). No entanto, dados sobre a real utilização desses microrganismos como inoculantes ou na formulação de biofertilizantes ainda são escassos. A inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas e epifíticas poderia ser uma estratégia viável na aclimatização de abacaxizeiros propagados *in vitro*, pois poderia promover o seu crescimento e diminuir o longo tempo necessário para a transferência para as condições de campo. Para desenvolver esses inoculantes são necessários estudos prévios de seleção bacteriana. Esses estudos podem ser auxiliados pela quantificação da distância entre os tratamentos por métodos multivariados, que são frequentemente usados em estudos de divergência genética nos programas de melhoramento de plantas (Cruz et al., 2004; Viana et al., 2006).

Portanto, objetivou-se, neste trabalho, avaliar o potencial das bactérias diazotróficas endofíticas e epifíticas isoladas de abacaxizeiro em sintetizar compostos indólicos, solubilizar fosfato de cálcio e óxidos de zinco, atuar antagonicamente ao fungo *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* e, posteriormente, avaliar o crescimento da planta e o acúmulo de nutrientes foliares do abacaxizeiro 'Vitória' propagado por cultura *in vitro* em resposta à aplicação dos isolados bacterianos durante a aclimatização.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Tratamentos

Os 21 tratamentos foram constituídos por 20 isolados bacterianos e um controle, sem inoculação (Quadro 1). As estirpes usadas foram provenientes da coleção de bactérias do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, isoladas de plantas de *Ananas comosus* (L.) Merrill, cultivar Smooth Cayenne, oriundas da área do Sistema Integrado de Produção Agroecológica, Embrapa Agrobiologia, Município de Seropédica, RJ. Todas as bactérias são fixadoras de nitrogênio atmosférico, conforme verificado por Santos (2008), usando a metodologia de redução de acetileno a etileno em cultura pura, para avaliar a atividade da enzima nitrogenase. Os isolados foram preservados em microtubos de plástico esterilizados contendo água destilada e autoclavada, à temperatura ambiente. As culturas para uso de rotina foram mantidas nos meios sólidos semi-específicos (Quadro 1) em placas de petri, a 5 °C.

### **Identificação de bactérias produtoras de compostos indólicos**

As bactérias foram crescidas previamente em meio líquido DYGS (Döbereiner et al., 1995) por 24 h, a 30 °C e 100 rpm. Alíquotas de 25 µL foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL dos meios DYGS e meios semi-específicos (Quadro 1) com e sem adição de triptofano (100 µg mL<sup>-1</sup>) e incubadas no escuro por 72 horas, a 30 °C e 150 rpm. Para avaliação da síntese de compostos indólicos (Sarwar & Kremer, 1995), 150 µL da cultura bacteriana foram transferidos para microplacas de poliestireno e, posteriormente, foram adicionados 100 µL do reagente de Salkowsky (1 mL de tricloreto de ferro hexahidratado (FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O), 0,5 mol L<sup>-1</sup>, em 50 mL de ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>), 35 % em água), as placas foram mantidas no escuro por 30 min. Após esse período, foram realizadas leituras no comprimento de onda de 492 nm em espectrofotômetro. A concentração de compostos indólicos foi estimada ajustando equações de regressão para as curva de calibração entre absorbância e concentração de ácido indol acético (AIA) nos diferentes meios de cultivo. Foram realizadas três repetições para cada estirpe bacteriana. Como controle positivo usou-se a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 (Radwan et al., 2005).

### **Identificação de bactérias solubilizadoras de óxido de zinco**

As bactérias foram crescidas em meio líquido DYGS por 24 h, a 30 °C e 100 rpm. Alíquotas de 2 µl das soluções bacterianas foram colocadas em placas de petri com meio de cultura sólido (Saravanan et al., 2003) contendo 10 g L<sup>-1</sup> de glicose, 1 g L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 0,2 g L<sup>-1</sup> de cloreto de potássio (KCl), 0,1 g L<sup>-1</sup> de fosfato de dipotássio (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>),

0,2 g L<sup>-1</sup> de sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), 1,0 g L<sup>-1</sup> de óxido de zinco (ZnO), 15 g L<sup>-1</sup> de agar, 1 L de água destilada, a pH 7,0 e incubadas a 28 °C por 7 dias. A avaliação da solubilização de zinco foi realizada por meio da medição do diâmetro do halo translúcido que se forma em torno das colônias solubilizadoras de zinco. O diâmetro do halo foi medido com auxílio de paquímetro digital e calculado por meio da fórmula: diâmetro do halo (mm) = diâmetro total – diâmetro da colônia. Foram realizadas três repetições para cada estirpe bacteriana. Como controle positivo usou-se a bactéria *Pseudomonas sp.* (UENF 4158213).

### **Identificação de bactérias solubilizadoras de fosfato de cálcio**

As bactérias foram crescidas em meio líquido DYGS por 24 h, a 30 °C e 100 rpm. Alíquotas de 2 µL das soluções bacterianas foram colocadas em placas de petri com meio de cultura sólido (Verma et al., 2001) contendo 10 g L<sup>-1</sup> de glicose, 5 g L<sup>-1</sup> de cloreto de amônio (NH<sub>4</sub>Cl), 1 g L<sup>-1</sup> de cloreto de sódio (NaCl), 1 g L<sup>-1</sup> de sulfato de magnésio heptahidratado (Mg SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), 1,0 g L<sup>-1</sup> de fosfato de cálcio (Ca<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>OH), 15 g L<sup>-1</sup> de agar, 1 L de água destilada a pH 7,0 e incubadas a 28 °C por 7 dias. A avaliação da solubilização de fosfato foi realizada por meio da medição do diâmetro do halo translúcido que se forma em torno das colônias bacterianas solubilizadoras. O diâmetro do halo foi medido com auxílio de um paquímetro digital e calculado por meio da fórmula: diâmetro do halo (mm) = diâmetro total – diâmetro da colônia. Foram realizadas três repetições para cada estirpe bacteriana. Como controle positivo usou-se a bactéria *Pseudomonas sp.* (P07) (Cattelan et al., 1999).

### **Identificação de bactérias antagonicas *in vitro* ao *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas***

O fungo *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* (UENF CF32), proveniente da coleção de fungos da Clínica Fitosanitária do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia da UENF, foi isolado de frutos contaminados de abacaxizeiro, identificado por meio de microscopia ótica e armazenado em meio BDA (batata-dextrose-ágar) a 7 °C (Dhingra & Sinclair, 1995). Para o ensaio *in vitro* de antagonismo, bactérias crescidas previamente em meio líquido DYGS por 24 h, a 30 °C e 100 rpm foram transferidas para placas de petri contendo os meios BDA e King B (King et al., 1954), de modo a formar um cilindro bacteriano de 5 cm de diâmetro. Posteriormente, discos com crescimento fúngico de 3 mm de diâmetro foram colocados no centro dos cilindros bacterianos. As placas foram incubadas a 28 °C por 7 dias. A avaliação do antagonismo foi realizada por meio da medição do diâmetro do fungo com auxílio de um paquímetro digital. Foram realizadas três

repetições para cada estirpe bacteriana. Placas contendo apenas o fungo foram usadas como controle.

## **Material Vegetal**

Plântulas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill), da cultivar Vitória (INCAPER, 2006), propagadas *in vitro*, em potes de vidro tipo *baby food* foram fornecidas pelo Laboratório de Biotecnologia BioMudas e mantidas em meio MS descrito por Murashige & Skoog (1962), sem adição de reguladores de crescimento e vitaminas. As plântulas *in vitro* foram mantidas em sala de crescimento, com fluxo de fótons fotossintéticos de  $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , temperatura de  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas. A cada três meses as plântulas foram transferidas para novo meio, em tubos de ensaio. Para realização das etapas experimentais posteriores foram selecionadas mudas com aproximadamente 1,5 g de matéria fresca.

## **Crescimento bacteriano e inoculação**

As bactérias cresceram em meio líquido DYGS por 24 h,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  e 120 rpm e a inoculação foi realizada pela imersão das plântulas de abacaxizeiro em 10 mL do meio bacteriano por 30 min, com posterior aplicação do mesmo meio bacteriano no substrato (Mello et al., 2002). O controle foi imerso em meio líquido DYGS autoclavado. Posteriormente, as plântulas foram transferidas para vasos de  $0,5 \text{ dm}^3$  contendo substrato Plantmax Hortaliças® para serem aclimatizadas em casa de vegetação por um período de 150 dias. Após o plantio, a cada 15 dias todas as plantas receberam 5 mL de solução nutritiva (Hoagland & Arnon, 1950).

## **Análises de crescimento**

Aos 150 dias de aclimatização as plantas foram coletadas para a mensuração das seguintes variáveis: número de folhas (NF); altura das plantas (ALT), medida pela distância compreendida entre o colo da planta até o ápice foliar usando-se fita métrica; diâmetro do caule (DC), mensurado com paquímetro digital modelo Starret 727; diâmetro da roseta (DR), medida na maior distância linear entre o ápice de folhas opostas, mensurado com fita métrica; matéria fresca da raiz (MFR) e da parte aérea (MFPA); matéria seca da raiz (MSR) e da parte aérea (MSPA), obtidas pela secagem em estufa sob ventilação forçada de ar a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  por 7 dias e posterior pesagem; área foliar (AF), obtida no medidor de área foliar de bancada modelo LI-3100, LI-COR, USA; área radicular (AR),

medida após a digitalização das raízes e posterior análise das imagens no programa Delta –T SCAN Image Analyzer; relação raiz: parte aérea (RPA), obtida pela razão entre a matéria seca da raiz e a matéria seca da parte aérea.

### **Análises nutricionais**

Após a secagem, as folhas de abacaxizeiro foram moídas em moinho do tipo Wiley acoplado a peneiras de 60 malhas  $\text{cm}^{-2}$ . Em seguida, o pó obtido foi submetido à digestão sulfúrica combinada com peróxido de hidrogênio e determinados os teores totais de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg). Para N, foi utilizado o método de Nessler; o teor de P foi obtido por espectrofotometria de absorção molecular (colorimetria, no comprimento de onda de 725 nm), após reação com vitamina C e molibdato de amônio; a determinação de K foi realizada por fotometria de chama e os teores de Ca e de Mg foram obtidos por espectrofotometria de absorção atômica. Todas as análises foram realizadas conforme os métodos usuais para a cultura do abacaxizeiro (Ramos et al., 2006). Os conteúdos de N, P, K, Ca e Mg foram estimados por meio da multiplicação da matéria seca da parte aérea com o teor do nutriente considerado.

### **Contagem bacteriana**

A contagem das bactérias presentes no tecido radicular e na folha D foi realizada por meio da técnica do Número Mais Provável (Döbereiner et al., 1995). Amostras de 1 g das raízes e 1 g da folha D foram maceradas separadamente em 9 mL de solução salina ( $\text{NaCl}$ ,  $8,5 \text{ g L}^{-1}$ ) e a partir destas diluições ( $10^{-1}$ ) foram realizadas diluições seriadas tomando-se 1 mL da diluição original em 9 mL de solução salina até a diluição  $10^{-8}$ . Alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  das diluições foram transferidas para frascos de vidro contendo 5 mL dos meios específicos (Quadro 1). Os frascos foram incubados a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , por 7 dias. Decorrido este período, avaliou-se o crescimento bacteriano pela presença de uma película branca na superfície do meio. O número de bactérias foi obtido pela consulta à Tabela de McCrady para três repetições por diluição.

### **Análises estatísticas**

O experimento foi realizado no delineamento em blocos ao acaso, com 21 tratamentos (20 isolados bacterianos, 1 controle), 3 blocos, totalizando 189 unidades experimentais. Os dados foram submetidos à análise de variância e à análise multivariada por meio do programa GENES (Cruz,

2006), realizando-se a comparação entre os tratamentos via métodos de agrupamento: da ligação média entre grupos (UPGMA), de Tocher e das Variáveis Canônicas, com base na distância generalizada de Mahalanobis. Posteriormente, as médias dos grupos obtidos pelo método de Tocher foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. A contribuição relativa de cada característica para discriminação da variabilidade entre os tratamentos foi avaliada pelo método de Singh (1981).

## RESULTADOS

As bactérias diferiram na capacidade de sintetizar compostos indólicos, solubilizar óxido de zinco e fosfato de cálcio, e atuar antagonicamente ao fungo *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* (Quadro 2). Os maiores valores para a síntese de compostos indólicos foram obtidos com o acréscimo de triptofano nos meios de cultivo DYGS e semi-específicos. Quanto à solubilização de óxido de zinco, 5 isolados formaram halo de solubilização, sendo a estirpe UENF 118501b a que apresentou os maiores valores, em média, 11,22 mm. Dos 20 isolados bacterianos avaliados, 10 apresentaram a capacidade de solubilizar fosfato de cálcio, sendo o maior halo formado pela estirpe UENF 114111, em média, 7,63 mm. Para a atividade antagônica ao *Fusarium*, houve diferenças com relação não apenas aos isolados avaliados, mas também quanto aos meios de cultivo usados, sendo a estirpe UENF 114131 a que apresentou os maiores valores de inibição no meio BDA, uma vez que o diâmetro do fungo foi de apenas 13,52 mm na presença da bactéria e de 62,53 mm na ausência (controle), ou seja uma inibição de 78 %. No meio B de King houve também inibição (51,29 %) por essa mesma bactéria. Por outro lado, na presença da estirpe UENF 114121, houve incrementos no diâmetro do fungo de aproximadamente 23 % em relação ao controle no meio BDA.

Os isolados bacterianos também diferiram na capacidade de promover o crescimento e o acúmulo de nutrientes foliares no abacaxizeiro 'Vitória' durante o período de aclimatização. Na análise de agrupamento pelo método de otimização de Tocher, com base na dissimilaridade expressa pela distância generalizada de Mahalanobis (Quadro 3), houve a formação de sete grupos, cujas médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade (Quadro 4). O grupo I, formado pelo controle (1) e outros dez tratamentos (3, 4, 2, 8, 17, 10, 18, 9, 6, 5), apresentou, em média, os menores valores para as características de crescimento e nutricionais avaliadas (Quadro 4). Os outros seis grupos (II: 11, 15, 12, 13; III: 16, 19; IV: 20; V: 21; VI: 14; VII: 7) apresentam estirpes que diferiram do controle e promoveram em diferentes proporções incrementos nas características de crescimento e nutricionais do abacaxizeiro. Para a matéria seca da parte aérea, por

exemplo, os grupos IV, V e VI, apresentaram incrementos significativos de 48, 51 e 41 %, respectivamente, sobre o grupo I. O grupo V apresentou os maiores valores para as características nutricionais do abacaxizeiro 'Vitória', com incrementos de 193, 47, 58, 50 e 54 %, para os conteúdos foliares de N, P, K, Ca e Mg, respectivamente, sobre o grupo I. O grupo VII apresentou, também, incrementos significativos para o conteúdo de P, 41 % sobre o grupo I. Para os conteúdos de K, Ca e Mg, os grupos IV e VI também proporcionaram incrementos significativos sobre o grupo I.

O agrupamento realizado pelo método da ligação média entre grupos (UPGMA), com base nas distâncias generalizadas de Mahalanobis, pode ser observado no dendograma da similaridade entre os tratamentos (Figura 1), onde as distâncias foram convertidas em porcentagens, e a maior distância, 57,13, foi considerada como 100 %. Baseando-se em uma linha de corte a 50 % de distância, foram formados cinco grupos. O grupo I incluiu o controle (1) e onze tratamentos (3, 4, 2, 8, 17, 10, 18, 9, 5, 6, 12), contendo estirpes que apresentaram os menores desempenhos na promoção de crescimento das plantas. Os outros quatro grupos (II: 16, 19, 20; III: 21; IV: 11, 15, 13, 14; V: 7) foram formados por estirpes que diferiram do controle e promoveram incrementos no crescimento e no conteúdo de nutrientes foliares do abacaxizeiro 'Vitória' durante a aclimatização.

A análise de divergência entre os tratamentos com base nas variáveis canônicas permitiu estabelecer a dispersão gráfica dos 21 tratamentos em relação às três primeiras variáveis canônicas (Figura 2), que representaram acima de 70 % da variação total. Os tratamentos 7, 14, 20 e 21 foram os que apresentaram o maior distanciamento do tratamento controle (1).

A contribuição relativa de cada característica de crescimento e nutricional do abacaxizeiro 'Vitória' inoculado com bactérias para a discriminação da variabilidade entre os tratamentos encontra-se no quadro 5. Dentre elas, a matéria seca da parte aérea (12,69 %), o conteúdo de K (12,21 %) e a matéria seca da raiz (10,36 %) foram as que mais contribuíram para discriminar a variabilidade entre os tratamentos. Já a área radicular (1,01 %) e a altura das plantas (1,74 %) foram as características que menos contribuíram.

Com relação ao nível populacional de bactérias diazotróficas introduzidas nas plântulas de abacaxizeiro, verificou-se efeito da inoculação que elevou entre 1 a 3 unidades logarítmicas a população de bactérias, principalmente, no tecido radicular (Figura 3). Observou-se, também, que ao final do experimento, plantas não inoculadas abrigavam uma população natural de bactérias diazotróficas na massa fresca vegetal entre  $10^3$  e  $10^4$  células  $g^{-1}$ .

## DISCUSSÃO

No presente estudo foi constatado o efeito bioestimulante e biofertilizante das bactérias diazotróficas endofíticas e epifíticas, que resultaram em incrementos nas características de crescimento e nutricionais do abacaxizeiro 'Vitória' durante a aclimatização (Quadro 4). A aclimatização do abacaxizeiro, período no qual as plântulas gradativamente sofrem ajustes estruturais e fisiológicos para se adaptarem às condições *ex vitro* (Barboza et al., 2006), é demorada, devido à lentidão do crescimento das raízes e da parte aérea. Abordagens tecnológicas que resultem na promoção do crescimento das plântulas de abacaxizeiro podem ter impacto significativo na produção e adaptação de mudas oriundas de cultura de tecidos no ambiente de produção.

A expressão da promoção de crescimento do abacaxizeiro pela inoculação das bactérias endofíticas e epifíticas pode ser, em parte, atribuída à fixação biológica de nitrogênio, como observado para a estirpe UENF 118503b, que incrementou em 193 % o conteúdo foliar de N quando comparado ao grupo I que continha o controle (Quadro 4). Contudo, outros mecanismos podem estar envolvidos, como a biossíntese de fitohormônios da classe das auxinas, como, por exemplo, o ácido indol acético (AIA), uma vez que as estirpes diferiram na capacidade de sintetizar compostos indólicos. As auxinas são substâncias que em baixas concentrações, variando de micro a nanomolares, promovem o crescimento das plantas, estimulando a atividade da bomba eletrogênica  $H^+$ -ATPase de membrana plasmática (Hager et al., 1991), resultando nos eventos de expansão celular e de ativação de transportadores secundários em membranas celulares (Sondergaard et al., 2004).

A biossíntese de auxinas por bactérias acontece por diferentes rotas metabólicas (Spaepen et al., 2007), sendo o triptofano o principal precursor para a síntese de AIA, fato que explica os mais altos valores de compostos indólicos detectados nos meios de cultivo que tiveram acréscimo de triptofano sobre os que não o continham (Quadro 2). A biossíntese de fitohormônios parece ser habilidade comum às bactérias diazotróficas, pois já foram relatadas em estirpes pertencentes aos gêneros *Azotobacter* (Martínez-Toledo et al., 1988), *Rhizobium* (Badenoch-Jones et al., 1982), *Azospirillum* (Martínez-Morales et al., 2003), *Gluconacetobacter* e *Herbaspirillum* (Bastián et al., 1998). No entanto, as respostas fenotípicas da planta hospedeira aos fitohormônios sintetizados por bactérias ainda permanecem ambíguas (Spaepen et al., 2007). Uma das respostas da planta ao AIA sintetizado por bactérias é o crescimento das raízes, como constatado em estudos realizados com *Azospirillum* (Dobbelaere et al., 1999). Entretanto, segundo Bashan & Holguin (1997), somente esse mecanismo não explicaria os incrementos no crescimento da planta hospedeira inoculada com

*Azospirillum*, sendo, o mesmo, resultado da atuação concomitante de múltiplos mecanismos, como a fixação biológica de nitrogênio e a biossíntese de fitohormônios.

Nessa direção, o presente estudo constatou que as bactérias isoladas de abacaxizeiro possuem não apenas a capacidade de fixação biológica de nitrogênio, mas também diferem na habilidade de sintetizar compostos indólicos, solubilizar óxido de zinco e fosfato de cálcio, e atuar antagonicamente ao fungo fitopatogênico *Fusarium* (Quadro 2), podendo, potencialmente, serem usadas na formulação de inoculantes, biofertilizantes e biopesticidas. Observou-se que as bactérias diazotróficas interagiram com o *Fusarium*, algumas promovendo a inibição enquanto outras estimularam o crescimento fúngico. Esse fato aponta para a necessidade prévia de estudos de seleção de bactérias e o entendimento dos mecanismos da interação e não o uso empírico da microbiota nos sistemas de cultivo. A intensificação do uso dessas bactérias promotoras de crescimento e proteção de plantas dependerá, em parte, de sua ecologia, da interação solo-planta-microbiota e de programas de isolamento e seleção microbiana (Okon & Labandera-Gonzales, 1994).

Das vinte estirpes avaliadas quanto ao potencial de promover o crescimento e o acúmulo de nutrientes foliares nas plântulas de abacaxizeiro 'Vitória', quatro estirpes, UENF 118503b, UENF 118503a, UENF 117221 e UENF 114111 se destacaram (Quadro 4) e foram selecionadas para estudos subsequentes envolvendo a formulação de um insumo biológico. A seleção das estirpes bacterianas foi realizada com auxílio da análise multivariada das características de crescimento e nutricionais dos abacaxizeiros. A dissimilaridade entre os tratamentos foi calculada por meio da distância generalizada de Mahalanobis apresentando como vantagem o fato de considerar a correlação entre os caracteres avaliados (Cruz et al., 2004). Posteriormente, foram usados métodos de agrupamento, como o hierárquico (UPGMA), para estudar as ramificações entre os tratamentos (Figura 1), e o de otimização de Tocher (Quadro 3), que parte da premissa que a média das medidas de dissimilaridade dentro de cada grupo deve ser menor que as distâncias médias entre grupos (Cruz et al., 2004). Usou-se também a análise de variáveis canônicas (Quadro 5), que leva em consideração a matriz de covariâncias residuais e fenotípicas dos caracteres avaliados (Cruz et al., 2004), para avaliar a similaridade entre os tratamentos (Figura 2). Essas análises multivariadas foram concordantes entre si e possibilitaram concluir que as bactérias inoculadas apresentaram divergências na promoção do crescimento e do acúmulo de nutrientes nas plântulas de abacaxizeiro durante a aclimatização.

Para a otimização dos recursos e o aumento da eficiência de futuros trabalhos de seleção de bactérias promotoras de crescimento em abacaxizeiro, foram estimadas, pelo método de Singh (1981), as contribuições relativas das características de crescimento da parte aérea, do sistema

radicular e do conteúdo de nutrientes foliares do abacaxizeiro 'Vitória' inoculado com bactérias diazotróficas para discriminação da variabilidade entre os tratamentos (Quadro 5). As variáveis que mais contribuíram para discriminar a variabilidade entre os tratamentos foram a matéria seca da parte aérea, a matéria seca da raiz e o conteúdo foliar de K. Já as que menos contribuíram foram a área radicular e a altura das plantas. Descartando essas duas variáveis e fazendo uma nova análise pelo método de Tocher, não houve alteração dos grupos formados, sugerindo que o não uso dessas variáveis em futuros trabalhos com plântulas de abacaxizeiro não leva à perda de informação.

Os dados populacionais (Figura 3) comprovaram o estabelecimento das bactérias diazotróficas endofíticas e epifíticas inoculadas nas plântulas de abacaxizeiro após 150 dias de aclimatização. Para os tratamentos não inoculados foi constatada a presença de bactérias em menor quantidade, o que condiz com Weber et al., (1999) e Tapia-Hernández et al., (2000), que relatam a presença natural de bactérias diazotróficas associadas a abacaxizeiros.

No presente trabalho avaliou-se o potencial dos isolados bacterianos em sintetizar compostos indólicos, solubilizar fosfatos de cálcio e óxidos de zinco e atuar antagonicamente ao *Fusarium*. Posteriormente, usou-se a análise multivariada para agrupar os 21 tratamentos, gerando critérios para selecionar as estirpes promissoras com base na média dos grupos formados para as características de crescimento e nutricionais do abacaxizeiro. Os resultados obtidos apontam para a possibilidade de uso de bactérias diazotróficas na promoção do crescimento das plântulas propagadas *in vitro* de abacaxizeiro durante a fase de aclimatização, o que pode representar uma alternativa importante para a redução de custos de produção com base na maior eficiência nutricional e de crescimento.

## CONCLUSÕES

1. As bactérias diazotróficas diferiram na capacidade de sintetizar compostos indólicos, solubilizar óxido de zinco e fosfato de cálcio e atuar antagonicamente ao fungo *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas*, *in vitro*.

2. As estirpes UENF 118503b, UENF 118503a, UENF 117221 e UENF 114111 foram as que promoveram os maiores incrementos nas características de crescimento da parte aérea, do sistema radicular e nos conteúdos foliares de N, P, K, Ca e Mg do abacaxizeiro 'Vitória' durante a aclimatização.

3. As variáveis que mais contribuíram para discriminar a variabilidade entre os tratamentos foram a matéria seca da parte aérea e da raiz e o conteúdo de K. As variáveis que menos contribuíram foram a área radicular e a altura das plantas.

4. A promoção do crescimento das plântulas de abacaxizeiro propagadas *in vitro* pela inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas ou epifíticas melhora a adaptação das plântulas ao ambiente *ex vitro*, reduzindo o período de aclimatização.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laboratório Biomudas, pelo fornecimento das mudas *in vitro* de abacaxizeiro, ao Dr. Pedro Henrique Monnerat (LFIT/UENF) e ao Sr. José Acácio da Silva (LFIT/UENF), pela colaboração nas análises nutricionais, ao M.Sc. Vicente Mussi-Dias (LEF/UENF), pelo isolamento do *Fusarium* e ao Dr. Alexandre Catellan (Embrapa Soja) por ceder a *Pseudomonas sp.* (P07). Este trabalho recebeu o apoio do CNPq, FAPERJ, INCT para Fixação-Biológica de Nitrogênio.

### LITERATURA CITADA

- ALSTRÖM, S. Characteristics of bacteria from oilseed rape in relation to their biocontrol activity against *Verticillium dahliae*. *Phytopathol.*, 149: 57-64, 2001.
- BADENOCH-JONES, J.; SUMMONS, R.E. & DJORDJEVIC, M.A. Mass spectrometric quantification of índole-3-acetic acid in *Rhizobium* culture supernatants: relation to root hair curling and nodule initiation. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 44: 275-280, 1982.
- 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 aclimatização. *R. Bras. Ci. Solo*, 2009 (aceito para publicação).
- BALDOTTO, L.E.B. & OLIVARES, F.L. Phylloepiphytic interaction between bacteria and different plant species in a tropical agricultural system. *Can. J. Microbiol.*, 54: 918-31, 2008.
- 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. *Pesq. Agropec. Bras.*, 41: 185-194, 2006.

- BASHAN, Y. & HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Can. J. Microbiol.*, 43: 103-121.
- BASTIAN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R. & BOTTINI, R. Production of indole-3-butyric acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regul.*, 24: 7-11, 1998.
- BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J.W. & TUZUN, S. Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Planta*, 204: 153-168, 1998.
- BYRNE, J.M.; DIANESE, A.C.; JI, P.; CAMPBELL, H.L.; CUPPELS, D.A.; LOUWS, F.J.; MILLER, S.A.; JONES, J.B. & WILSON, M. Biological control of bacterial spot of tomato under field conditions at several locations in North America. *Biol. Control*, 32: 408-418, 2005.
- CATTELAN, A.J.; HARTEL, P.G. & FUHRMANN, J.J. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 63: 1670-1680, 1999.
- CATUNDA, P.E.A.; MARINHO, C.S.; GOMES, M.M.A. & CARVALHO, A.J.C. Brassinosteróide e substratos na aclimatização do abacaxizeiro 'Imperial'. *Acta Sci. Agron.*, 30: 345-352, 2008.
- CHABOT, R.; BEAUCHAMP, C.J.; KLOEPPER, J.W. & ANTOUN, H. Effect of phosphorous on root colonization and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Soil Biol. Biochem.*, 30: 1615-1618, 1998.
- CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. & CARNEIRO, P.C.S. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético, Viçosa: UFV, v.1, 480p, 2004.
- CRUZ, C.D. Programa GENES; Simulação e Análise Multivariada; Editora UFV; Viçosa - MG, 389p, 2006.
- DHINGRA, O.D. & SINCLAIR, J.B. *Basic Plant Pathology Methods*. 2ed. CRC Press: Boca Raton, Lewis Publishes. 434p, 1995.
- DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; BROEK, A. V. & VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasiliense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil*, 212: 155-164, 1999.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Embrapa Agrobiologia, Seropédica. 66p, 1995.
- FAO, (2007), <http://www.faostat.fao.org> - Acesso em 08 de Junho de 2009.

- HAGER, A.; DEBUS, G.; EDEL, H.G.; STRANSKY, H. & SERRANO, R. Auxin induces exocytosis and rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Planta*, 185: 527-537, 1991.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F. & KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.*, 43: 895-914, 1997.
- HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. The water culture method of growing plants without soil. Berkeley, University of California, 32p, 1950.
- INCAPER (Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural). 'Vitória' nova cultivar de abacaxi resistente a fusariose. Documento n. 148, DCM-Incaper, Vitória, ES, 2006.
- JETIYANON, K. & KLOEPPER, J.W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. *Biol. Control*, 24: 285-291, 2002.
- KING, E.O.; WARD, M.K. & RANEY, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.*, 44: 301-304, 1954.
- KLOPPER, J.W.; RODRIGUEZ-UBANA, R.; ZEHNDER, G.W.; MURPHY, J.F.; SIKORA, E. & FERNÁNDEZ, C. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Australas. Plant Pathol.*, 28: 21-26, 1999.
- KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. & AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ. Microbiol.*, 6: 1244-1251, 2004.
- LACAVAL, P.T.; SILVA-STENICO, M.E.; ARAÚJO, W.L.; SIMIONATO, A.V.C.; CARRILHO, E.; TSAI, S.M. & AZEVEDO, J.L. Detection of siderophores in endophytic bacteria *Methylobacterium spp.* associated with *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*. *Pesq. Agropec. Bras.*, 43: 521-528, 2008.
- LUCANGELI, C. & BOTTINI, R. Effects of *Azospirillum spp.* on endogenous gibberellin content and growth of maize (*Zea mays* L.) treated with uniconazole. *Symbiosis*, 23: 63-72, 1997.
- MARTÍNEZ-MORALES, L.J.; SOTO-URZÚA, L.; BACA, B.E. & SÁNCHEZ-AHÉDO, J.A. Indole-3-butyric acid (IBA) production in culture medium by wild strain *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 228: 167-173, 2003.
- MARTÍNEZ-TOLEDO, M.V.; SALMERON, V. & GONZALEZ, J. Root exudates of *Zea mays* and production of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter chroococum*. *Plant Soil*, 110: 149-152, 1988.

- MAY, R.; VÖLKSCH, B. & KAMPMANN, G. Antagonistic activities of epiphytic bacteria from soybean leaves against *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* in vitro and in planta. *Microbial Ecol.*, 34: 118-124, 1997.
- MELLO, M.R.F.; MARIANO, R.L.R.; MENEZES, M.; CÂMARA, T.R. & ASSIS, S.M.P. Seleção de bactérias e métodos de bacterização de crescimento em mudas de abacaxizeiro micropropagadas. *Summa Phytopathol.*, 28: 222-228, 2002.
- MURASHIGUE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plantarum.*, 15: 473-497, 1962.
- OKON, Y. & LABANDERA-GONZALEZ, C.A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.*, 26: 1591-1601, 1994.
- RADWAN, T.E.E.; MOHANMED, Z.K. & REIS, V.M. Aeração e adição de sais na produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas. *Pesq. Agropec. Bras.*, 40: 997-1004, 2005.
- RAMOS, M.J.M.; MONNERAT, P. H.; CARVALHO, A.J.C. de; PINTO, J.L.A. & SILVA, J.A. Nutritional deficiency in 'Imperial' pineapple in the vegetative growth phase and leaf nutrient concentration. *Acta Horticult.*, 702: 133-139, 2006.
- ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; KLEIN, I.; GATTINGER, A.; GRUNDMANN, S. & HARTMANN, A. Characterization of *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov. isolated from surface sterilized wheat roots. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56:1341–1348, 2006.
- ROTHBALLER, M.; ECKERT, B.; SCHMID, M.; FEKETE, A.; SCHLOTTER, M.; LEHNER, A.; POLLMANN, S. & HARTMANN, A. endophytic root colonization of gramineous plants by *Herbaspirillum frisingense*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 65: 85-95, 2008.
- SANTOS, S.T. Biogeografia de bactérias culturáveis associadas às fruteiras tropicais. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, Campos dos Goytacazes, RJ, 105p, 2008.
- SARAVANAN, V.S.; SUBRAMONIAM, S.R. & RAJ, S.A. Assessing in vitro solubilization potential of different zinc solubilizing bacterial (zsb) isolates. *Braz. J. Microbiol.*, 34: 121-125, 2003.
- SARWAR, M. & KREMER, R.J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. *Plant Soil*, 172: 261-269, 1995.
- SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. *Indian J. Genet. Plant Breed.*, 41:237-245, 1981.

- SONDEGAARD, T.E.; SCHULZA, A. & PALMGREN, M.G. Energization of transport processes in plants. Roles of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Physiol.*, 136: 2475-2482, 2004.
- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. & REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.*, 31: 425-448, 2007.
- TAPIA-HERNÁNDEZ, A.; BUSTILLOS-CRISTALES, M.R.; JIMÉNEZ-SALGADO, T.; CABALLERO-MELLADO, J. & FUENTES-RAMÍREZ, L.E. Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. *Microbiol. Ecol.*, 39: 49-55, 2000.
- TEIXEIRA, J.B.; CRUZ, A.R.R.; FERREIRA, F.R. & CABRAL, J.R. Biotecnologia aplicada à produção de mudas: produção de mudas micropropagadas de abacaxi. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, 3: 42-47, 2001.
- VERMA, S.C.; LADHA, J.K. & TRIPATHI, A.K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *J. Biotechnol.*, 91: 127-141, 2001.
- VIANA, A.P.; PEREIRA, T.N.; PEREIRA, M.G.; SOUZA, M.M.; MALDONADO, J.F.M. & AMARAL JÚNIOR, A.T. Genetic diversity in yellow passion fruit populations. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.*, 6: 87-94, 2006.
- WEBER, O.B.; TEIXEIRA, K.R.S.; KIRCHHOF, G.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. *Plant Soil*, 210: 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. *Pesq. Agropec. Bras.*, 38:689-696, 2003.

**Quadro 1. Tratamentos dos isolados bacterianos diazotróficos de *Ananas comosus* (L.) Merrill, cultivar Smooth Cayenne, usados para estudos de promoção do crescimento de plântulas do abacaxizeiro ‘Vitória’ e controle**

<b>Número do tratamento</b>	<b>Código coleção UENF<sup>(1)</sup></b>	<b>Tecido Vegetal</b>	<b>Meio de Cultura</b>	<b>Diluição</b>
1	Controle	-	-	-
2	UENF 111111	rizosfera	JMV	-1
3	UENF 111221a	rizosfera	JNFb	-2
4	UENF 111221b	rizosfera	JNFb	-2
5	UENF 111222	rizosfera	JNFb	-2
6	UENF 112531	raiz / epifítico	NFb	-3
7	UENF 114111	raiz / endofítico	JMV	-1
8	UENF 114112	raiz / endofítico	JMV	-1
9	UENF 114121	raiz / endofítico	JMV	-2
10	UENF 114131	raiz / endofítico	JMV	-3
11	UENF 114132	raiz / endofítico	JMV	-3
12	UENF 114511	raiz / endofítico	NFb	-1
13	UENF 117111	folha / endofítico	JMV	-1
14	UENF 117221	folha / endofítico	JNFb	-2
15	UENF 117222a	folha / endofítico	JNFb	-2
16	UENF 117222b	folha / endofítico	JNFb	-2
17	UENF 118501a	caule / epifítico	NFb	0
18	UENF 118501b	caule / epifítico	NFb	0
19	UENF 118502	caule / epifítico	NFb	0
20	UENF 118503a	caule / epifítico	NFb	0
21	UENF 118503b	caule/ epifítico	NFb	0

<sup>(1)</sup> Código do isolado na coleção UENF: designação UENF, seguido de seis dígitos que informam: a cultura (1: abacaxi); o cultivar (1: Smooth Cayenne); o tecido vegetal (1: rizosfera, 2: raiz / epifítico, 4: raiz / endofítico, 7: folha / endofítico, 8: caule); o meio de cultura (1: JMV, 2: JNFb, 5: NFb); a diluição; o número de ordem do isolado na coleção.

**Quadro 2. Caracterização dos isolados bacterianos quanto à síntese de compostos indólicos, solubilização de zinco, solubilização de fosfato e antagonismo ao *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas*, in vitro (média de três repetições ± erro padrão da média)**

Tratamentos	Síntese de compostos indólicos				Solubilização de zinco (diâmetro do halo)	Solubilização de fosfato	Antagonismo ao <i>Fusarium</i> (diâmetro do fungo)	
	DYGS		Meios semi-específicos <sup>(1)</sup>				BDA	B de King
	Sem Tryptofano	Com Tryptofano	Sem Tryptofano	Com Tryptofano				
	-----µmol L <sup>-1</sup> -----				-----mm-----			
1 - Controle <sup>(2)</sup>	32,90 ± 3,60	153,76 ± 1,99	17,36 ± 2,81	24,63 ± 1,82	10,06 ± 1,02	6,90 ± 0,32	62,53 ± 0,67	67,78 ± 2,38
2 - UENF111111	3,66 ± 1,03	20,65 ± 4,36	3,50 ± 1,72	42,91 ± 6,82	-	6,31 ± 0,39	42,69 ± 3,47	47,56 ± 1,71
3 - UENF 111221a	10,22 ± 0,70	36,61 ± 1,69	19,54 ± 0,84	54,98 ± 4,91	-	5,41 ± 0,51	15,93 ± 3,04	39,61 ± 0,99
4 - UENF 111221b	13,12 ± 2,19	30,86 ± 3,03	18,90 ± 0,48	58,53 ± 11,42	-	-	39,88 ± 3,82	35,32 ± 0,42
5 - UENF 111222	22,04 ± 1,08	28,60 ± 1,03	16,21 ± 1,04	66,76 ± 5,57	-	-	33,99 ± 2,82	48,26 ± 4,25
6 - UENF 112531	3,21 ± 1,98	15,01 ± 1,45	4,26 ± 4,57	138,59 ± 10,24	-	-	48,51 ± 1,86	32,33 ± 1,17
7 - UENF 114111	9,89 ± 1,63	12,26 ± 1,52	5,47 ± 1,24	26,24 ± 2,23	-	7,63 ± 0,81	63,17 ± 5,47	50,03 ± 2,73
8 - UENF 114112	3,76 ± 1,13	10,65 ± 0,32	9,26 ± 1,18	51,64 ± 7,24	-	7,28 ± 1,40	75,85 ± 1,60	52,07 ± 3,39
9 - UENF 114121	14,19 ± 2,61	11,51 ± 0,43	7,29 ± 0,80	13,67 ± 4,07	-	6,94 ± 1,46	81,68 ± 1,60	63,90 ± 2,07
10 - UENF 114131	5,38 ± 0,62	11,51 ± 0,28	7,89 ± 1,58	3,36 ± 4,55	-	5,87 ± 0,31	13,52 ± 0,90	33,01 ± 2,72
11 - UENF 114132	3,12 ± 1,36	13,26 ± 0,16	7,44 ± 0,66	0,00 ± 0,66	-	6,48 ± 1,50	29,90 ± 2,70	56,82 ± 2,41
12 - UENF 114511	34,46 ± 2,77	50,22 ± 1,90	1,36 ± 1,45	272,87 ± 17,41	10,08 ± 0,80	2,68 ± 0,11	35,62 ± 2,80	28,66 ± 0,31
13 - UENF 117111	6,24 ± 1,65	12,26 ± 2,89	6,83 ± 1,79	0,03 ± 0,55	-	5,17 ± 0,45	27,35 ± 0,64	54,28 ± 1,76
14 - UENF 117221	7,20 ± 1,75	20,75 ± 1,61	17,79 ± 1,83	25,16 ± 1,52	10,19 ± 1,21	-	61,58 ± 3,12	51,91 ± 3,78
15 - UENF 117222a	8,60 ± 0,65	22,58 ± 1,48	14,14 ± 1,45	21,12 ± 3,10	10,68 ± 1,92	-	68,17 ± 2,87	66,58 ± 1,76
16 - UENF 117222b	13,55 ± 4,03	36,88 ± 5,25	8,59 ± 0,88	20,25 ± 1,40	10,44 ± 1,43	-	63,25 ± 5,76	67,69 ± 2,77
17 - UENF 118501a	2,58 ± 0,37	16,45 ± 1,34	7,74 ± 2,39	202,87 ± 17,54	-	-	60,54 ± 5,18	38,27 ± 1,90
18 - UENF 118501b	3,66 ± 0,39	22,26 ± 0,37	0,49 ± 0,72	51,29 ± 18,65	11,22 ± 0,32	-	58,17 ± 0,68	46,56 ± 6,07
19 - UENF 118502	3,44 ± 0,57	19,78 ± 5,74	0,00 ± 0,52	12,87 ± 1,41	-	-	48,74 ± 2,04	31,91 ± 1,03
20 - UENF 118503a	3,98 ± 0,84	20,54 ± 1,63	0,00 ± 1,09	125,41 ± 41,16	-	-	64,42 ± 2,38	46,48 ± 1,84
21 - UENF 118503b	9,25 ± 3,12	19,25 ± 2,97	0,00 ± 1,24	39,19 ± 1,82	-	5,41 ± 0,51	79,84 ± 1,00	68,91 ± 2,77

<sup>(1)</sup> Meios semi-específicos: identificados no quadro 1. <sup>(2)</sup> Controle: para síntese de compostos indólicos, *Herbaspirillum seropedicae* HRC54; para solubilização de zinco, *Pseudomonas* sp. (UENF 4158213); para solubilização de fosfato, *Pseudomonas* sp. (P07); para atividade antagônica ao *Fusarium*, placas com crescimento apenas do fungo.

**Quadro 3. Grupos de tratamentos estabelecidos pelo método de otimização de Tocher, com base na dissimilaridade expressa pela distância generalizada de Mahalanobis**

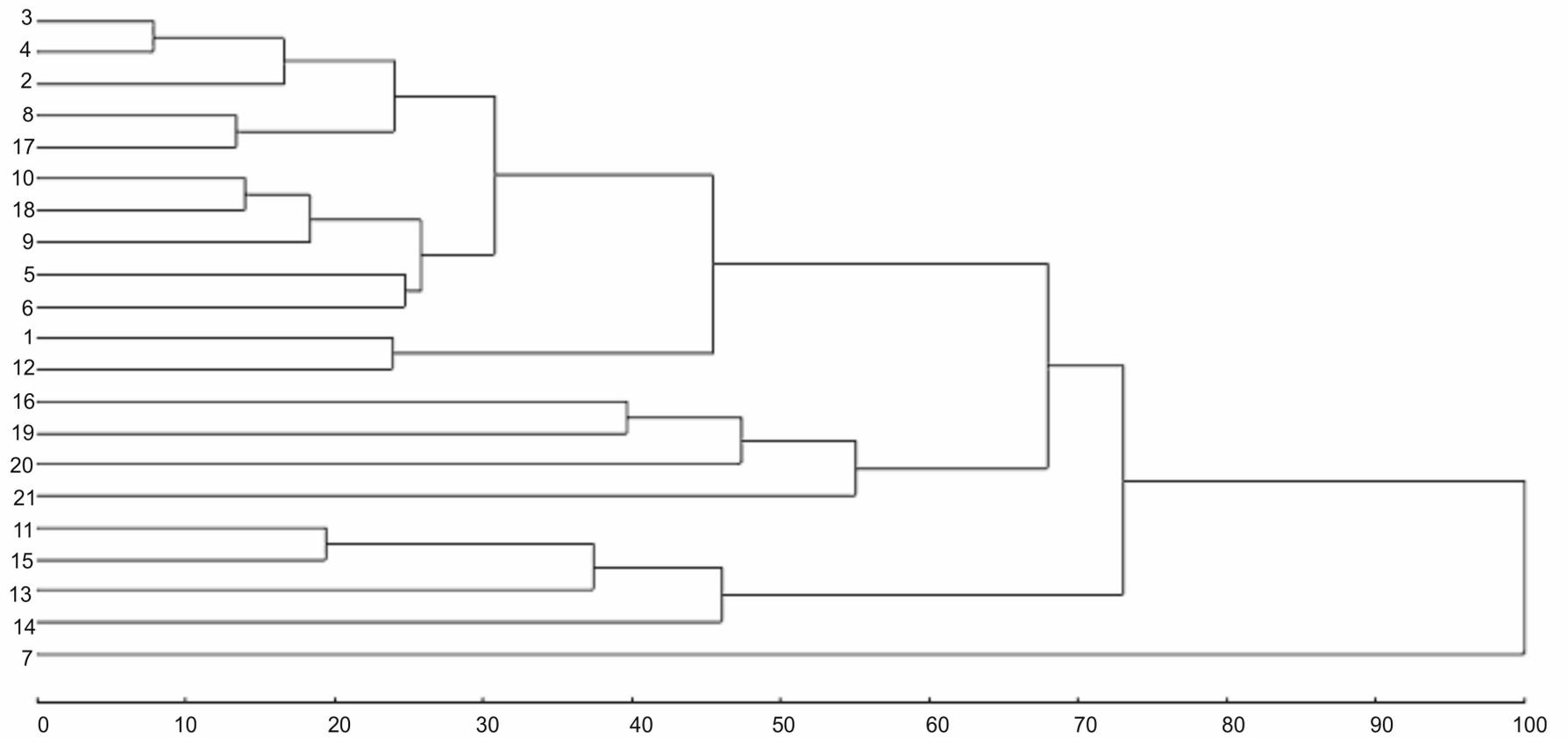
<b>Grupos</b>	<b>Tratamentos<sup>(1)</sup></b>
I	3, 4, 2, 8, 17, 10, 18, 9, 6, 5, 1
II	11, 15, 12, 13
III	16, 19
IV	20
V	21
VI	14
VII	7

<sup>(1)</sup> Tratamentos: tratamentos identificados no quadro 1.

**Quadro 4. Média das características de crescimento da parte aérea, do sistema radicular e do conteúdo de nutrientes do abacaxizeiro ‘Vitória’ em resposta à inoculação de bactérias diazotróficas epifíticas e endofíticas dos grupos formados pelo método de Tocher**

Grupos <sup>(1)</sup>	Características de crescimento											Características nutricionais				
	Parte aérea <sup>(2)</sup>							Sistema radicular <sup>(3)</sup>				Conteúdo de nutrientes <sup>(4)</sup>				
	NF	ALT	DR	DC	MFPA	MSPA	AF	MFR	MSR	RPA	AR	N	P	K	Ca	Mg
	-unid-	-----cm-----	-mm-	-----g-----	-cm <sup>2</sup> -	-----g-----					-%-	-----mg planta <sup>-1</sup> -----				
I	17,31a	11,76a	17,42b	14,39a	14,56b	1,30c	157b	3,17a	0,42a	0,33a	110a	13,67b	4,08ab	88,04c	7,36b	5,55b
II	17,72a	11,89a	17,82b	14,49a	16,14b	1,51bc	168b	2,96a	0,44a	0,30a	108a	14,98b	4,02b	99,13c	7,71b	6,30b
III	18,83a	12,56a	17,89b	14,97a	17,48b	1,60bc	192ab	3,58a	0,48a	0,31a	105a	15,21b	4,73ab	102,76c	9,55ab	7,34ab
IV	19,11a	12,67a	19,00ab	15,70a	20,78ab	1,93ab	226a	4,01a	0,54a	0,29a	111a	18,85b	5,73ab	136,14ab	10,28ab	8,42a
V	19,44a	12,56a	20,11ab	15,57a	21,60a	1,96a	223a	4,21a	0,57a	0,30a	97a	40,05a	5,99a	139,22a	11,04a	8,53a
VI	18,67a	12,22a	18,67b	14,91a	17,89b	1,83abc	189ab	3,62a	0,53a	0,29a	107a	17,24b	5,21ab	119,37abc	10,20ab	8,11a
VII	18,55a	12,72a	20,67a	15,37a	18,26ab	1,61bc	202ab	4,04a	0,53a	0,34a	120a	16,08b	5,75a	113,75bc	8,39b	6,56b
QMR	0,56	0,70	1,09	0,62	3,43	0,31	352,84	0,36	0,006	0,002	306,37	53,47	0,46	160,92	1,04	0,65
CV (%)	4,20	6,98	5,82	5,37	11,50	11,90	10,88	18,02	16,37	12,81	16,09	46,11	15,30	12,96	12,53	12,74

<sup>(1)</sup> Grupos: grupos formados pelo método de Tocher (Quadro 3). <sup>(2)</sup> Parte aérea: NF = número de folhas; ALT = altura; DR = diâmetro da roseta; DC = diâmetro do caule; MFPA = matéria fresca da parte aérea; MSPA = matéria seca da parte aérea; AF = área foliar. <sup>(3)</sup> Sistema radicular: MFR = matéria fresca da raiz; MSR = matéria seca da raiz; RPA = razão entre raiz e parte aérea; AR = área radicular. <sup>(4)</sup> Conteúdo de nutrientes: N, P, K, Ca, Mg = conteúdo de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, respectivamente. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.



**Figura 1. Dendrograma da similaridade entre os 21 tratamentos (Quadro 1), obtidos pelo método da ligação média entre grupos (UPGMA), baseado na distância generalizada de Mahalanobis.**

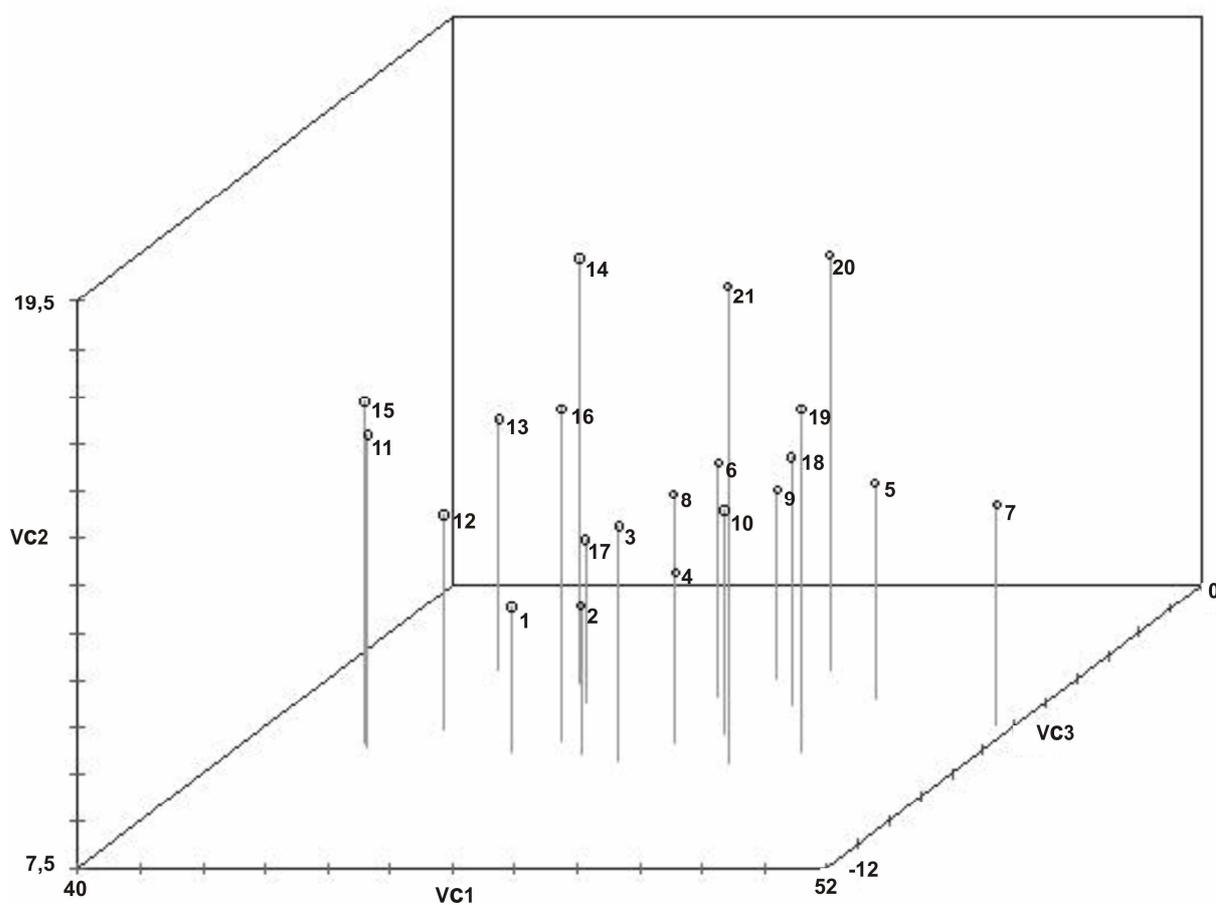
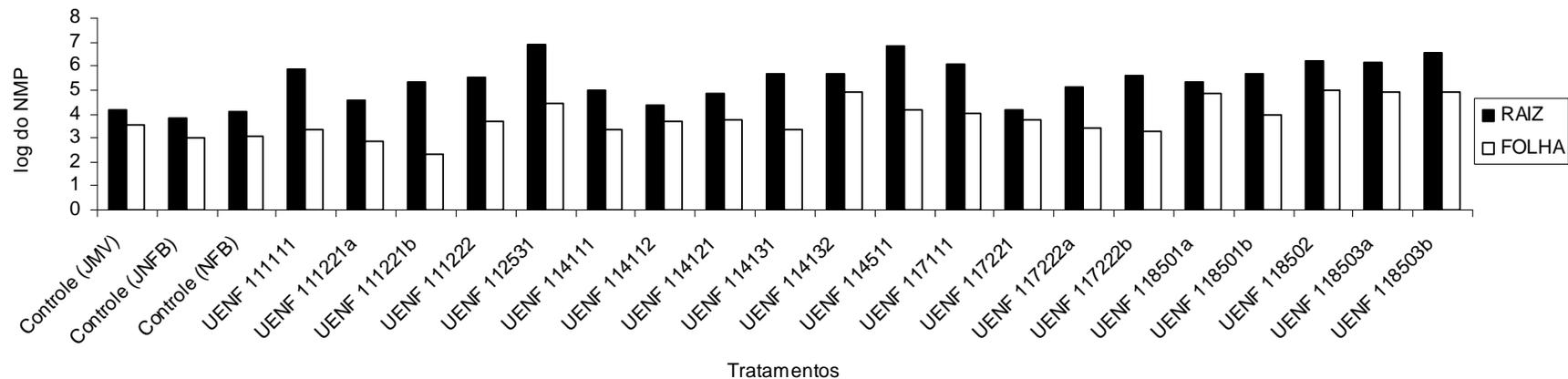


Figura 2. Gráfico de dispersão dos 21 tratamentos (Quadro 1) em relação às três primeiras variáveis canônicas (VC1, VC2, VC3).

**Quadro 5. Contribuição relativa das características de crescimento da parte aérea, do sistema radicular e do conteúdo de nutrientes do abacaxizeiro ‘Vitória’ inoculado com bactérias diazotróficas epifíticas e endofíticas para discriminação da variabilidade entre os tratamentos, valor estimado pelo método de Singh (S.j.) e valor em porcentagem (%)**

Características	Contribuição relativa		
	S.j.	%	
<b>Crescimento da parte aérea<sup>(1)</sup></b>	<b>NF</b>	825,81	8,34
	<b>ALT</b>	172,39	1,74
	<b>DR</b>	561,19	5,67
	<b>DC</b>	429,69	4,33
	<b>MFPA</b>	324,89	3,28
	<b>MSPA</b>	1256,52	12,69
	<b>AF</b>	736,19	7,44
<b>Crescimento do sistema radicular<sup>(2)</sup></b>	<b>MFR</b>	598,07	6,04
	<b>MSR</b>	1025,58	10,36
	<b>RPA</b>	627,01	6,33
	<b>AR</b>	99,55	1,01
<b>Conteúdo de nutrientes<sup>(3)</sup></b>	<b>N</b>	251,71	2,54
	<b>P</b>	644,11	6,50
	<b>K</b>	1208,88	12,21
	<b>Ca</b>	800,42	8,08
	<b>Mg</b>	339,45	3,43

<sup>(1)</sup> Parte aérea: NF = número de folhas; ALT = altura; DR = diâmetro da roseta; DC = diâmetro do caule; MFPA = matéria fresca da parte aérea; MSPA = matéria seca da parte aérea; AF = área foliar. <sup>(2)</sup> Sistema radicular: MFR = matéria fresca da raiz; MSR = matéria seca da raiz; RPA = razão entre raiz e parte aérea; AR = área radicular. <sup>(3)</sup> Conteúdo de nutrientes: N, P, K, Ca, Mg = conteúdo de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, respectivamente.



**Figura 3. Log do Número Mais Provável (NMP) de bactérias por grama de raiz e de folha D do abacaxizeiro ‘Vitória’ em resposta à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas e epifíticas.**

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DA INTERAÇÃO ENTRE A BACTÉRIA DIAZOTRÓFICA ENDOFÍTICA *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 E PLÂNTULAS DE ABACAXIZEIRO DA CULTIVAR VITÓRIA<sup>(1)</sup>**

**Lílian Estrela Borges Baldotto<sup>(2)</sup>, Fábio Lopes Olivares<sup>(3)</sup>, Ricardo Bressan-Smith<sup>(4)</sup>**

**RESUMO**

Os eventos da interação estrutural entre a bactéria diazotrófica endofítica *Herbaspirillum seropedicae* estirpe RAM10 marcada com *gfp* e plântulas do abacaxizeiro ‘Vitória’ foram avaliados por meio da microscopia ótica de campo claro e de fluorescência, combinada com microscopia eletrônica de varredura durante 28 dias após inoculação. Após 6 horas de inoculação, *H. seropedicae* RAM10 já estava aderida às raízes, colonizando principalmente a superfície e a base dos pêlos radiculares, seguida das junções das células epidérmicas. A adesão radicular nos períodos iniciais ocorreu principalmente na forma de células isoladas e agregados com células pleomórficas oriundas do meio de crescimento. A infecção da bactéria no tecido radicular ocorreu através das cavidades originadas pelo rompimento das células epidérmicas durante a emergência das raízes laterais e o

---

<sup>(1)</sup> Parte da Tese de Doutorado da primeira autora. Recebido para publicação em 05/08/2009.

<sup>(2)</sup> Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Av. Alberto Lamego, 2000, CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes, RJ. E-mail: liborges@uenf.br

<sup>(3)</sup> Professor do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da UENF. E-mail: fabioliv@uenf.br

<sup>(4)</sup> Professor do Laboratório de Fisiologia Vegetal da UENF. E-mail: bressan@uenf.br

estabelecimento endofítico pela colonização dos espaços intercelulares do parênquima cortical. Com o passar do tempo de interação, as células pleomórficas deram lugar a células com morfologia típica de *Herbaspirillum*. Ademais, com 1 dia após a inoculação a bactéria foi vista colonizando a parte aérea. Nesta região, os locais preferenciais de colonização epifítica foram as flanges cuticulares, os tricomas escamiformes e os tricomas tectores. Posteriormente, as bactérias ocuparam as paredes periclinais externas das células epidérmicas e os complexos estomáticos. A penetração na parte aérea ocorreu passivamente através dos ostíolos, seguida do estabelecimento endofítico das câmaras sub-estomáticas e se estendeu aos espaços intercelulares do mesofilo foliar via parênquima clorofiliano lacunoso. Após 21 dias de inoculação, biofilmes bacterianos foram visualizados na base dos pêlos radiculares e sobre a parede periclinal externa das células epidérmicas radiculares e foliares, comprovando também a natureza rizo e filoepifítica de *Herbaspirillum seropedicae* em associação com abacaxizeiros.

**Termos de indexação:** *Ananas comosus*, bactérias promotoras de crescimento, bactérias epifíticas, biofilme, microscopia, proteína verde fluorescente.

**SUMMARY:** *STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF INTERACTION BETWEEN ENDOPHYTIC DIAZOTROPHIC BACTERIA Herbaspirillum seropedicae RAM10 AND PLANTLETS OF PINEAPPLE CULTIVAR VITÓRIA*

*The events involved in the structural interaction between the diazotrophic endophytic bacterium Herbaspirillum seropedicae, strain RAM10, labeled with green fluorescent protein, and pineapple plantlets of the cultivar Vitória were evaluated by means of bright-field and fluorescence microscopy, combined with scanning electron microscopy for 28 days after inoculation. After 6 hours of inoculation, H. seropedicae RAM10 was already adhered to the roots, colonizing mainly root hair surface and bases, followed by epidermal cell wall junctions. Bacteria adherence in the initial periods occurred mainly in the form of solitary cells and small aggregates with pleomorphic cells. Bacteria infection of root tissue occurred through the cavities caused by the disruption of epidermal cells during the emergence of lateral roots and the endophytic establishment by the colonization of intercellular spaces of the cortical parenchyma. Over the course of time of the interaction, the pleomorphic cells were substituted by cells with typical morphology of Herbaspirillum. Moreover, within 1 day after inoculation the bacteria were colonizing the shoots.*

*In this region, the preferred sites of epiphytic colonization were epidermal cell wall junctions, peltate scutiform trichomes and non-glandular trichomes. Subsequently, the bacteria occupied the outer periclinal walls of epidermal cells and stomata. The penetration into the shoot occurred passively through stoma aperture followed by the endophytic establishment on the substomatal chambers and spread to the intercellular spaces of spongy chlorenchyma. After 21 days of inoculation, bacterial biofilm were seen at the root hair base and on epidermal cell wall surface of root and leaf, also confirming the epiphytic nature of *Herbaspirillum seropedicae* in association with pineapple plants.*

*Index terms: Ananas comosus, growth-promoting bacteria, epiphytic bacteria, biofilms, microscopy, green fluorescent protein.*

## INTRODUÇÃO

Bactérias diazotróficas têm sido isoladas de diferentes espécies vegetais e notadamente contribuem para a promoção do crescimento da planta hospedeira (Baldani & Baldani, 2005). A primeira bactéria diazotrófica com características endofíticas a ser isolada foi descrita inicialmente como *Azospirillum seropedicae* (Baldani et al., 1984), sendo isolada de raízes de sorgo, milho e arroz, e, posteriormente, re-classificada com base em estudos de homologia de DNA em um novo gênero, *Herbaspirillum*, e renomeada como *Herbaspirillum seropedicae* (Baldani et al., 1986). Essa bactéria gram-negativa possui formato de bastonete curvo, flagelos polares e baixa sobrevivência no solo (Baldani et al., 1986; Baldani et al., 1992a; Olivares et al., 1996). Atualmente, o gênero *Herbaspirillum* inclui as espécies *H. seropedicae* (Baldani et al., 1986), *H. rubrisubalbicans* (Baldani et al., 1996), *H. frisingense* (Kirchhof et al., 2001), *H. lusitanum* (Valverde et al., 2003), *H. autotrophicum* (Ding & Yokota 2004), *H. huttiense* (Ding & Yokota 2004), *H. putei* (Ding & Yokota 2004), *H. chlorophenolicum* (Im et al., 2004), *H. hiltneri* (Rothballer et al., 2006) e *H. rhizosphaerae* (Jung et al., 2007). Bactérias desse gênero são encontradas em raízes, caules e folhas de várias gramíneas (Baldani et al., 1986; Olivares et al., 1996; Elbeltagy et al., 2001) e também em fruteiras tropicais como bananeira e abacaxizeiro (Weber et al., 1999; Cruz et al., 2001).

O potencial de *Herbaspirillum seropedicae* promover o crescimento vegetal tem sido avaliado preferencialmente em espécies da família Poaceae, apresentando, inicialmente, resultados não satisfatórios (Pereira et al., 1988; Pereira & Baldani, 1995), e, posteriormente, por meio da seleção de estirpes em plantas cultivadas *in vitro* (Baldani et al., 2000; Oliveira et al., 2002),

resultados positivos para arroz (Baldani et al., 2000), milho (Riggs et al., 2001) e cana-de-açúcar (Oliveira et al., 2002; Oliveira et al., 2009). Os mecanismos responsáveis pela promoção do crescimento das plantas por *Herbaspirillum* ainda não estão completamente elucidados e incluem não apenas a fixação biológica de nitrogênio (Urquiaga et al., 1992) como também a biossíntese de fitohormônios (Bastián et al., 1998; Radwan et al., 2004) e influência na atividade da ACC deaminase (Rothballer et al., 2008).

Os passos da interação estrutural entre *Herbaspirillum seropedicae* e a planta hospedeira têm sido avaliados por meio da inoculação artificial e posterior análise microscópica, em plantas de arroz (Baldani et al., 1992b; Elbeltage et al., 2001; James et al., 2002; Roncato-Maccari et al., 2003; Perin et al., 2003), sorgo (James et al., 1997), milho (Perin et al., 2003; Monteiro et al., 2008) e cana-de-açúcar (Olivares, 1997; Olivares et al., 1997; James & Olivares, 1998; Silva et al., 2003; Njoloma et al., 2005). Em cana-de-açúcar, Olivares (1997) mostrou de maneira elegante, por meio das técnicas convencionais de microscopia ótica e microscopia eletrônica aliadas a imunomarcção, que *Herbaspirillum seropedicae* possui penetração passiva através das cavidades formadas pela emergência de raízes laterais e pela ruptura das células epidérmicas, e o estabelecimento endofítico ocorre a partir da colonização dos espaços intercelulares do parênquima cortical e do lúmen do xilema. Atualmente, com os adventos das tecnologias de DNA recombinante, estirpes de *Herbaspirillum seropedicae* mutantes estão sendo obtidas com inserção de genes que expressam proteínas fluorescentes, como, por exemplo, a proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein, gfp*), possibilitando estudos da interação bactéria-plantas em tempo real (Elbeltage et al., 2001; Njoloma et al., 2005).

A *gfp* é um polipeptídeo originalmente sintetizado pelo cnidário *Aequorea victoria*, que converte a bioluminescência azul de uma proteína cálcio-dependente, *aequorin*, em luz verde, logo, ao ser ligada a uma proteína de interesse atua como um marcador (Prasher et al., 1992). Por ser estável e emitir fluorescência ao ser excitada diretamente pela luz ultravioleta, a *gfp* pode ser considerada uma ferramenta de fácil detecção por meio de microscopia de fluorescência e confocal e, ao contrário das técnicas convencionais de microscopia e imunomarcção, não necessita do uso de reagentes químicos, minimizando efeitos de artefatos e possibilitando estudos espaço-temporal *in situ* das interações entre microrganismos e plantas (Elbeltage et al., 2001; Lagopodi et al., 2002; Bolwerk et al., 2003; Njoloma et al., 2005).

A intensificação do uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas, como *H. seropedicae*, nos sistemas de cultivo, depende da elucidação dos mecanismos estruturais e fisiológicos da interação. Em abacaxizeiro, por exemplo, já foram isoladas e identificadas (Weber et al., 1999; Cruz et al., 2001) diferentes estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas, com potencial

para promover o crescimento de plantas (Weber et al., 2003a, b); no entanto, dados sobre os eventos estruturais da interação são inexistentes.

Portanto, objetivou-se, neste trabalho, investigar ao longo do tempo os eventos estruturais da interação entre a bactéria marcada com *gfp*, *Herbaspirillum seropedicae* RAM10, e plântulas de abacaxizeiro ‘Vitória’ cultivadas *in vitro*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material Vegetal

Plântulas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill), da cultivar Vitória (INCAPER, 2006), propagadas por cultura *in vitro*, em potes de vidro tipo *baby food*, foram fornecidas pelo Laboratório de Biotecnologia BioMudas e mantidas em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), sem adição de reguladores de crescimento e vitaminas. As plântulas *in vitro* foram mantidas em sala de crescimento com fluxo de fótons fotossintéticos de  $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , temperatura de  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas. A cada três meses as plântulas foram transferidas para novo meio. Para realização das etapas experimentais posteriores, foram selecionadas mudas com aproximadamente 1,5 g de matéria fresca e transferidas separadamente para tubos de ensaio contendo 20 mL da solução de 1/10 do meio MS (Murashige & Skoog, 1962), sem adição de reguladores de crescimento, vitaminas, agar e pH ajustado em 5,8.

### Crescimento bacteriano e inoculação

A bactéria utilizada foi a *Herbaspirillum seropedicae*, estirpe RAM10, com inserção através de transposon Tn5 do gene GFP. Esta construção foi cedida gentilmente pela Dr<sup>a</sup>. Rose Adele Monteiro (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná), sendo derivada originalmente da estirpe *H. seropedicae* ZA95 isolada de arroz (Baldani et al., 1986). O inóculo foi preparado por meio do crescimento bacteriano em meio líquido DYGS (Döbereiner et al., 1995) por 24 h, 30 °C, 120 rpm e a inoculação foi realizada pela transferência de 30  $\mu\text{L}$  da solução bacteriana ( $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) para os tubos de ensaios contendo as plântulas. Para o controle foram inoculados 30  $\mu\text{L}$  do meio DYGS autoclavado.

### **Microscopia ótica de fluorescência**

As visualizações microscópicas iniciaram-se 6 horas após inoculação e continuaram aos 1, 2, 3, 7, 14, 21 e 28 dias, usando três plântulas diferentes em cada tempo. Folhas e raízes inteiras, e também secções transversais e longitudinais das folhas e raízes, foram colocadas em lâminas de vidro com água destilada, cobertas com lamínulas e visualizadas no microscópio ótico de fluorescência Axioplan (Zeiss) com os filtros BP (band-pass) com comprimento de onda de excitação entre 460 e 490nm e comprimento de onda de emissão LP (long-pass) de 510 a 550 para visualização da emissão de fluorescência verde. As imagens foram obtidas por meio de uma câmara fotográfica digital Canon Power Shot A640 acoplada ao microscópio e com auxílio do programa Zoom Browser EX.

### **Microscopia ótica de campo claro**

Fragmentos da lâmina foliar (1,0 x 0,5 cm) e da raiz (1,0 cm de comprimento) foram fixados em uma solução contendo 2,5 % glutaraldeído, 4,0 % formaldeído e 0,1 mol L<sup>-1</sup> de tampão fosfato de potássio, a pH 7,0, por 2 horas. Posteriormente, as amostras foram lavadas três vezes no mesmo tampão e pós-fixadas em 1 % tetróxido de ósmio em água por 2 horas. O material foi lavado três vezes com o mesmo tampão e desidratado em álcool etílico (30, 50, 70, 90, 3 x 100 % (v / v) em água), 1 hora cada troca. Após a desidratação, as amostras foram embebidas gradualmente em resina acrílica Epon. Amostras individuais foram transferidas para microtubos contendo a resina e, posteriormente, polimerizadas em estufa a 60° C por 48 horas. Foram obtidas seções semifinas (0,8 a 1,0 µm) usando-se facas de vidro obtidas com auxílio do equipamento Reichert Ultracuts Ultramicrotome. Os cortes semifinos foram colocados sobre lâminas de vidro contendo uma gota de água, fixados em placa metálica aquecida e contrastadas com solução contendo 1 % de azul de toluidina e 1 % tetraborato de sódio em água destilada. As amostras foram visualizadas e as imagens capturadas no mesmo microscópio citado anteriormente.

### **Microscopia eletrônica de varredura**

Amostras da lâmina foliar e da raiz foram fixadas, pós-fixadas e desidratadas como descrito para microscopia ótica. Em seguida, as amostras foram secas pelo método do ponto crítico com CO<sub>2</sub> no equipamento Critical Point Dryer (BAL-TEC CPD 030) e metalizadas com Ag no equipamento

Sputter Coater (BAL-TEC SCD 050) de acordo com Baldotto & Olivares (2008). As observações foram realizadas entre 15 e 25 kV no microscópio eletrônico de varredura DSEM 962 (Zeiss).

### **Contagem bacteriana**

A contagem das bactérias presentes no abacaxizeiro foi realizada por meio da técnica do Número Mais Provável (Döbereiner et al., 1995). Amostras de 1 g das plântulas foram maceradas em 9 mL de solução salina (NaCl, 8,5 g L<sup>-1</sup>) e, a partir desta diluição (10<sup>-1</sup>) foi realizada a diluição seriada tomando-se 1 mL da diluição original em 9 mL de solução salina até a diluição 10<sup>-10</sup>. Alíquotas de 100 µL das diluições foram transferidas para frascos de vidro contendo 5 mL do meio JNFb semi-sólido (Baldani et al., 1992a). Os frascos foram incubados a 30 °C, por 7 dias. Decorrido este período, avaliou-se o crescimento bacteriano pela presença de uma película branca na superfície do meio. O número de bactérias foi obtido pela consulta à Tabela de McCrady para três repetições por diluição. A confirmação da identidade dos re-isolados foi baseada em observações do formato celular e emissão de fluorescência com auxílio do microscópio ótico de fluorescência Axioplan (Zeiss) e feita a partir do crescimento bacteriano presente nas últimas diluições do meio semi-sólido.

## **RESULTADOS**

### **Colonização radicular**

Por meio da microscopia ótica de fluorescência foi possível distinguir a fluorescência verde emitida pela bactéria *Herbaspirillum seropedicae*, estirpe RAM10, marcada com *gfp* da autofluorescência amarela emitida pelas raízes do abacaxizeiro (Figura 1). Essa diferença de cores facilitou as observações das etapas iniciais da interação entre a bactéria e a planta hospedeira.

Após 6 horas de inoculação, as bactérias foram visualizadas em toda extensão do eixo radicular, principalmente na zona pilífera, sobre os pêlos radiculares, com adesão apolar, dispostas de forma solitária ou em pequenos agregados (Figura 1A). As bactérias apresentavam intenso movimento e formato filamentosos característico da cultura em fase estacionária crescida em meio complexo DYGS (Figura 1A).

Após 1 dia de inoculação, foi verificado aumento populacional e *H. seropedicae* estava presente sobre os pêlos radiculares e em sua base (Figura 1B) e nas junções das paredes periclinais

externas das células epidérmicas. Já neste período, bactérias no formato de bastonete curvo típicas de *Herbaspirillum* também foram visualizadas, indicando a multiplicação da bactéria na nova condição de crescimento em meio MS diluído associado a exsudatos da planta de abacaxizeiro. A partir do segundo dia de interação bactéria-planta, foi possível observar incremento da distribuição das bactérias na forma de agregados de diferentes tamanhos, variando de 20 a 100 µm de comprimento (Figura 1C, 1D) sobre os pêlos radiculares. Predominavam bactérias no formato de bastonete (Figura 1D), com aproximadamente 2 µm de comprimento e pouca movimentação.

Entre 3 e 7 dias de inoculação foi verificada uma diminuição da colonização sobre os pêlos radiculares e o predomínio de bactérias em sua base e nas junções das células epidérmicas (Figura 1E, 1F). Este deslocamento de sítio predominante de colonização foi mantido após 14 dias de inoculação, onde as bactérias exibiram dominante colonização epifítica de toda parede periclinal externa das células epidérmicas (Figura 2A) presentes especificamente nas regiões próximas à emergência de raízes laterais (Figura 2B), não sendo mais observada sua colonização por toda extensão do eixo radicular. Essas observações sugerem que as cavidades (Figura 2C) formadas pelo rompimento das células epidérmicas durante a emergência das raízes laterais constituem uma abertura natural por onde ocorre a penetração passiva e a colonização endofítica de *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 em raízes de plântulas de abacaxizeiro. Após a infecção, ocorreu o estabelecimento bacteriano endofítico nos espaços intercelulares do parênquima cortical (Figura 2D).

Nos períodos mais avançados da interação (entre 21 e 28 de inoculação após a inoculação), *H. seropedicae* RAM 10 foi predominantemente visualizada estruturada como biofilmes bacterianos, ou seja, populações numerosas com bactérias aderidas umas às outras e à superfície vegetal, envolvidas por uma matriz extracelular, principalmente na base dos pêlos radiculares (Figura 3A) e na parede periclinal externa das células epidérmicas (Figura 3B). Colonização endofítica foi restrita ao compartimento apoplástico, com bactérias presentes nos espaços intercelulares do parênquima cortical, não sendo visualizadas bactérias no cilindro vascular. Ressalta-se que a partir de 21 dias após inoculação não foi detectada fluorescência emitida pela bactéria e as observações foram realizadas por meio da microscopia eletrônica de varredura e microscopia ótica de campo claro. As bactérias, apesar de não emitirem fluorescência *in situ*, ao serem re-isoladas em meio JNFb semi-sólido, tornavam a emitir fluorescência.

Durante os 28 dias do experimento não foi detectada nenhuma alteração estrutural das plântulas de abacaxizeiro inoculadas com *Herbaspirillum seropedicae* RAM 10 quando comparadas às plântulas não inoculadas. Em relação ao meio de cultivo, não foi identificada a olho nu nenhuma

alteração da cor e turbidez, no entanto, foi verificada a diminuição do pH para valores entre 2,8 a 3,5 no meio MS das plântulas inoculadas.

### **Colonização foliar**

A fluorescência verde emitida pela bactéria *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 marcada com *gfp* foi também facilmente distinguida, por meio da microscopia ótica de fluorescência, da autofluorescência vermelha emitida pelos cloroplastos presentes na parte aérea do abacaxizeiro (Figura 4).

Após 6 horas de inoculação, foram visualizadas poucas bactérias no formato filamentosas, aderidas de modo apolar à parede periclinal externa das células epidérmicas. Em períodos de interação maiores (1 e 3 dias após inoculação), as bactérias foram visualizadas habitando preferencialmente tricomas tectores (Figura 4A, 4B), tricomas escamiformes (Figura 4C, 4D, 4E, 4F) e as flanges cuticulares (Figura 5A, 5B, 5C), dispostas em pequenos agregados ou solitárias.

Aos 7 e 14 dias após inoculação, foram observados agregados bacterianos maiores localizados epifiticamente não apenas nos tricomas e flanges cuticulares, como também na parede periclinal externa das células epidérmicas (Figura 5D) e nas proximidades dos complexos estomáticos (Figura 6A, 6B). Foi verificado que a penetração de *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 na parte aérea de plântulas de abacaxizeiro ocorre passivamente através do ostíolo (Figura 6B, 6C). Já a colonização endofítica inicia-se na câmara sub-estomática (Figura 6C) e avança pelos espaços intercelulares de células de parênquima clorofiliano lacunoso do mesófilo foliar (Figura 6D). Não foi observada a colonização bacteriana nos feixes vasculares presentes no limbo foliar.

Aos 21 e 28 dias após inoculação, foram visualizados por microscopia eletrônica de varredura, biofilmes bacterianos sobre a parede periclinal externa das células epidérmicas (Figura 3C, 3D). Todas as imagens dos primeiros três dias após inoculação foram obtidas na região basal da lâmina foliar, localizada próximo ao meio de cultivo, posteriormente (7 a 28 dias após inoculação), também foi observada colonização bacteriana na região mediana da lâmina foliar, indicando um sentido de colonização da base para o ápice ao longo do eixo foliar longitudinal.

### **Dinâmica populacional**

Conforme pode ser verificado na Figura 7, *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 apresentou incrementos populacionais nos primeiros 7 dias após inoculação, atingindo a população máxima de aproximadamente  $10^{10}$  células por grama de matéria fresca de abacaxizeiro no terceiro dia após

inoculação. Posteriormente, ocorreu declínio populacional até o vigésimo primeiro dia após inoculação e a bactéria se estabeleceu na plântula hospedeira em uma população de aproximadamente  $10^6$  células por grama de matéria fresca do abacaxizeiro 'Vitória'. Nas plântulas controle não foi detectado crescimento bacteriano.

## DISCUSSÃO

Este estudo identificou, por meio de diferentes técnicas microscópicas, as etapas da interação estrutural entre *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 e plântulas de abacaxizeiro cultivadas *in vitro*. A colonização inicial (6 horas após inoculação) de *Herbaspirillum seropedicae* nas raízes do abacaxizeiro ocorre preferencialmente na zona pilífera, com adesão bacteriana predominantemente apolar sobre os pêlos radiculares e posterior formação de agregados. Essa etapa foi transitória, pois após o terceiro dia de inoculação as bactérias não foram mais facilmente detectadas associadas à superfície dos pêlos e sim em sua base e, principalmente, nas junções das paredes periclinais externas das células epidérmicas. As junções das paredes celulares (lamela média), por serem locais ricos em pectina e cálcio, propiciam a adesão bacteriana, uma vez que o cálcio faz a mediação entre as superfícies negativamente carregadas da bactéria e da planta, mecanismo de adesão já descrito para a bactéria fixadora de nitrogênio *Rhizobium leguminosarum* (Smit et al., 1989).

Posteriormente (sétimo ao décimo quarto dias após inoculação), *H. seropedicae* colonizou epifiticamente predominantemente a parede periclinal externa das células epidérmicas nas regiões próximas a sítios de emergência de raízes laterais. Estas regiões são sítios de infecção amplamente reportados na literatura para *H. seropedicae* em associação com plantas da família das Poaceae, como relatado em milho após 30 minutos de inoculação (Monteiro et al., 2008), em arroz após 2 dias de inoculação (James et al., 2002), em cana-de-açúcar após 4 dias de inoculação (James & Olivares, 1998) e em arroz, sorgo, milho e trigo após 5 dias de inoculação (Roncato-Maccari et al., 2003). No entanto, a colonização radicular por *Herbaspirillum seropedicae* não ocorre em todas as plantas hospedeiras, Ebeltagy et al. (2001), por exemplo, observaram em arroz que *Herbaspirillum seropedicae* estirpe B501 coloniza apenas as sementes de *Oriza sativa* cv. Sasanishiki e preferencialmente a parte aérea de *Oriza officinalis* e não as raízes, indicando que a interação estrutural é dependente da estirpe bacteriana e do genótipo da planta hospedeira.

Após a penetração radicular de *Herbaspirillum seropedicae* nas plântulas de abacaxizeiro ocorre o estabelecimento endofítico apenas nos espaços intercelulares do parênquima cortical. A

colonização bacteriana no estelo não foi observada, indicando, neste caso, que a endoderme constituiu uma barreira efetiva ao espalhamento radial da bactéria. James et al. (2002) também relatam que a colonização endofítica de *Herbaspirillum seropedicae* em raízes de arroz ocorre preferencialmente nos espaços intercelulares do parênquima cortical e do aerênquima, e raramente ocorre a colonização no estelo. Já em milho, Monteiro et al. (2008) também relatam que *Herbaspirillum seropedicae* coloniza o apoplasto cortical, mas ao contrário dos outros trabalhos, os autores observaram que após três dias de inoculação as bactérias colonizavam a endoderme e os vasos do xilema.

Com relação à parte aérea do abacaxizeiro, *Herbaspirillum seropedicae* inicialmente coloniza as flanges cuticulares, os tricomas tectores e escamiformes. Estes locais conferem as bactérias proteção contra as condições hostis da superfície foliar e uma maior disponibilidade de nutrientes. De fato, os resultados obtidos por Baldotto & Olivares (2008), que investigando a colonização microbiana no filoplano de 47 espécies vegetais em ambiente tropical constataram que a presença de tricomas é a característica anatômica mais importante para favorecer o estabelecimento bacteriano epifítico. Esse padrão de colonização não é exclusivo de *Herbaspirillum seropedicae*. Biosensores que detectam sacarose e frutose mostram que as junções das células epidérmicas, os tricomas, as nervuras e os complexos estomáticos são os locais preferenciais para o metabolismo de carbono de *Erwinia herbicola* no filoplano de *Phaseolus vulgaris* (Leveau & Lindow, 2001).

Posteriormente, *Herbaspirillum seropedicae* colonizou as paredes periclinais externas das células epidérmicas, as proximidades dos complexos estomáticos e penetrou nas folhas passivamente através do ostíolo. A colonização endofítica iniciou-se na câmara sub-estomática e se estendeu às regiões intercelulares do parênquima clorofiliano lacunoso das folhas de abacaxizeiro. Já em arroz, Elbeltagy et al. (2001) observaram que a penetração de *Herbaspirillum* sp. inoculado artificialmente nas sementes ocorre nas folhas jovens, ainda não completamente expandidas e que a colonização endofítica também é via apoplástica. Olivares et al. (1997), no entanto, relataram resposta de hipersensibilidade ao inocular *Herbaspirillum seropedicae* na parte aérea de cana-de-açúcar.

Após 21 e 28 dias de inoculação foram observados biofilmes bacterianos na superfície das raízes e folhas das plântulas de abacaxizeiro, comprovando também a natureza rizo e filoeipifítica de *Herbaspirillum seropedicae*. A formação de biofilmes contribuiu para a persistência bacteriana na superfície vegetal (Beattie & Lindow, 1999), uma vez que as bactérias se beneficiam dos processos de cooperação via sistema *quorum sensing* (Whitehead et al., 2001; Bodman et al., 2003). De acordo com Monier & Lindow (2003), a colonização de *Pseudomonas syringae* no filoplano de

*Phaseolus vulgaris* submetidos a diferentes condições de umidade possibilita que as bactérias presentes em agregados apresentem maior sobrevivência comparada com as bactérias solitárias.

Sobre a dinâmica populacional de *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 nas plântulas de abacaxizeiro, foram observados incrementos iniciais da população e posterior decréscimo, estabilizando, após 21 dias de inoculação, em valores de aproximadamente  $10^6$  células por grama de matéria fresca. Tal evidência tem como base o trabalho de James et al. (2002), no qual a colonização de *Herbaspirillum seropedicae* Z67 em plântulas de arroz tiveram o mesmo comportamento, 5 a 7 dias após inoculação houve incrementos de  $10^6$  log UFC por grama de matéria fresca e posteriormente decréscimo para valores entre  $10^3$  e  $10^4$ . É possível que essa dinâmica populacional reflita a natureza não patogênica de *Herbaspirillum seropedicae* e a capacidade de cada genótipo vegetal em abrigá-las.

Neste trabalho, observou-se que 21 dias após inoculação as bactérias não mais emitiam fluorescência *in situ*, mas ao serem re-isoladas em meio JNFb semi-sólido voltavam a emitir fluorescência. Concomitantemente à perda da fluorescência, foi verificada a diminuição do pH do meio de cultivo atingindo valores inferiores a 3,5. A acidificação do meio de cultivo se deve provavelmente a exsudação de ácidos orgânicos pelas raízes do abacaxizeiro (Le Van & Masuda, 2004) e também pelo metabolismo da própria bactéria crescendo no meio (Bastián et al., 1998; Radwan et al., 2004). Com a diminuição do pH ocorre a protonação do cromóforo da *gfp* e essa permanece na forma não fluorescente (Heim et al., 1994). No entanto, quando a bactéria foi re-isolada no meio JNFb semi-sólido, cujo pH inicial de 5,8 aumentou progressivamente com o crescimento bacteriano, permitiu a desprotonação do cromóforo e conseqüentemente a detecção da fluorescência.

## CONCLUSÕES

1. *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 se adere inicialmente à superfície dos pêlos radiculares das plântulas de abacaxizeiro, posteriormente à base dos pêlos e às junções das células epidérmicas.

2. A penetração de *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 nas raízes de plântulas de abacaxizeiro ocorre de forma passiva através das cavidades formadas pelo rompimento das células epidérmicas durante a emergência de raízes laterais.

3. A colonização endofítica de *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 nas raízes de plântulas de abacaxizeiro ocorre nos espaços intercelulares do parênquima cortical.

4. A colonização epifítica de *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 na parte aérea de plântulas de abacaxizeiro ocorre inicialmente nas flanges cuticulares, tricomas escamiformes e tricomas tectores. Posteriormente, ocorre a colonização sobre a parede periclinal externa das células epidérmicas e nos complexos estomáticos.

5. A penetração de *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 na parte aérea de plântulas de abacaxizeiro ocorre passivamente através do ostíolo.

6. A colonização endofítica de *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 na parte aérea de plântulas de abacaxizeiro inicia-se na câmara sub-estomática e se estende aos espaços intercelulares do parênquima clorofiliano lacunoso.

7. Após 21 dias de inoculação ocorre a formação de biofilmes de *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 no rizoplano e filoplano de plântulas de abacaxizeiro.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laboratório Biomudas, pelo fornecimento das mudas *in vitro* de abacaxizeiro e ao grupo do Dr. Fabio de Oliveira Pedrosa, pela disponibilização da bactéria marcada com a proteína verde-fluorescente. Este trabalho foi parcialmente financiado pelo CNPq, FAPERJ e pelo INCT para Fixação Biológica de Nitrogênio.

### LITERATURA CITADA

- BALDANI, J.I. & BALDANI, V.L.D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. An. Acad. Bras. Cienc., 77: 549-579, 2005.
- BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M. & DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a milk plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. Int. J. Syst. Bacteriol., 46: 802-810, 1996.

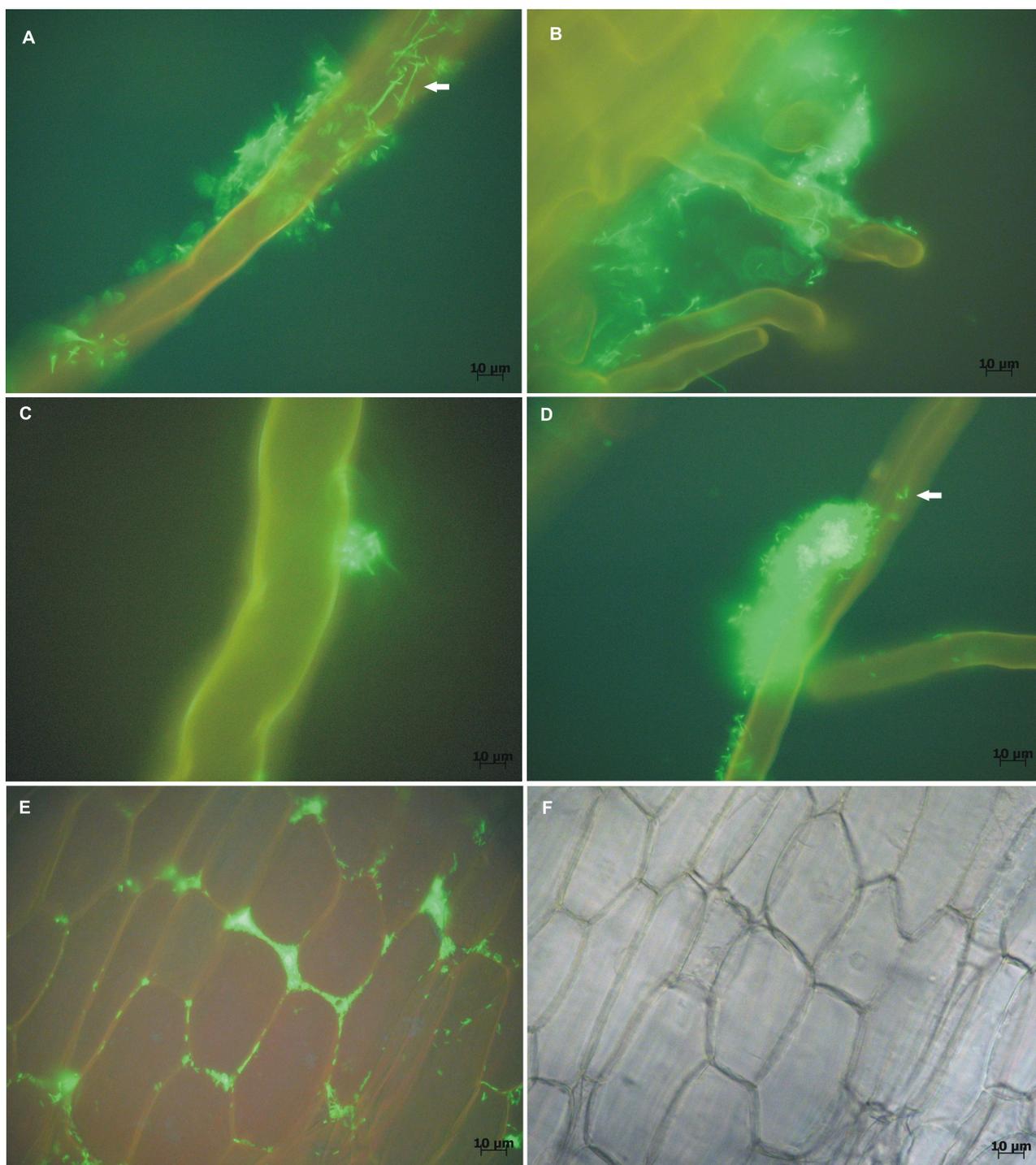
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L. & DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 36: 86–93, 1986.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SAMPAIO, M.J.; AMAN, D. & DÖBEREINER J. A fourth *Azospirillum* species from cereal roots. *An. Acad. Bras. Cienc.*, 56: 365, 1984.
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Inoculation of rice plants with endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia spp.*. *Biol. Fertil. Soil.*, 30: 485–491, 2000.
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.L. & DÖBEREINER J. Identification and ecology of *Herbaspirillum seopedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. *Symbiosis* 19: 65–73, 1992a.
- BALDANI, V.L.D.; JAMES, E.K.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Colonization of rice by the nitrogen- fixing bacteria *Herbaspirillum spp.* and *Azospirillum brasilense*. In: International Congress on Nitrogen Fixation, 9, Cancun, México, 860 p, 1992b.
- BALDOTTO, L.E.B. & OLIVARES, F.L. Phylloepiphytic interaction between bacteria and different plant species in a tropical agricultural system. *Can. J. Microbiol.*, 54:918-931, 2008.
- BASTIÁN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R. & BOTTINI, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A<sub>1</sub> and A<sub>3</sub> by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regul.*, 24: 7-11, 1998.
- BEATTIE, G.A. & LINDOW, S.E. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. *Phytopathol.*, 89: 353-359, 1999.
- BOLWERK, A.; LAGOPODI, A.L.; WIJFJES, A.H.M.; LAMERS, G.E.M.; CHIN- A-WOENG, T. F.C.; LUGTENBERG, B.J.J. & BLOEMBERG, G.V. Interactions in the tomato rhizosphere of two *Pseudomonas* biocontrol strains with the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11:983-993, 2003.
- BODMAN, S.B.V.; BAUER, W.D. & COPLIN D.L. Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 41: 455-482, 2003.
- CRUZ, M.L.; SOUZA E.M.; WEBER, O.B.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. & PEDROSA, F. O. 16S Ribosomal DNA Characterization of Nitrogen-Fixing Bacteria Isolated from Banana (*Musa spp.*) and Pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:2375-2379, 2001.
- DING, L. & YOKOTA, A. Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of

- [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*Pseudomonas*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov.. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 2223-2230, 2004.
- ELBELTAGY, A.; NISHIOKA, K.; SATO, T.; SUZUKI, H.; YE, B.; HAMADA, T.; ISAWA, T.; MITSUI, H. & MINAMISAWA, K. Endophytic colonization and *in planta* nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. Appl. Environm. Microbiol., 67: 5285-5293, 2001.
- HEIM, R.; PRASHER, D.C. & TSIEN, R.Y. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. Proc. Natl. Acad. Sci., 91: 12501-12504, 1994.
- IM, W.T.; BAE, H.S.; YOKOTA, A. & LEE, S.T. *Herbaspirillum chlorophenolicum* sp. nov., a 4-chlorophenol-degrading bacterium Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 54: 851-855, 2004.
- INCAPER (Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural). 'Vitória' nova cultivar de abacaxi resistente a fusariose. Documento n. 148, DCM-Incaper, Vitória, ES, 2006.
- JUNG, S.Y.; LEE, M.H.; OH, T.K. & YOON, J.H. *Herbaspirillum rhizosphaerae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Allium victorialis* var. *platyphyllum* Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 57: 2284 – 2288, 2007.
- KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI J.I.; REIS, V.M. & HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fiber plants. Int. J. Syst. Evolut. Microbiol., 51: 157–168, 2001.
- JAMES, E.K.; GYANESHWAR, P.; MATHAN, N.; BARRAQUIO, W.L.; REDDY, P.M.; IANNETTA, P.P.; OLIVARES, F.L. & LADHA, J.K. Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. Mol. Plant Microbe Interact., 15: 894-906, 2002.
- JAMES, E.K. & OLIVARES, F.L. Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. Crit. Rev. Pl. Sci., 17: 77–119, 1998.
- JAMES, E.K.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. J. Exp. Bot., 48: 785–797, 1997.
- LAGOPODI, A.L.; RAM, A.F.J.; LAMERS, G.E.M.; PUNT, P.J.; VAN DEN HONDEL, C.A.M. J.; LUGTENBERG, B.J.J. & BLOEMBERG, G.V. Confocal laser scanning microscopical analysis of tomato root colonization and infection by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* using the green fluorescent protein as a marker. Mol. Plant Microbe Interact., 15: 172–179, 2002.

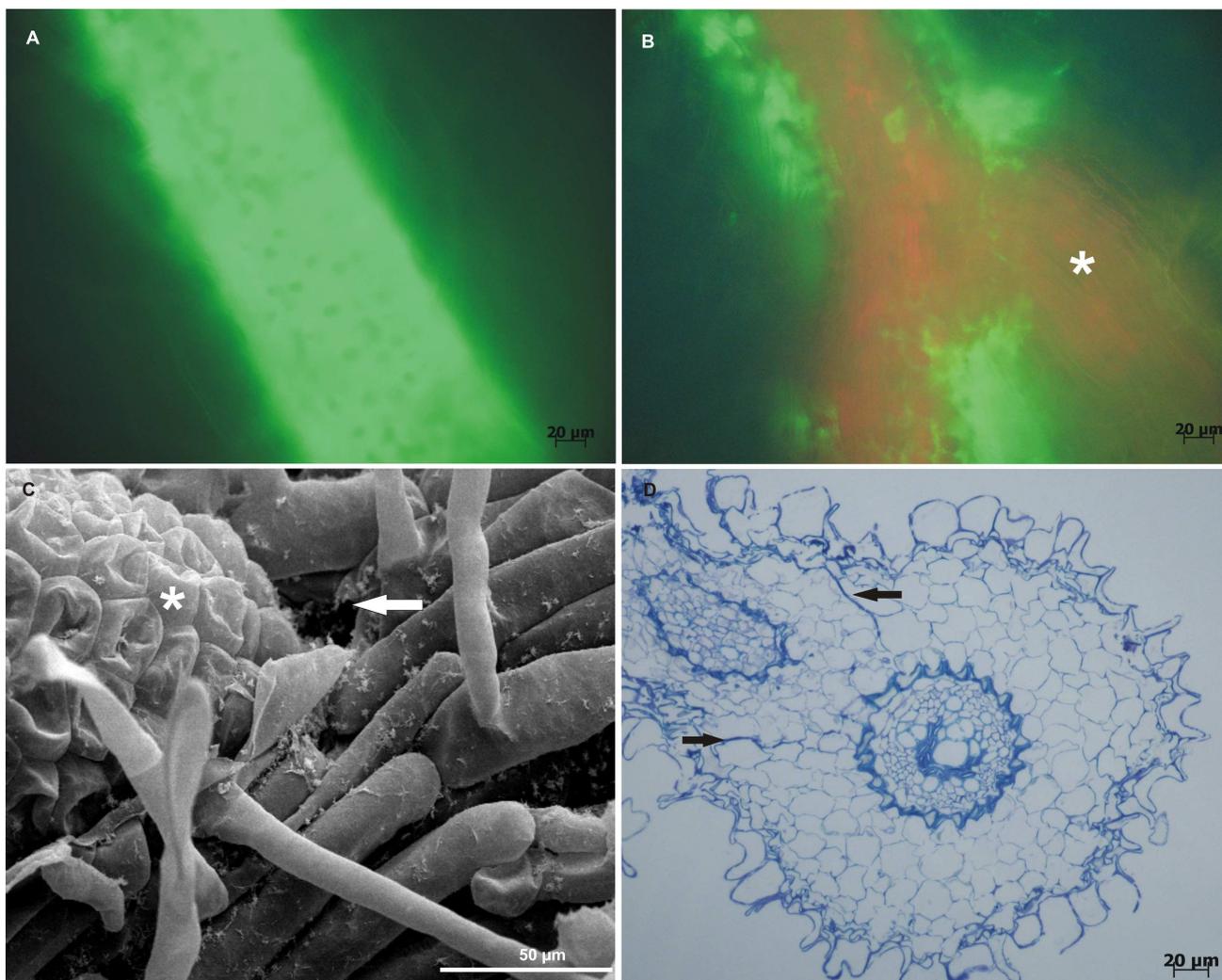
- LE VAN, H. & MASUDA, T. Physiological and biochemical studies on aluminum tolerance in pineapple. *Aust. J. Soil Res.*, 42: 699–707, 2004.
- LEVEAU, J.H.J. & LINDOW, S.E. Appetite of an epiphyte: quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98: 3446-3453, 2001.
- MONIER, J.M. & LINDOW, S.E. Differential survival of solitary and aggregated bacterial cells promotes aggregated formation on leaf surfaces. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100: 15977-15982, 2003.
- MONTEIRO, R.A.; SCHMIDT, M.A.; BAURA, V.A.; BALSANELLI, E.; WASSEM, R.; YATES, M.G.; RANDI, M.A.F.; PEDROSA, F.O. & SOUZA, E.M. Early colonization pattern of maize (*Zea mays* L. Poales, Poaceae) roots by *Herbaspirillum seropedicae* (Burkholderiales, Oxalobacteraceae). *Genet. Mol. Biol. Online*, 2008.
- MURASHIGUE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plantarum*, 15: 473-497, 1962.
- NJOLOMA, J.P.; OOTA, M.; SAEKI, Y. & AKAO, S. Detection of *gfp* expression from *gfp*-labelled bacteria spot inoculated onto sugarcane tissues. *Afr. J. Biotechnol.* 4: 1372-1377, 2005.
- OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Occurrence of endophytic diazotroph *Herbaspirillum* spp in roots, stems and leaves predominantly of gramineae. *Biol. Fertil. Soils*, 21: 197–200, 1996.
- OLIVARES, F.L.; JAMES, E.K.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. *New Phytol.*, 135: 723–737, 1997.
- OLIVARES, F. L. Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de plantas de açúcar (*Saccharum* sp. híbrido) por bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Herbaspirillum*. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) Seropédica, RJ. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 328p, 1997.
- OLIVEIRA, A.L.M.; STOLFFES, M.; SCHMID, M.; REIS, V.M.; BALDANI, J.I. & HARTMANN, A. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. *Eur. J. Soil Biol.*, 45:106-113, 2009.
- OLIVEIRA, A.L.M.; URQUIAGA, S.; DÖBEREINER, J. AND BALDANI, J.I. The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant Soil*, 242: 205–215, 2002.
- PEREIRA, J.A.R. & BALDANI, J.I. Selection of *Azospirillum* spp. and *Herbaspirillum seropedicae* strains to inoculate rice and maize plants. In: International Symposium on

- Sustainable Agriculture for the Tropics: the Role Biological Nitrogen Fixation, Angra dos Reis, RJ, Brazil, 220–221, 1995.
- PEREIRA, J.A.R.; CAVALCANTI, V.A.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Field inoculation of sorghum and rice with *Azospirillum* spp and *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant Soil* 110: 269–274, 1988.
- PERIN, L.; SILVA, M.F.; FERREIRA, J.S.; CANUTO, E.L.; MEDEIROS, A.F.A.; OLIVARES, F.L.; REIS, V.M. Avaliação da capacidade de estabelecimento endofítico de estirpes de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* em milho e arroz. *Agronomia*, 37: 47-53, 2003.
- PRASHER, D.C.; ECKENRODE, V.K.; WARD, W.W.; PRENDERGAST, F.G. & CORMIER, M.J. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111: 229-233, 1992.
- RADWAN, T.EL-S.; MOHAMED, Z.K. & REIS, V.M. 2004. Efeito da inoculação de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* na produção de compostos indólicos em plântulas de milho e arroz. *Pesq. Agropec. Bras.*, 39: 987-994.
- RIGGS, P.J.; CHELIUS, M.K.; INIGUEZ, A.L.; KAEPLER, S.M.; TRIPLETT, E.W. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. *Aust. J. Plant Physiol.*, 28: 829-836, 2001.
- RONCATO-MACCARI, L.D.B.; RAMOS, H.J.O.; PEDROSA, F.O.; ALQUINI, Y.; YATES, M.G.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.; CHUBATSU, L.S. & SOUZA, E.M. Root colonization systemic spreading and contribution of *Herbaspirillum seropedicae* to growth of rice seedling. *Symbiosis*, 35: 261-270, 2003.
- ROTHBALLER, M.; ECKERT, B.; SCHIMD, M.; FEKETE, A.; SCHLOTTER, M.; LEHNER, A.; POLLMANN, S. & HARTMANN. Endophytic root colonization of gramineous plants by *Herbaspirillum frisingense*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 66: 85-95, 2008.
- ROTHBALLER, M.; SCHMID, M.; KLEIN, I.; GATTINGER, A.; GRUNDMANN, S. & HARTMANN, A. Characterization of *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov. isolated from surface sterilized wheat roots, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56:1341–1348, 2006.
- SILVA, L.G.; MIGUENS, F.C. & OLIVARES, F.L. *Herbaspirillum seropedicae* and sugarcane endophytic interaction investigated by using high pressure freezing electron microscopy. *Braz. J. Microbiol.*, 34: 69 -71, 2003.
- SMIT, G.; LOGMAN, T.J.; BOERRIGTER, M.E.; KIJNE, J.W. & LUGTENBERG, B.J. Purification and partial characterization of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* Ca<sup>2+</sup> - dependent adhesin, which mediates the first step in attachment of cells of the family Rhizobiaceae to plant root hair tips. *J. Bacteriol.*, 171: 4054-4062, 1989.

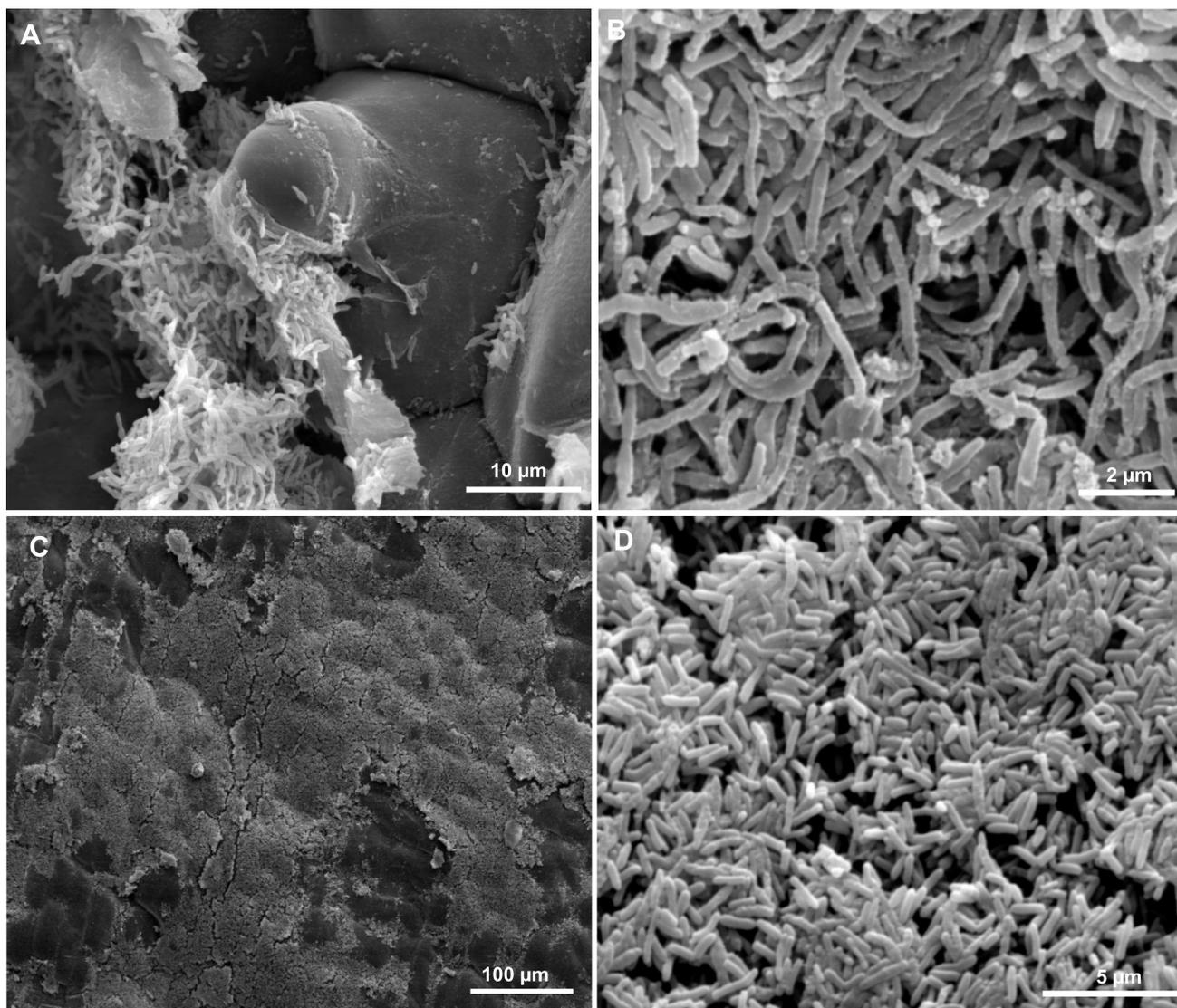
- URQUIAGA, S.; CRUZ, K.H.S. & BODDEY, R.M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 56:105-114, 1992.
- VALVERDE, A.; VELÁSQUEZ, E.; GUTIÉRREZ, C.; CERVANTES, E.; VENTOSA, A. & IGUAL, J. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Intl. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53: 1979-1983, 2003.
- WEBER, O.B.; CORREIA, D.; SILVEIRA, M.R.da; CRISÓSTOMO, L.A.; OLIVEIRA, E.M.de & SÁ, E.G. Efeito da bactéria diazotrófica em mudas micropropagadas de abacaxizeiro Cayenne Champac em diferentes substratos. *Pesq. Agrop. Bras.*, 38: 689-696, 2003a.
- 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. *Pesq. Agrop. Bras.*, 38: 1419-1426, 2003b.
- WEBER, O.B.; TEIXEIRA, K.R.S.; KIRCHHOF, G.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. *Plant Soil*, 210: 103-113, 1999.
- WHITEHEAD, N.A.; BARNARD, A.M.L.; SIMPSON, N.J.L. & SALMOND, G.P.C. Quorum-sensing in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25: 365-404, 2001.



**Figura 1.** Microscopia ótica de fluorescência (A, B, C, D, E) e microscopia ótica de campo claro (F) dos estágios iniciais da interação radicular entre *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 e plântulas de abacaxizeiro. (A) 6 horas após inoculação, predomínio de bactérias no formato filamentosos (seta) colonizando preferencialmente a superfície dos pêlos radiculares de forma isolada ou em pequenos agregados. (B) 1 dia após inoculação, as bactérias colonizavam também a base dos pêlos radiculares. (C, D) 2 dias após inoculação, as bactérias estavam dispostas na superfície dos pêlos radiculares na forma de agregados de tamanhos variados e predominavam bactérias no formato de bastonete (seta). (E) 7 dias após inoculação, as bactérias colonizavam as junções das células epidérmicas. (F) Imagem E em microscopia ótica.



**Figura 2.** Microscopia ótica de fluorescência (A, B), microscopia eletrônica de varredura (C) e microscopia ótica de campo claro (D) mostrando a colonização epifítica, infecção e colonização endofítica de *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 em raízes de plântulas de abacaxizeiro 14 dias após inoculação. (A) Intensa colonização bacteriana epifítica na parede periclinal das células epidérmicas radiculares. (B) Colonização principalmente nas regiões de emergência de raízes laterais (asterisco). (C) Infecção bacteriana através das cavidades (seta) formadas pela ruptura das células epidérmicas durante a emergência das raízes laterais (asterisco). (D) Colonização endofítica (seta) nos espaços intercelulares do parênquima cortical.



**Figura 3.** Microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes de *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 localizados epifiticamente na superfície das raízes e parte aérea de plântulas de abacaxizeiro após 21 dias de inoculação. (A) Biofilmes sobre os pêlos radiculares e (B) sobre a parede periclinal externa das células epidérmicas radiculares. (C) Biofilmes sobre a parede periclinal externa das células epidérmicas foliares e (D) detalhe das células bacterianas constituintes do biofilme.

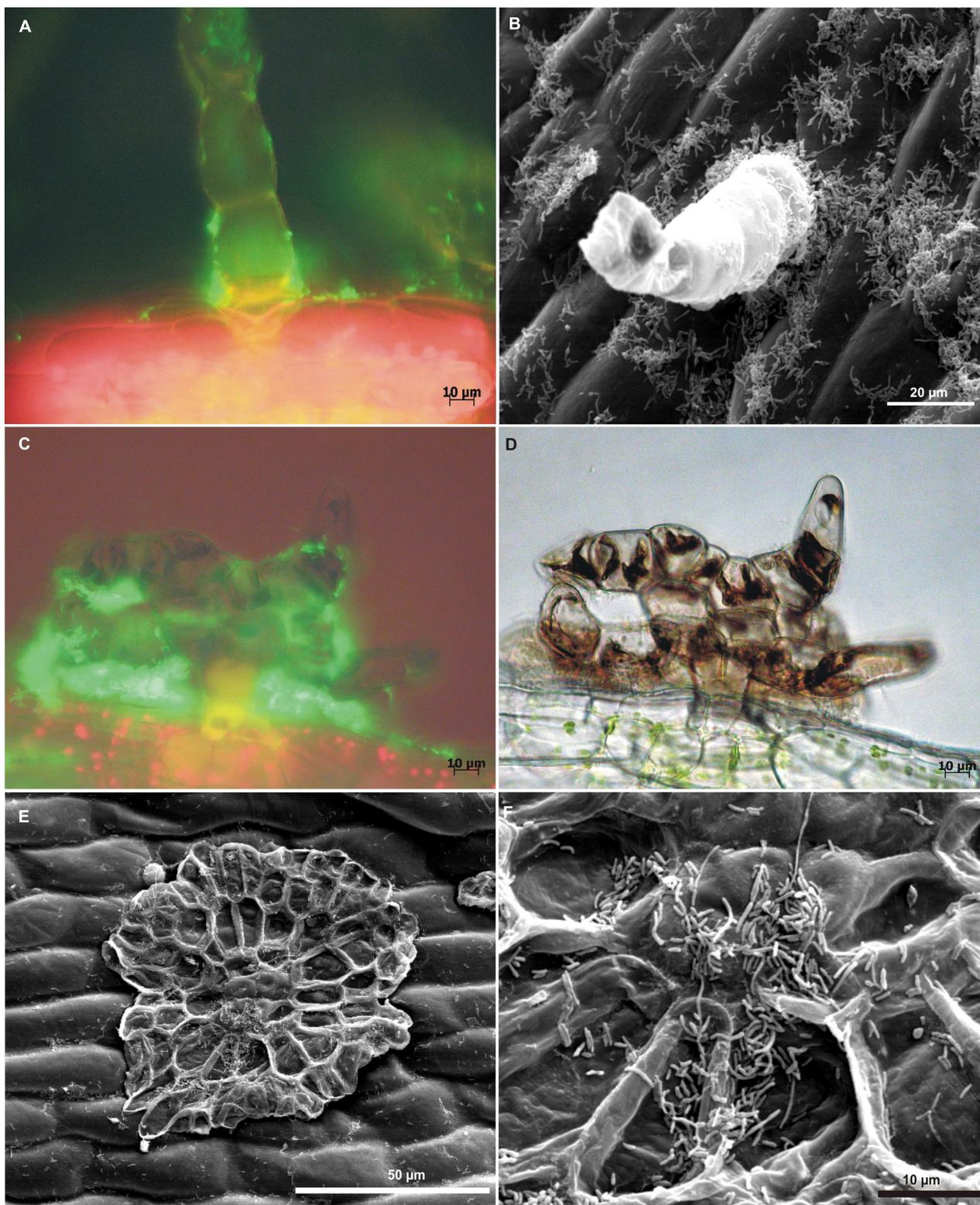
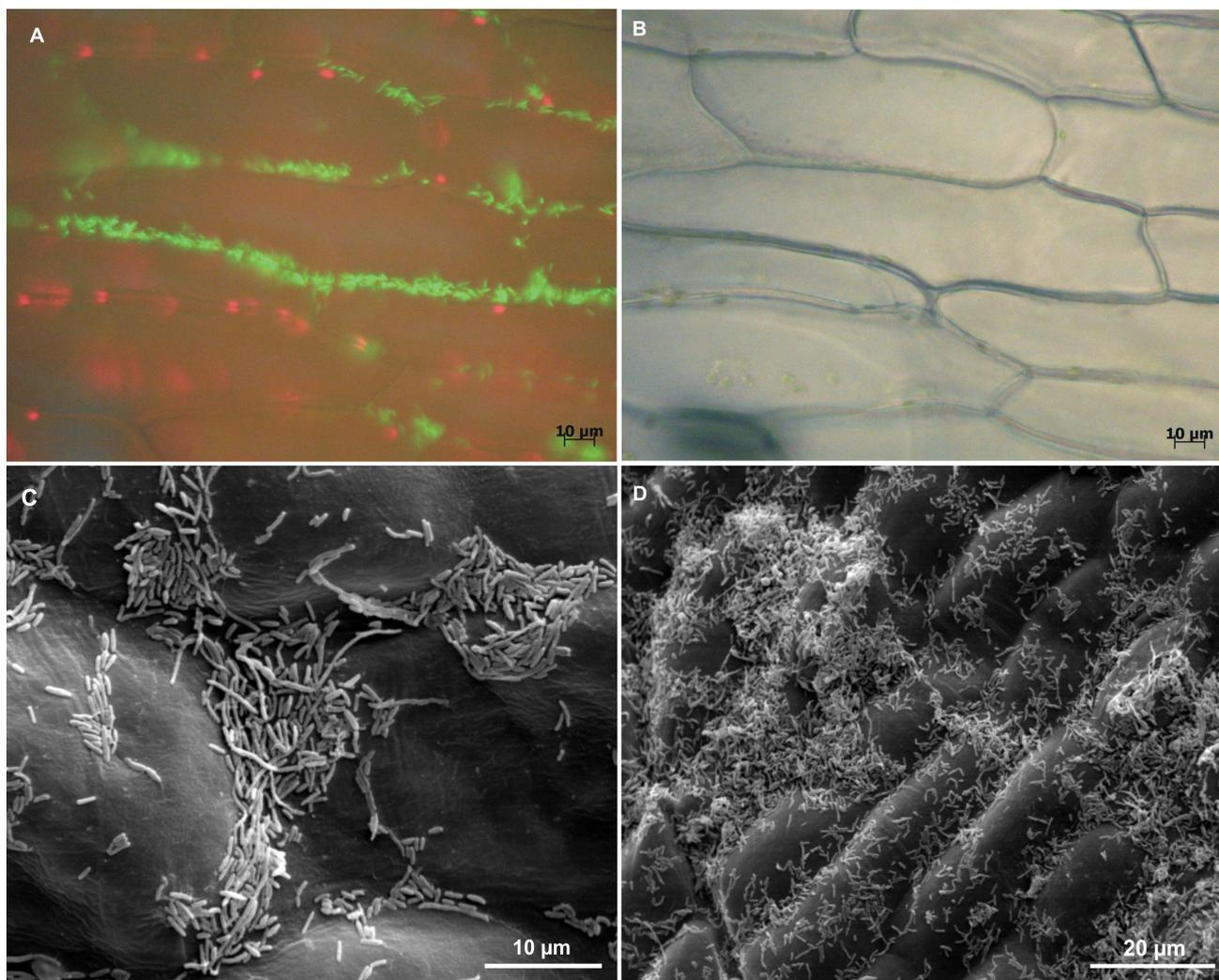
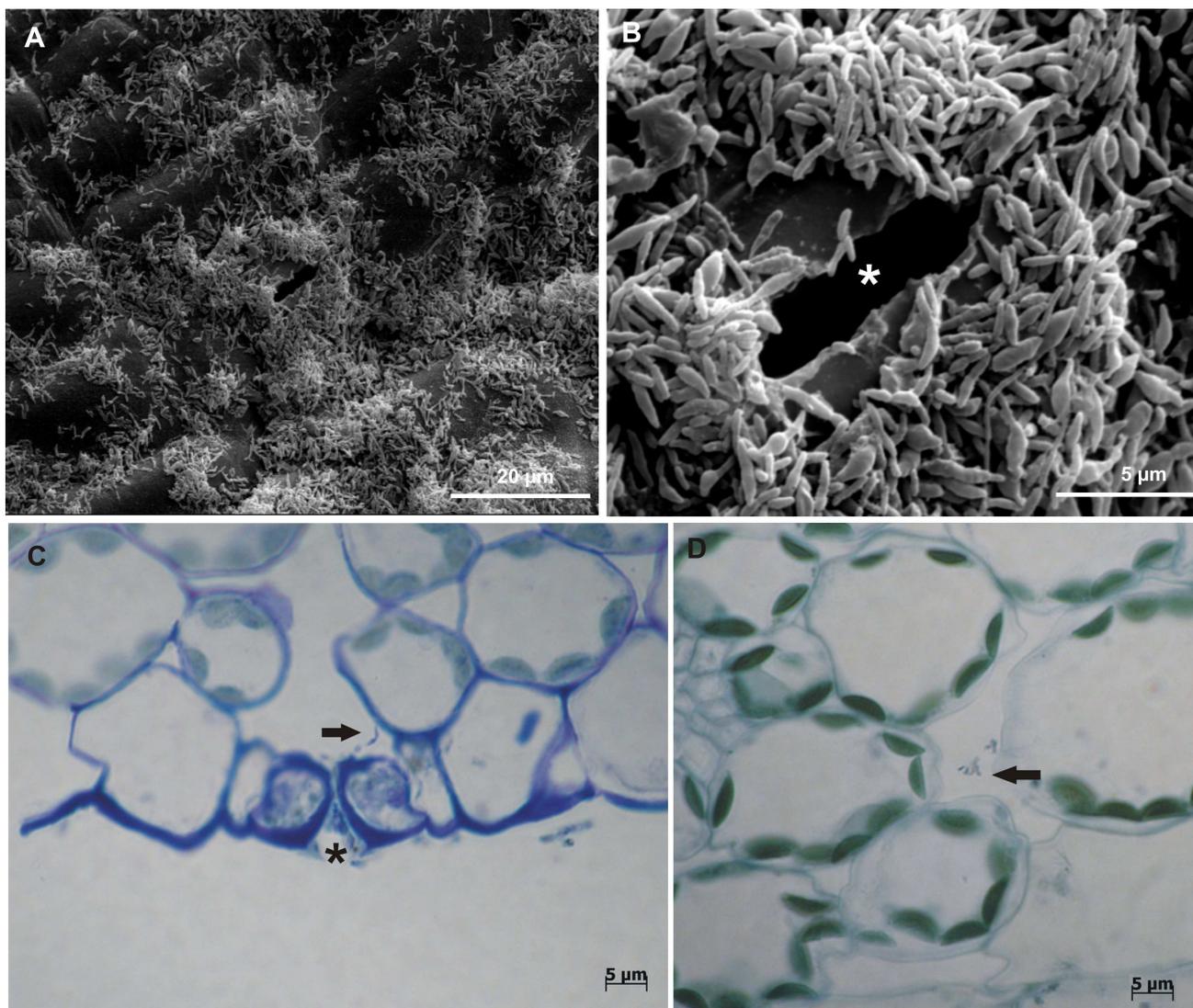


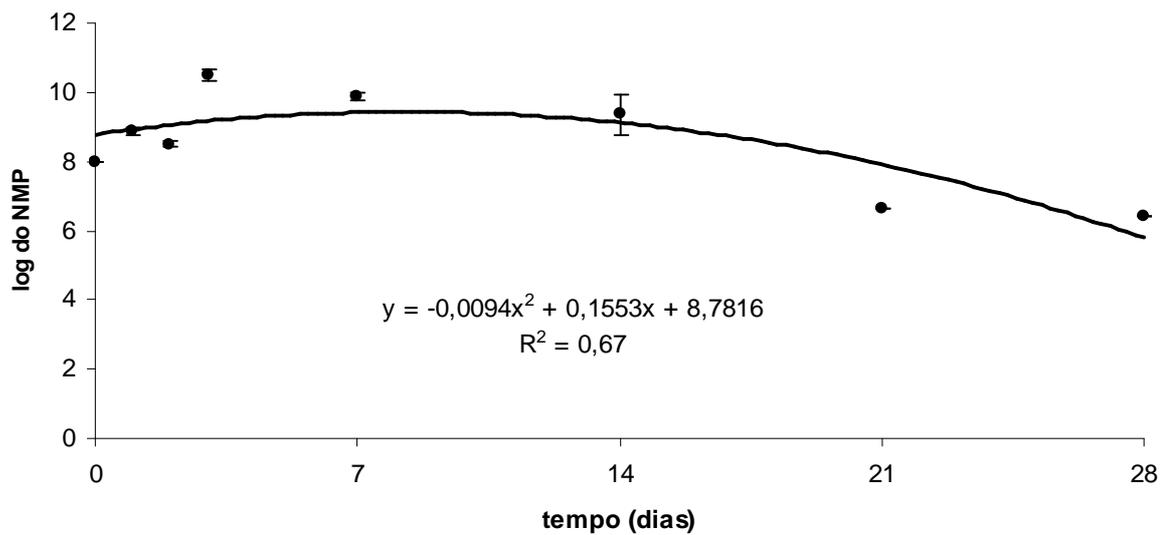
Figura 4. Microscopia ótica de fluorescência (A, C), microscopia eletrônica de varredura (B, E, F) e microscopia ótica de campo claro (D) da colonização epifítica foliar de *Herbaspirillum seropedicae* RAM 10 preferencialmente nos tricomas do abacaxizeiro. (A, B) Colonização bacteriana sobre e na base dos tricomas tectores. (C) Colonização bacteriana sobre e na base dos tricomas escamiformes. (D) Imagem C em microscopia ótica. (E) Tricoma escamiforme. (F) Detalhe das bactérias sobre o tricoma escamiforme.



**Figura 5.** Microscopia ótica de fluorescência (A), microscopia ótica de campo claro (B) e microscopia eletrônica de varredura (C, D) da colonização epifítica foliar de *Herbaspirillum seropedicae* RAM 10. (A) Colonização bacteriana nas flanges cuticulares. (B) Imagem A em microscopia ótica. (C) Detalhe dos agregados bacterianos nas flanges cuticulares. (D) Colonização bacteriana na parede periclinal externa das células epidérmicas.



**Figura 6.** Microscopia eletrônica de varredura (A, B) e microscopia ótica de campo claro (C, D) da colonização epifítica, infecção e colonização endofítica de *Herbaspirillum seropedicae* RAM 10 na parte aérea de plântulas de abacaxizeiro. (A) Bactérias colonizando epifiticamente a superfície das paredes periclinais externas das células epidérmicas. (B) Detalhe da colonização bacteriana no complexo estomático e infecção através do ostíolo (asterisco). (C) Infecção bacteriana através do ostíolo (asterisco) e colonização endofítica na câmara subestomática (seta). (D) Colonização bacteriana endofítica nos espaços intercelulares do parênquima clorofiliano (seta).



**Figura 7. Log do número mais provável (NMP) de *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 nas plântulas do abacaxizeiro 'Vitória' em resposta ao tempo.**

## DESEMPENHO DO ABACAXIZEIRO ‘VITÓRIA’ EM RESPOSTA À APLICAÇÃO DE ÁCIDOS HÚMICOS DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO<sup>(1)</sup>

Lílian Estrela Borges Baldotto<sup>(2)</sup>, Marihus Altoé Baldotto<sup>(3)</sup>, Validoro Bazoni Giro<sup>(4)</sup>, Luciano Pasqualoto Canellas<sup>(3)</sup>, Fábio Lopes Olivares<sup>(5)</sup>, Ricardo Bressan-Smith<sup>(6)</sup>

### RESUMO

A aclimatização de mudas de abacaxizeiro propagadas por cultura *in vitro* é um processo lento. A promoção do crescimento radicular pelo uso de ácidos húmicos pode ser útil durante esse processo. O objetivo neste trabalho foi avaliar o desempenho do abacaxizeiro ‘Vitória’ propagado por cultura de tecidos em resposta à aplicação de diferentes doses de ácidos húmicos isolados de vermicomposto e de torta de filtro durante o período de aclimatização em casa de vegetação. Foram avaliadas as características anatômicas da lâmina foliar, teor de pigmentos fotossintéticos, crescimento da parte aérea e do sistema radicular e o conteúdo de nutrientes foliares. Os resultados mostraram incrementos no

---

<sup>(1)</sup> Parte da Tese de Doutorado da primeira autora. Recebido para publicação em 17/12/2008 e aceito em 18/05/2009 na Revista Brasileira de Ciência do Solo.

<sup>(2)</sup> Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Av. Alberto Lamego, 2000, CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes, RJ. E-mail: liborges@uenf.br

<sup>(3)</sup> Professor do Laboratório de Solos da UENF. E-mails: marihus@uenf.br; canellas@uenf.br

<sup>(4)</sup> Bolsista de Iniciação Científica do Laboratório de Solos da UENF. E-mail: validoroagro2009@yahoo.com.br

<sup>(5)</sup> Professor do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da UENF. E-mail: fabioliv@uenf.br

<sup>(6)</sup> Professor do Laboratório de Fisiologia Vegetal da UENF. E-mail: bressan@uenf.br

crescimento e desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular com a aplicação de ácidos húmicos, bem como acúmulo significativo de N, P, K, Ca e Mg e aumento na relação clorofila *a* / clorofila *b*. A promoção do crescimento das mudas durante o período de aclimatização, em resposta à aplicação de ácidos húmicos, pode melhorar a adaptação do abacaxizeiro ao ambiente *ex vitro*.

**Termos de indexação:** *Ananas comosus*, cultura de tecidos, substâncias húmicas, nutrição mineral, bioatividade.

**SUMMARY: PERFORMANCE OF PINEAPPLE 'VITÓRIA' IN RESPONSE TO HUMIC ACIDS APPLICATION DURING ACCLIMATIZATION**

*The acclimation of pineapple plantlets propagated by plant tissue culture takes a long time. The promotion of root growth by the use of humic acids may be useful during this process. The aim of this work was to evaluate the performance of the pineapple 'Vitória' propagated by plant tissue culture in response to the application of different doses of humic acids isolated from vermicompost and filter cake during greenhouse acclimation. Leaf anatomy, photosynthetic pigments content, shoot and root growth and leaf nutrients were evaluated. An increase in growth and development of shoot and root system with the application of humic acids as well as significant accumulation of N, P, K, Ca and Mg and increase in the chlorophyll *a* / chlorophyll *b* were observed with the application of HA. Growth promotion of plantlets during their period of acclimation in response to the application of humic acids can improve their adaptation to the *ex vitro* environmental conditions.*

*Index terms: Ananas comosus, tissue culture, humic substances, mineral nutrition, bioactivity.*

## INTRODUÇÃO

A propagação do abacaxizeiro por cultura *in vitro* é uma estratégia utilizada para elevar a qualidade e produtividade da abacaxicultura, devido, entre outros fatores, à uniformidade e sanidade das mudas. A produção *in vitro* de mudas de abacaxizeiro já está bem estabelecida (Guerra et al.,

1999; Teixeira et al., 2001; Almeida et al., 2002; Barboza et al., 2004). Após as plantas atingirem desenvolvimento adequado sob condições *in vitro* (Teixeira et al., 2001), estas são aclimatadas em condições *ex vitro* para posterior adaptação às condições de campo.

O período de aclimatização é necessário, pois plantas cultivadas *in vitro* apresentam características anatômicas e fisiológicas desfavoráveis para enfrentar as condições edafoclimáticas no campo, como, por exemplo, metabolismo heterotrófico (Campostrini & Otoni, 1996; Moreira, 2001), menor espessamento da cutícula e das paredes periclinais externas das células epidérmicas e menor densidade estomática (Barboza et al., 2006). A redução da umidade do ar e da disponibilidade de nutrientes durante a aclimatização tendem a tornarem-se componentes limitantes para o abacaxizeiro, aumentando sua susceptibilidade a variações ambientais drásticas, mesmo favorecido pelo mecanismo fotossintético ácido inerente às crassuláceas.

Os longos períodos exigidos de aclimatização para o abacaxizeiro oneram a sua produção *in vitro*. Para exemplificar, é necessário um período variável entre 6 a 8 meses em casa de vegetação para que as plantas alcancem entre 20 a 30 cm de altura, tamanho adequado para a transferência para o campo (Teixeira et al., 2001).

Diversos estudos têm sido realizados objetivando diminuir o período de aclimatização do abacaxizeiro, com a finalidade de acelerar o crescimento da planta, como, por exemplo, aplicação foliar de macro e micronutrientes (Moreira et al., 2007; Bregonci et al., 2008), aplicação de reguladores de crescimento (Catunda et al., 2008), inoculação de bactérias promotoras de crescimento e proteção vegetal (Mello et al., 2002; Weber et al., 2003), tipos de recipientes usados no enraizamento (Souza Júnior et al., 2001; Bregonci et al., 2008) e de substratos (Souza Júnior et al., 2001; Weber et al., 2003; Moreira et al., 2006; Catunda et al., 2008).

Em relação ao substrato, a adição de matéria orgânica favorece o crescimento da parte aérea e do sistema radicular do abacaxizeiro durante a aclimatização (Moreira et al., 2006). Por sua vez, a matéria orgânica é constituída por produtos da decomposição de resíduos orgânicos e do metabolismo microbiano e também por substâncias húmicas (Guerra et al., 2008). Notadamente, as substâncias húmicas constituem a maior parte da matéria orgânica dos solos e são compostas por huminas, ácidos fúlvicos e ácidos húmicos (Guerra et al., 2008). Os ácidos húmicos (AH), formados por agregados moleculares heterogêneos e estabilizados por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas (Piccolo, 2001), atuam favorecendo o desenvolvimento do sistema radicular (Façanha et al., 2002; Rodda et al., 2006; Zandonadi et al., 2007), o acúmulo de nutrientes (Vaughan & Malcolm, 1985; Chen & Avid, 1990; Chen et al., 2004) e a biossíntese de clorofilas (Ferrara & Brunetti, 2008). Para culturas como arroz (Tejada & Gonzalez, 2004), trigo (Delfine et al., 2005) e videira (Ferrara & Brunetti, 2008), tem sido relatada a promoção de crescimento pela aplicação

foliar de AH. Em abacaxizeiro, o uso de AH poderia ser uma estratégia viável na aclimatização de plantas propagadas *in vitro*, pois poderia promover maior crescimento, resultando em redução no longo tempo necessário para a transferência das plantas para o cultivo em condições de campo.

Portanto, objetivou-se, neste trabalho, avaliar, durante o processo de aclimatização, o crescimento da planta, as características anatômicas da lâmina foliar e o teor de pigmentos fotossintéticos, bem como o acúmulo de nutrientes foliares do abacaxizeiro 'Vitória' propagado *in vitro*, em resposta à aplicação de diferentes doses de ácidos húmicos, isolados de vermicomposto e de torta de filtro.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material Vegetal

Plântulas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill), da cultivar Vitória (INCAPER, 2006), propagadas *in vitro*, em potes de vidro tipo *baby food*, foram fornecidas pelo Laboratório de Biotecnologia BioMudas e mantidas em meio MS descrito por Murashige & Skoog (1962), sem adição de reguladores de crescimento e vitaminas. As plântulas *in vitro* foram mantidas em sala de crescimento, com fluxo de fótons fotossintéticos de  $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , temperatura de  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas. A cada três meses as plântulas foram transferidas para novo meio, em tubos de ensaio. Para realização das etapas experimentais posteriores, foram selecionadas mudas com aproximadamente 1,5 g de matéria fresca.

### Tratamentos

A matriz experimental [(3 x 2) + 1] consistiu dos seguintes fatores em estudo: três doses (10, 20 e 40  $\text{mmol L}^{-1}$  de C) de ácidos húmicos isolados de vermicomposto (AHv), três doses (10, 20 e 40  $\text{mmol L}^{-1}$  de C) de ácidos húmicos isolados de torta de filtro (AHtf) e controle, sem aplicação de ácidos húmicos. Os ácidos húmicos isolados de vermicomposto e torta de filtro foram previamente caracterizados por Baldotto et al. (2007) e Busato (2008). As plântulas foram retiradas dos tubos de ensaio, lavadas em água corrente para a limpeza do meio de cultivo, e o sistema radicular e a base da parte aérea dos abacaxizeiros foram imersos nas soluções dos tratamentos por 24 horas. Para esse procedimento, as plântulas foram colocadas em potes de vidro tipo *baby food* contendo 50 mL de solução correspondentes aos diferentes tratamentos. Posteriormente, os abacaxizeiros foram transferidos para vasos de  $0,5 \text{ dm}^3$  contendo substrato comercial Plantmax® Hortaliças para serem

aclimatados, em casa de vegetação, por um período de 150 dias. A cada 15 dias durante a aclimatização, as plantas receberam 5 mL de solução dos tratamentos e 5 mL de solução nutritiva (Hoagland & Arnon, 1950), aplicadas nas axilas das folhas basais dos abacaxizeiros, usando-se pipeta automática.

A unidade experimental consistiu em uma planta de abacaxi por vaso. O experimento foi realizado no delineamento em blocos ao acaso, com seis repetições, totalizando 42 unidades experimentais.

### **Análises de crescimento**

Aos 150 dias de aclimatização, as plantas foram coletadas para a mensuração das seguintes variáveis: número de folhas (NF); altura das plantas (ALT), medida pela distância compreendida entre o colo da planta até o ápice foliar usando-se fita métrica; diâmetro do caule (DC), mensurado com paquímetro digital modelo Starret 727; diâmetro da roseta (DR), medido na maior distância linear entre o ápice de folhas opostas, mensurado com fita métrica; matéria fresca da raiz (MFR) e da parte aérea (MFPA); matéria seca da raiz (MSR) e da parte aérea (MSPA), obtidas pela secagem em estufa sob ventilação forçada de ar a 60 °C por 7 dias e posterior pesagem; área foliar (AF), obtida no medidor de área foliar de bancada modelo LI-3100, LI-COR, USA; área radicular (AR), medida após a digitalização das raízes e posterior análise das imagens no programa Delta –T SCAN Image Analyzer; relação raiz: parte aérea (RPA), obtida pela razão entre a matéria seca da raiz e a matéria seca da parte aérea.

### **Análises nutricionais**

Após a secagem, as folhas de abacaxizeiro foram moídas em moinho do tipo Wiley acoplado a peneiras de 60 malhas  $\text{cm}^{-2}$ . Em seguida, o pó obtido foi submetido à digestão sulfúrica combinada com peróxido de hidrogênio e determinados os teores totais de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg). Para N, foi utilizado o método de Nessler; o teor de P foi obtido por espectrofotometria de absorção molecular (colorimetria), após reação com vitamina C e molibdato de amônio, no comprimento de onda de 725 nm; a determinação de K foi realizada por fotometria de chama e os teores de Ca e de Mg foram obtidos por espectrofotometria de absorção atômica. Todas as análises foram realizadas conforme os métodos usuais para a cultura do abacaxizeiro (Ramos et al., 2006). Os conteúdos de N, P, K, Ca e Mg foram estimados por meio da multiplicação da matéria seca da parte aérea pelo teor do nutriente considerado.

### **Análises anatômicas**

Cortes transversais do terço médio da lâmina foliar da sétima folha completamente expandida (observada como sendo a de maior comprimento) foram feitos à mão livre usando navalha de aço e as lâminas histológicas foram montadas em glicerina na proporção 50 % água (Purvis et al., 1964). As observações foram realizadas por meio do microscópio ótico Axioplan - Zeiss acoplado a uma câmara fotográfica digital Canon Power Shot A640, a aquisição das imagens foi feita por meio do programa Zoom Browser EX e as medições no programa Image J (Abramoff et al., 2004). Foram mensurados os comprimentos do parênquima aquífero e do parênquima clorofiliano. As lâminas foliares foram prensadas em fita vegetal, com uma gota de acetona 100 %, para dissociação da epiderme abaxial, com posterior quantificação do número de estômatos, em uma área de 0,12 mm<sup>2</sup> (objetiva de aumento 20 e zoom digital de aumento 1,4) entre os feixes de fibras.

### **Análises dos pigmentos fotossintéticos**

O teor de clorofila foi estimado por meio da determinação da intensidade de cor verde da sétima folha completamente expandida do abacaxizeiro, usando-se um medidor portátil de clorofila modelo SPAD-502 (Soil Plant Analysis Development, Minolta, Japão), com três medições por folha.

Posteriormente, três discos foliares de 1,5 cm de diâmetro foram retirados da mesma folha para determinação do teor de pigmentos fotossintéticos (Hiscox & Israelstam, 1979). Os discos foliares foram imersos em 3,0 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e mantidos no escuro até ficarem translúcidos. As leituras em espectrofotômetro foram feitas nas absorvâncias de 480, 649 e 665 nm (A480, A649 e A665, respectivamente) e os conteúdos dos pigmentos fotossintéticos foram determinados conforme Wellburn (1994):

$$[\text{Clorofila } a] (\mu\text{g mL}^{-1}) = 12,19 \cdot A_{665} - 3,45 \cdot A_{649}$$

$$[\text{Clorofila } b] (\mu\text{g mL}^{-1}) = 21,99 \cdot A_{649} - 5,32 \cdot A_{665}$$

$$[\text{Carotenóides}] (\mu\text{g mL}^{-1}) = (1000 \cdot A_{480} - 2,14 \cdot \text{Clorofila } a - 70,16 \cdot \text{Clorofila } b) / 220$$

### **Análises estatísticas**

Os resultados foram submetidos à análise de variância e os efeitos dos tratamentos, para as variáveis qualitativas, foram desdobrados em contrastes médios (Quadro 1), conforme Alvarez V. & Alvarez (2006). Para os fatores quantitativos, foram ajustadas equações de regressão entre as médias das variáveis estudadas e as doses de AH. A aplicação do teste F, aos desdobramentos dos fatores, foi realizada aos níveis de 5 e 1 % de probabilidade. Na análise de regressão, os modelos foram testados quando apresentaram coeficiente de determinação superior a 0,60. As equações de regressão foram utilizadas para determinação da dose de máxima eficiência física de matéria seca do abacaxizeiro, em função das doses de AH.

## RESULTADOS

De posse das médias apresentadas no quadro 2, foram obtidos os contrastes médios (Quadro 3) conforme Alvarez V. & Alvarez (2006). Os contrastes médios representam a diferença, em magnitude real, entre a média dos tratamentos comparados para as características morfológicas e nutricionais do abacaxizeiro. Foi possível observar diferenças significativas no crescimento e desenvolvimento do abacaxizeiro propagado *in vitro*, durante a aclimatização, com a aplicação de AH. O contraste que compara a área foliar das plantas de abacaxi entre o controle e os demais tratamentos (controle versus AH) mostrou incremento, em média, de 64,71 cm<sup>2</sup>. Tal valor corresponde a um incremento de 51,53 % dos tratamentos que receberam AH sobre o controle. Observa-se que esse efeito é significativo a 1 % de probabilidade pelo teste F (Quadro 3). Nesse sentido, ao comparar o tratamento controle, nota-se que a aplicação de AH proporcionou incrementos em todas as características morfológicas da parte aérea do abacaxizeiro 'Vitória'. Para exemplificar, observa-se o aumento de 10,12 % no número de folhas e de 59,13 % de matéria seca foliar (Quadro 3).

O sistema radicular do abacaxizeiro também foi significativamente alterado com a aplicação de AH (Quadro 2). Foram observados incrementos na matéria fresca da raiz, matéria seca da raiz e área radicular, nos tratamentos com AH, correspondendo a, aproximados, 70, 57 e 39 %, respectivamente, quando comparado ao controle (Quadro 3).

A promoção do crescimento das mudas resultou, também, em aumentos significativos no conteúdo de N, P, K, Ca e Mg nos tratamentos com AH (Quadro 2), com respectivos valores de, aproximadamente, 52, 71, 50, 58, 60 %, quando comparado ao controle (Quadro 3).

Não houve diferenças significativas, em média, nas variáveis de crescimento e acúmulo de nutrientes para as fontes distintas de AH (Quadro 3).

Os ácidos húmicos não promoveram mudanças qualitativas e quantitativas na organização anatômica da lâmina foliar (Figura 1, Quadro 4 e 5). A anatomia comparada das lâminas foliares do abacaxizeiro ‘Vitória’, após 150 dias de aclimatização, tratadas ou não com AH, é delimitada por epiderme uniestratificada, com contorno sinuoso das paredes celulares anticlinais (Figura 1 A), paredes periclinais externas, com cutícula espessa e presença de corpos silicosos. Abaixo da epiderme situa-se a hipoderme (Figura 1 B). As folhas são hipoestomáticas e os estômatos encontram-se dispostos em faixas paralelas entre os cordões de fibras, com densidade aproximada de 100 estômatos  $\text{mm}^{-2}$ . Tricomas tectores e escamiformes (Figura 1 C) estão presentes em ambas as faces da epiderme. O mesofilo é dorsiventral, apresentando parênquima aquífero, com células grandes e paredes delgadas e, parênquima clorofiliano, com células pequenas e arredondadas (Figura 1 C). Cristais do tipo ráfide (Figura 1 D) estão presentes no mesofilo, tanto no parênquima aquífero quanto no parênquima clorofiliano. O parênquima clorofiliano circunda os feixes vasculares colaterais e apresenta cordões de fibras (Figura 1 E).

Com relação aos teores dos pigmentos fotossintéticos, incluindo clorofila *a*, clorofila *b* e carotenóides, em média, pouco variaram entre os tratamentos (Quadro 4), não apresentando contrastes significativos (Quadro 5). Entretanto, foi detectado aumento significativo na relação entre clorofila *a* e clorofila *b*, com aplicação de AH, com incrementos de 11,54 %, quando comparado ao controle (Quadro 5).

Não houve diferença significativa, em média, entre os AH usados para as variáveis anatômicas e para os teores de pigmentos fotossintéticos (Quadro 5).

As respostas das características de crescimento, da parte aérea do abacaxizeiro, mostraram incrementos curvilíneos com taxas quadráticas ou raízes quadráticas, em função do aumento das doses de ácidos húmicos (Quadro 6). Por meio das equações de regressão, foram calculados o acúmulo máximo de matéria seca da parte aérea do abacaxizeiro, para os tratamentos com AHv e AHtf que foram de 1,85 g planta<sup>-1</sup> e de 1,61 g planta<sup>-1</sup>, respectivamente. Além disso, com base nas equações de regressão, observou-se que o AHv proporcionou acúmulo de matéria seca com dose inferior (15,68  $\text{mmol L}^{-1}$  de C) a do AHtf (21,19  $\text{mmol L}^{-1}$  de C), conferindo maior bioatividade ao AHv (Quadro 6). As taxas de incremento (coeficiente angular das equações de regressão) para o AHv foram, de forma geral, superiores às aquelas apresentadas pelo AHtf (Quadro 6).

De forma análoga ao observado para parte aérea, as curvas de resposta das características de crescimento do sistema radicular, de acúmulo de nutrientes e dos pigmentos fotossintéticos, à aplicação de doses crescentes de AH, apresentaram taxas quadráticas ou raízes quadráticas (Quadro 6).

## DISCUSSÃO

O abacaxizeiro ‘Vitória’, lançado pela Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical e pelo Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural, em 2006, apresenta como características principais, a resistência à fusariose, folhas sem espinhos, frutos cilíndricos com casca amarelada, polpa branca com elevado teor de açúcar e bom perfilhamento (INCAPER, 2006). Com relação à anatomia foliar, foi observado (Figura 1) que o abacaxizeiro ‘Vitória’ apresenta características semelhantes às descritas para outras cultivares de *Ananas comosus*, como por exemplo, presença de tricomas escamiformes, epiderme uniestratificada revestida por cutícula, contorno sinuoso das paredes anticlinais das células epidérmicas, presença de corpos silicosos, presença de ráfides, presença de hipoderme, mesofilo constituído de parênquima aquífero e clorofiliano, presença de cordões de fibras, estômatos na face epidérmica abaxial dispostos no sentido longitudinal de forma paralela (Py, 1969; d’Eeckenbrugge & Leal, 2003; Barboza et al., 2006; Proença & Sajo, 2007). Essas características anatômicas, invariavelmente, levam à retenção de água na planta, que pode ser explicada pela presença de hipoderme, parênquima aquífero, tricomas escamiformes e folhas hipoestomáticas (Apezzato-da-Glória & Carmello-Guerreiro, 2003; Larcher, 2000; d’Eeckenbrugge & Leal, 2003). Outras levam à dissipação de energia luminosa, como a presença de tricomas escamiformes, que refletem a luz (Py, 1969; Larcher, 2000; d’Eeckenbrugge & Leal, 2003). A presença constante de cristais de oxalato de cálcio, do tipo ráfide, nas células do mesofilo e corpos silicosos nas células epidérmicas do abacaxizeiro ‘Vitória’ também podem ser consideradas características anatômicas que auxiliam na reflexão da luz (Franceschi & Horner, 1980; Proença & Sajo, 2007). Tais características anatômicas, favoráveis a uma melhor tolerância às condições ambientais, não foram afetadas pela aplicação de AH durante a aclimatização.

O período de aclimatização do abacaxizeiro é considerado crítico, por causa da lentidão do crescimento do sistema radicular e da parte aérea (Moreira, 2001; Barboza et al., 2006). A aplicação de AH durante aclimatização resultou em incrementos significativos no crescimento e desenvolvimento das plantas em relação ao controle. Também foram observados aumentos nos conteúdos dos nutrientes foliares de N, P, K, Ca e Mg (Quadro 2 e 3).

O uso do AHv na promoção do crescimento vegetal está bem documentado (Cacco & Dell’Agnola, 1984; Nardi et al., 1996; Masciandaro et al., 1999; Dell’Agnola e Nardi, 1987; Muscolo e Nardi, 1997; Muscolo et al., 1999; Façanha et al., 2002; Canellas et al., 2002; Quaggiotti et al., 2004; Canellas et al., 2006; Rodda et al., 2006; Zandonadi et al., 2007). Neste trabalho, não foram observadas diferenças no crescimento e acúmulo de nutrientes, entre as diferentes fontes de

AH. Há pouca informação sobre a ação de AH<sub>tf</sub>, mas é possível que AH<sub>tf</sub> represente uma alternativa às limitações de disponibilidade de esterco para a vermicompostagem, nas áreas de produção de cana-de-açúcar (Marques Jr et al., 2008).

Grande parte dos efeitos bioestimulantes dos ácidos húmicos tem sido creditada à sua atividade similar a hormônios vegetais da classe das auxinas, ou seja, podendo promover o crescimento vegetal, em concentrações relativamente pequenas. Alguns mecanismos de ação têm sido propostos para explicar a indução do crescimento radicular pelos AH, tais como a formação de complexos solúveis, com cátions na rizosfera (Chen & Avid, 1990) e um suposto aumento da permeabilidade da membrana plasmática, pela ação surfactante dos AH (Visser, 1983). Se, por um lado, a alteração da propriedade de permeabilidade seletiva da plasmalema, em tese, possa aumentar a entrada de íons, por outro, pode favorecer também a saída, uma vez que a ação surfactante não preserva a seletividade das membranas (Nardi et al., 2002).

Canellas et al. (2008) verificaram que plântulas de milho, tratadas com AH<sub>v</sub>, modificam o seu perfil de exsudação radicular de ácidos orgânicos aumentando, significativamente, a extrusão de ácido cítrico e oxálico. Em contato com o ambiente acidificado da rizosfera, as partículas supra-estruturais dos ácidos húmicos podem se fragmentar e gerar subunidades potencialmente capazes de alterar o metabolismo celular, por meio da ativação de H<sup>+</sup>ATPases da membrana plasmática de células de raiz (Piccolo, 2001; Façanha et al., 2002; Canellas et al., 2006). Estes mecanismos levam à acidificação do apoplasto e a ativação de exo-enzimas degradadoras de parede celular, tornando-a mais susceptível a ação da pressão de turgescência vacuolar. Com isso, ocorre a expansão celular e, por consequência, a do tecido radicular (Hager et al., 1991; Frias et al., 1996). Tal mecanismo pode explicar os resultados obtidos, de promoção do desenvolvimento radicular e acúmulo de nutrientes das plantas de abacaxizeiro submetidas à aplicação de AH (Quadro 2 e 3). É possível que a ativação das H<sup>+</sup>ATPases pelos AH promova a despolarização da membrana plasmática e, com isso, a ativação de transportadores secundários responsáveis pelo incremento da absorção de macro e micronutrientes (Sondergaard et al., 2004).

Somados aos aspectos de crescimento e nutricionais, possíveis efeitos fisiológicos, manifestados pela quantificação de pigmentos fotossintéticos na presença de AH, aplicado na parte aérea foram avaliados. Os tratamentos com ácidos húmicos proporcionaram maiores teores de pigmentos fotossintéticos e um acréscimo significativo na razão entre clorofila *a* e clorofila *b*, quando comparados ao controle (Quadros 4 e 5). Esse fato indica que a aplicação de AH no abacaxizeiro 'Vitória', durante o processo de aclimatização, favorece o estabelecimento das plantas *ex vitro* e, possivelmente, o posterior estabelecimento no campo. Incrementos nos teores de clorofila decorrentes da aplicação foliar de AH (5 e 20 mg L<sup>-1</sup>) em videiras 'Itália' foram observados

previamente por Ferrara & Brunetti (2008) que, no entanto, verificaram diminuição da razão entre clorofila *a* e clorofila *b*. Por outro lado, Liu et al. (1998) verificaram que a aplicação de ácidos húmicos (0, 100, 200, 400 mg L<sup>-1</sup>) na gramínea *Agrostis stolonifera* não alterou o teor de clorofila, apesar de ter afetado o processo fotossintético. As diferenças encontradas na literatura (Liu et al., 1998; Ferrara & Brunetti, 2008) indicam a presença de interações entre os fatores: fonte e dose de AH, genótipo e ambiente de cultivo.

No presente trabalho, as curvas de respostas à aplicação de doses crescentes de ácidos húmicos apresentaram variação quadrática e raiz quadrática, evidenciando o efeito “dose dependente” dos AH no desenvolvimento das plantas. Os resultados indicam a possibilidade do uso de AH na aceleração do crescimento vegetal, durante a fase de aclimatização das plantas propagadas *in vitro* de abacaxizeiro, o que pode representar alternativa importante para a agricultura orgânica ou para a redução de custos de produção, com base na maior eficiência de absorção dos nutrientes e crescimento.

## CONCLUSÕES

1. Ácidos húmicos isolados de vermicomposto e de torta de filtro promoveram o crescimento vegetal de plantas originadas de cultura *in vitro* do abacaxizeiro ‘Vitória’ na fase de aclimatização, uma vez que foram observados incrementos no crescimento da parte aérea, do sistema radicular e nos conteúdos de N, P, K, Ca e Mg, além de resultar em aumento da relação clorofila *a* / clorofila *b*.

2. Os ácidos húmicos isolados de vermicomposto se mostraram mais bioativos que os de torta de filtro, já que promovem o crescimento vegetal, de plantas de abacaxizeiro, com menor dose aplicada (15 mmol L<sup>-1</sup> de C).

3. A promoção do crescimento das mudas de abacaxizeiro propagadas *in vitro* pela aplicação de ácidos húmicos melhora a adaptação das plântulas ao ambiente *ex vitro*, reduzindo o período de aclimatização.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laboratório Biomudas, pelo fornecimento das mudas *in vitro* de abacaxizeiro, ao CNPq (projetos n. 484671/2007-3 e 308368/2007-0), Instituto Milênio

MCT/CNPq, FAPERJ e IFS, pelo auxílio financeiro, ao professor Dr. Pedro Henrique Monnerat (UENF) e ao Sr. José Acácio da Silva (UENF), pela colaboração nas análises nutricionais.

### LITERATURA CITADA

- ABRAMOFF, M.D., MAGELHAES, P.J. & RAM, S.J. "Image Processing with ImageJ". *Biophotonics Intl.*, 11:36-42, 2004.
- ALMEIDA, W.A.B.; SANTANA G.S.; RODRIGUEZ, A.P.M. & COSTA, M.A.P.C. Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. *Rev. Bras. de Frutic.*, 24: 296-300, 2002.
- ALVAREZ V. V.H. & ALVAREZ, G.A.M. Comparações de médias ou testes de hipóteses? *Contrastes! Boletim Informativo da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo*, 31: 24-34, 2006.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. & CARMELLO-GUERREIRO, S.M. *Anatomia Vegetal*. 1.ed. Viçosa, UFV, 2003. 438p.
- BALDOTTO, M.A.; CANELLAS, L.P.; CANELA, M.C.; SIMÕES, M.L.; MARTIN-NETO, L.; FONTES, M.P.F. & VELLOSO A.C.X. Propriedades redox e grupos funcionais de ácidos húmicos isolados de adubos orgânicos. *R. Bras. Ci. Solo*, 31: 465-475, 2007.
- BARBOZA, S.B.S.C.; CALDAS, L.S. & SOUZA, L.A.C. Micropropagação do híbrido PExSC-52 e da cultivar Smooth Cayenne de abacaxizeiro. *Pesq. Agropec. Bras.*, 39: 725-733, 2004.
- 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. *Pesq. Agropec. Bras.*, 41: 185-194, 2006.
- BREGONCI, I.S.; SCHMILDT, E.R.; COELHO, R.I.; REIS, E.F.; BRUM, V.J. & SANTOS, J.G. Adubação foliar com macro e micronutrientes no crescimento de mudas micropropagadas do abacaxizeiro cv. Gold [*Ananas comosus* (L.) Merrill] em diferentes recipientes. *Ciênc. Agrotec.*, 32:705-711, 2008.
- BUSATO, J.G. Química do húmus e fertilidade do solo após adição de adubos orgânicos. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Campos dos Goytacazes, RJ, 2008. 135p.
- CACCO, G. & DELL'AGNOLA, G. Plant growth regulator activity of soluble humic complexes. *Can. J. Soil Sci.*, 64: 225-228, 1984.
- CAMPOSTRINI, E. & OTONI, W.C. Aclimatização de Mudanças: Abordagens Recentes. *ABCTP Notícias, CNPH/EMBRAPA, Brasília*, n.25, 1996. 12p.

- CANELLAS, L.P.; FAÇANHA, A.O.; FAÇANHA, A.R. & OLIVARES, F.L. Humic acids isolated from earthworm induces root mitotic sites and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Physiol.*, 30: 1951-1957, 2002.
- CANELLAS, L.P.; TEIXEIRA JUNIOR, L.R.L.; DOBBSS, L.B.; SILVA, C.A.; MÉDICI, L.O.; ZANDONADI, D.B. & FAÇANHA, A.R. Humic acids crossinteractions with root and organic acids. *Annals Applied Biol.*, 153: 157-166, 2008.
- CANELLAS, L.P.; ZANDONADI, D.B.; OLIVARES, F.L. & FAÇANHA, A.R. Efeitos fisiológicos de substâncias húmicas - o estímulo às H<sup>+</sup>-ATPases. In: Manlio Silvestre Fernandes. (org.). *Nutrição Mineral de Plantas*. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006.
- CATUNDA, P.E.A.; MARINHO, C.S.; GOMES, M.M.A. & CARVALHO, A.J.C. Brassinosteróide e substratos na aclimatização do abacaxizeiro 'Imperial'. *Acta Sci. Agron.*, 30: 345-352, 2008.
- CHEN, Y. & AVAID, T. Effects of humic substances on plant growth. In: MaCCARTHY, P.; CAPP, C.E.; MALCOLM, R.L. & BLOOM, P.R., eds. *Humic substances in soil and crop sciences: selected readings*. American Society of America, p.161-186, 1990.
- CHEN, Y.; CLAPP, C.E. & MAGEN, H. Mechanisms of plant growth stimulation by humic substances: The role of organo-iron complexes. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 50:1089-1095, 2004.
- D'EECKENBRUGGE, G.C. & LEAL, F. Morphology, Anatomy and Taxonomy. In: BARTHOLOMEW, D.P.; PAULL, R.E.; ROHRBACH, K.G. ed. *The Pineapple: Botany, Production and Uses*. CAB International, 2003, p. 13-32.
- DELFINE, S.; TOGNETTI, R.; DESIDERIO, E. & ALVINO A. Effects of foliar application of N and humic acids on growth and yield of durum wheat. *Agron. Sustain. Dev.*, 25:183-191, 2005.
- DELL'AGNOLA, G. & NARDI, S. On overview of earthworm activity in the soil. In: Bonvicini Pagliai A.M., Omodeo P. eds. *On earthworms selected symposia and monographs*. Part 2. Mucchi Editore, Modena, Italy, p. 103-112, 1987.
- FAÇANHA, A.R.; FAÇANHA, A.L.O.; OLIVARES, F.L.; GURIDI, F.; SANTOS, G.A.; VELLOSO, A.C.X.; RUMJANEK, V.M.; BRASIL, F.; SCHRIPSEMA, J.; BRAZ-FILHO, R.; OLIVEIRA, M.A. & CANELLAS, L.P. Bioatividade de ácidos húmicos: Efeito sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. *Pesq. Agropec. Bras.*, 37: 1301-1310, 2002.
- FERRARA, G. & BRUNETTI, G. Influence of foliar applications of humic acids on yield and fruit quality of table grape cv. Itália. *J. Int. Sci. Vigne Vin.*, 42:79-87, 2008.

- FRANCESCHI, V.R. & HORNER, H.T. Calcium oxalate crystals in plants. *Bot. Rev.*, 46:361-427, 1980.
- FRIAS, I.; CALDEIRA, M.T.; PEREZ CASTINEIRA, J.R.; AVARRO AVINO, J.P.; CULIANEZ MACIA, F.A.; KUPPINGER, O.; STRANSKY, H.; PAGES, M.; HAGER, A. & SERRANO, R. A major isoform of the maize plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase, characterization and induction by auxin in coleoptiles. *Plant Cell*, 8: 1533-1544, 1996.
- GUERRA, J.C.M.; SANTOS, G.A., SILVA, L.S., CAMARGO, F.A.O. Macromoléculas e substâncias húmicas. In: SANTOS, G.A., ed. *Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais & subtropicais*. 2 ed. Porto Alegre, Metrópole, p. 19-26, 2008.
- GUERRA, M.P.; DAL VESCO, L.L.; PESCADOR, R.; SCHUELTER, A R. & NODARI, R.O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. *Pesq. Agropec. Bras.*, 34:1557-1563, 1999.
- HAGER, A.; DEBUS, G.; EDEL, H.G.; STRANSKY, H. & SERRANO, R. Auxin induces exocytosis and rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Planta*, 185: 527-537, 1991.
- HISCOX J.D. & ISRAELSTAM G.F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. *Can. J. Bot.*, 57:1332-1334, 1979.
- HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. *The water culture method of growing plants without soil*. Berkeley, University of California, 32p, 1950.
- INCAPER (Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural). 'Vitória' nova cultivar de abacaxi resistente a fusariose. Documento n. 148, DCM-Incaper, Vitória, ES, 2006.
- LARCHER, W. *Ecofisiologia vegetal*. São Carlos: Rima Artes e Textos, 531p, 2000.
- LIU, C.H.; COOPER, R.J. & BOWMAN, D.C. Humic acid application affects photosynthesis, root development, and nutrient content of creeping bentgrass. *HortScience*, 33:1023-1025, 1998.
- MARQUES JUNIOR, R. ; CANELLAS, L.P. ; SILVA, L.G. ; OLIVARES, F.L. Promoção de enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas. *R. Bras. Ci. Solo*, 32: 1121-1128, 2008.
- MASCIANDARO, G.; CECCANTI, B.; GARCIA, C. Soil agroecological management: fertirrigation and vermicompost treatments. *Biores. Technol.*, 59: 199-206, 1999.
- MELLO, M.R.F.; MARIANO, R.L.R.; MENEZES, M.; CÂMARA, T.R. & ASSIS, S.M.P. Seleção de bactérias e métodos de bacterização de crescimento em mudas de abacaxizeiro micropropagadas. *Summa Phytopathol.*, 28: 222-228, 2002.

- MOREIRA, M. A.; CARVALHO, J.G. de ; CHRYSTIANE, B. F & PASQUAL, M . Resposta a adubação NPK de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola em fase de aclimatização. *Plant Cell Cult. & Micropropag.*, 3:17-22, 2007.
- MOREIRA, M.A. Produção e aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro: *Ananas comosus* (L) Merrill cv. Pérola. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001. 81p.
- 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. *Ciênc. Agrotec.*, 30:875-879, 2006.
- MURASHIGUE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plantarum*, 15: 473-497, 1962.
- MUSCOLO, A.; BOVALO, F.; GIONFRIDDO, F. & NARDI, S. Earthworm humic matter produces auxin-like effects on *Daucus carota* cell growth and nitrate metabolism. *Soil Biol. Biochem.*, 31: 1303-1311, 1999.
- MUSCOLO, A. & NARDI, S. Auxin or auxin-like activity of humic matter. In: DROZD, J., GONET, S.S., SENESI, N., WEBER, J. eds. *The Role of Humic Substances in the Ecosystems and Environmental Protection*. Polish Society of Humic Substances, Wroclaw, Poland, p. 987-992, 1997.
- NARDI, S.; CONCHERI, G.; DELL'AGNOLA, G. Biological activity of humus. In: Piccolo, A. ed. *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. Elsevier, New York, p. 361-406, 1996.
- NARDI, S.; PIZZEGHELLO, D.; MUSCOLO, A. & VIANELLO, A. Physiological effects of humic substances in higher plants. *Soil Biol. & Biochem.*, 34: 1527–1537, 2002.
- PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances. *Soil Sci.*, 166: 810-832, 2001.
- PINTON, R.; CESCO, S.; IACOLETTI, G.; ASTOLFI, S. & VARANINI, Z. Modulation of nitrate uptake by water-extractable humic substances: Involvement of root plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Soil*, 215: 155-163, 1999.
- PROENCA, S.L. & SAJO, M.G. Anatomia foliar de bromélias ocorrentes em áreas de cerrado do Estado de São Paulo. *Acta Bot. Bras.*, 21: 657-673, 2007.
- PURVIS, M.; COLLIER, D. & WALLS, D. *Laboratory techniques in botany*. London, Butterworths, 1964.
- PY, C. *La piña tropical*. Barcelona: Blume, 278p, 1969.
- QUAGGIOTTI, S.; RUPERT, B.; PIZZEGHELLO, D.; FRANCIOSO, O.; TUGNOLI, V. & NARDI, S. Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). *J. Exp. Bot.*, 55:803-813, 2004.

- RAMOS, M.J.M.; MONNERAT, P. H.; CARVALHO, A.J.C. de ; PINTO, J.L.A. & SILVA, J.A. Nutritional deficiency in 'Imperial' pineapple in the vegetative growth phase and leaf nutrient concentration. *Acta Horticulturae*, 702: 133-139, 2006.
- RODDA, M.R.C.; CANELLAS, L.P.; FAÇANHA, A.R.; ZANDONADI, D.B.; ALMEIDA, D.L.; GUERRA, J.G.M. & SANTOS, G.A. Estímulo no crescimento e na hidrólise de ATP em raízes de alface tratadas com humatos de vermicomposto. I - efeito da concentração R. *Bras. Ci. Solo*, 30: 649-656, 2006.
- SONDEGAARD, T.E.; SCHULZA, A. & PALMGREN, M.G. Energization of transport processes in plants. Roles of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Physiol.*, 136:2475-2482, 2004.
- SOUZA JÚNIOR, E.E.; BARBOZA, S. B.S. C. & SOUZA, L.A.C. Efeitos de substratos e recipientes na aclimatização de plântulas de abacaxizeiro [*Ananas comosus* (L.) Merrill] cv. Pérola. *Pesq. Agrop. Trop.*, 31: 147-151, 2001.
- TEIXEIRA, J.B.; CRUZ, A.R.R.; FERREIRA, F.R. & CABRAL, J.R. Biotecnologia aplicada à produção de mudas: produção de mudas micropropagadas de abacaxi. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 3: 42-47, 2001.
- TEJADA, M. & GONZALEZ J.L. Effect of foliar application of a byproduct of the two-step olive oil mill process on rice yield. *Eur. J. Agron.*, 21: 31-40, 2004.
- VAUGHAN, D. & MALCOLM, R.E. Influence of humic substances on growth and physiological process. In: VAUGHAN, D. & MALCOLM, R. E. ed.. *Soil organic matter and biological activity*. Dordrecht: Kluwer Academic, 37-75, 1985.
- VISSER, S.A. Fluorescence phenomena of humic matter of aquatic origin and microbial cultures. In: CHRISTMAN, R.F. & GESSING, E.T., eds. *Aquatic and terrestrial humic materials*. Ann Arbor, Ann Arbor Science, p.183-202, 1983.
- 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 *Pesq. Agropec. Bras.*, 38: 689-696, 2003.
- WELLBURN, A.R. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *J. Plant Physiol.*, 144: 07-313, 1994.
- ZANDONADI, D. B.; CANELLAS, L. P. & FAÇANHA, A. R. Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H<sup>+</sup> pumps activation. *Planta*, 225:1583-1595, 2007.

**Quadro 1. Coeficientes dos contrastes estudados para os tratamentos doses de ácidos húmicos e para o controle**

Tratamentos <sup>(1)</sup>	Coeficiente dos contrastes <sup>(2)</sup>	
	C1	C2
(-)	-6	0
AHv (10)	+1	-1
AHv (20)	+1	-1
AHv (40)	+1	-1
AHtf (10)	+1	+1
AHtf (20)	+1	+1
AHtf (40)	+1	+1

<sup>(1)</sup> Tratamentos: (-) = controle; AHv = ácido húmico de vermicomposto AHtf = ácido húmico de torta de filtro; (10), (20) e (40) representam as concentrações de 10, 20 e 40 mmol L<sup>-1</sup> de C, respectivamente. Contrastes: C1 = controle (-) versus ácido húmico (AH); C2 = ácido húmico isolado de vermicomposto (AHv) versus ácido húmico isolado de torta de filtro (AHtf).

**Quadro 2 . Características de crescimento da parte aérea, do sistema radicular e acúmulo de nutrientes no abacaxizeiro ‘Vitória’ em resposta à aplicação de diferentes doses de ácidos húmicos de vermicomposto e de torta de filtro**

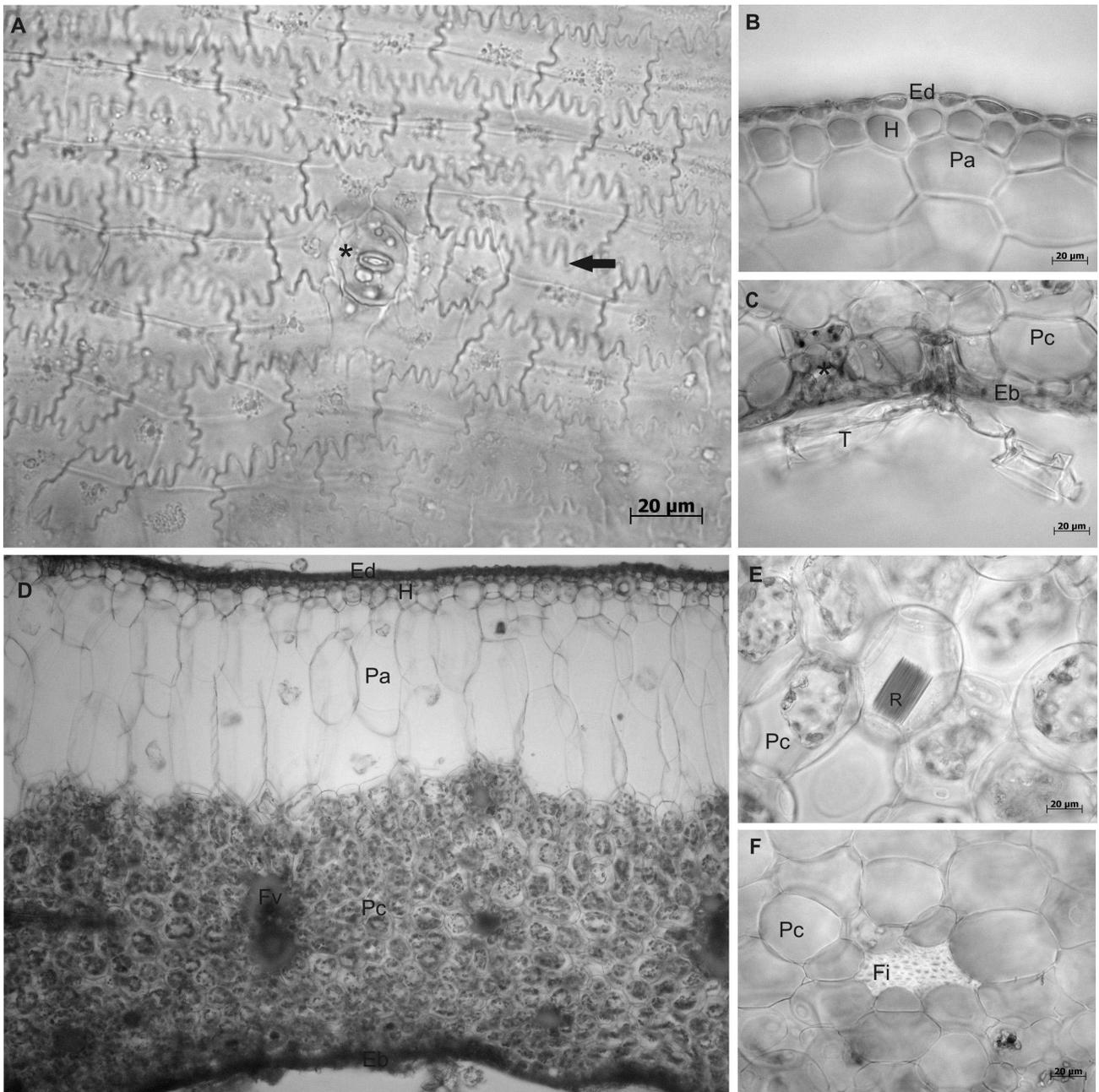
Tratamentos <sup>(1)</sup>	Características de crescimento e acúmulo de nutrientes															
	Parte aérea <sup>(2)</sup>							Sistema radicular <sup>(3)</sup>				Conteúdo de nutrientes <sup>(4)</sup>				
	NF	ALT	DR	DC	MFPA	MSPA	AF	MFR	MSR	RPA	AR	N	P	K	Ca	Mg
	-----cm-----		-mm-	-----g-----		-cm <sup>2</sup> -	-----g-----		-%-		-----mg planta <sup>-1</sup> -----					
(-)	17,83	11,58	17,92	14,45	11,13	1,04	125,58	2,39	0,32	0,32	100,04	11,28	3,44	61,89	6,68	5,28
AHv(10)	21,50	14,25	25,33	18,00	20,62	1,99	215,90	4,32	0,61	0,31	165,08	21,22	7,44	113,20	12,09	11,83
AHv(20)	18,83	11,75	21,83	17,39	16,64	1,63	186,80	4,53	0,55	0,33	148,23	15,58	5,38	91,45	10,03	7,66
AHv(40)	20,00	12,42	21,58	16,53	17,14	1,63	193,27	4,20	0,48	0,30	130,44	17,67	5,74	91,32	10,23	6,81
AHtf(10)	19,00	12,17	21,25	16,43	16,28	1,52	176,91	4,20	0,47	0,31	135,95	15,36	4,71	85,15	10,23	7,96
AHtf(20)	19,50	12,83	21,75	16,47	17,63	1,65	190,63	3,81	0,51	0,31	139,33	16,65	6,52	92,93	10,74	8,55
AHtf(40)	19,00	12,50	21,42	16,29	16,31	1,52	178,21	3,24	0,42	0,28	112,66	16,27	5,45	81,76	10,01	7,68

<sup>(1)</sup> Tratamentos: (-) = controle; AHv = ácido húmico de vermicomposto; AHtf = ácido húmico de torta de filtro; (10), (20) e (40) são as concentrações de 10, 20 e 40 mmol L<sup>-1</sup> de C, respectivamente. <sup>(2)</sup> Parte aérea: NF = número de folhas; ALT = altura; DR = diâmetro da roseta; DC = diâmetro do caule; MFPA = matéria fresca da parte aérea; MSPA = matéria seca da parte aérea; AF = área foliar. <sup>(3)</sup> Sistema radicular: MFR = matéria fresca da raiz; MSR = matéria seca da raiz; RPA = razão entre raiz e parte aérea; AR = área radicular, porcentagem sobre o controle. <sup>(4)</sup> Conteúdo de nutrientes: N, P, K, Ca, Mg = conteúdo de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, respectivamente.

**Quadro 3 . Contrastes médios, incrementos relativos, quadrado médio do resíduo (QMR) e coeficiente de variação (CV) para as características de crescimento da parte aérea, sistema radicular e acúmulo de nutrientes no abacaxizeiro ‘Vitória’ em resposta à aplicação de diferentes doses de ácidos húmicos de vermicomposto e de torta de filtro**

F.V. <sup>(1)</sup>	G.L.	Contrastes médios (incrementos relativos <sup>(5)</sup> )															
		Parte aérea <sup>(2)</sup>						Sistema radicular <sup>(3)</sup>				Conteúdo de nutrientes <sup>(4)</sup>					
		NF	ALT	DR	DC	MFPA	MSPA	AF	MFR	MSR	RPA	AR	N	P	K	Ca	Mg
			-----cm-----	-mm-	-----g-----	-cm <sup>2</sup> -	-----g-----				-%-	-----mg planta <sup>-1</sup> -----					
(-) vs AH	1	1,81*	1,07	4,28**	2,40**	6,31*	0,62*	64,71**	1,66*	0,18*	-0,01	38,58*	5,84*	2,43*	30,75*	3,88*	3,14*
		(10,12)	(9,23)	(23,88)	(16,58)	(56,67)	(59,13)	(51,53)	(69,57)	(56,99)	(4,16)	(38,57)	(51,77)	(70,78)	(49,68)	(58,06)	(59,50)
AHv vs AHtf	1	-0,94	-0,31	-1,44	-0,91	-1,40	-0,18	-16,74	-0,60	-0,08	-0,01	-18,60	-2,06	-0,62	-12,05	-0,46	-0,70
		(4,93)	(2,44)	(6,73)	(5,54)	(8,33)	(11,73)	(9,20)	(16,03)	(16,69)	(4,60)	(14,38)	(12,83)	(11,20)	(13,91)	(4,41)	(8,69)
QMR	35	3,45	3,07	9,76	3,36	33,20	0,33	2783	2,31	0,03	0,0028	1130,87	34,79	9,73	904,78	12,67	9,71
CV (%)		9,58	14,01	14,47	11,01	34,85	36,46	29,14	39,90	36,98	17,13	25,27	36,21	48,40	34,09	35,59	39,13

<sup>(1)</sup> F.V.: (-) = controle; AH = ácido húmico; AHv = ácido húmico de vermicomposto; AHtf = ácido húmico de torta de filtro. <sup>(2)</sup> Parte aérea: NF = número de folhas; ALT = altura; DR = diâmetro da roseta; DC = diâmetro do caule; MFPA = matéria fresca da parte aérea; MSPA = matéria seca da parte aérea; AF = área foliar. <sup>(3)</sup> Sistema radicular: MFR = matéria fresca da raiz; MSR = matéria seca da raiz; RPA = razão entre raiz e parte aérea; AR = área radicular. <sup>(4)</sup> Conteúdo de nutrientes: N, P, K, Ca, Mg = conteúdo de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, respectivamente. <sup>(5)</sup> Incrementos relativos:  $100(x-y)/y$ , sendo x a média do tratamento de maior valor e y a média do tratamento de menor valor. \*, \*\*, significativo a 5 e 1 % de probabilidade pelo teste F, respectivamente.



**Figura 1.** Anatomia da lâmina foliar do abacaxizeiro ‘Vitória’ tratado com ácidos húmicos. A: vista frontal da epiderme abaxial mostrando o contorno sinuoso das paredes anticlinais das células epidérmicas (seta) e a presença de estômatos (\*). B, C, D, E, F: cortes transversais do terço médio da lâmina foliar no eixo central. B: epiderme adaxial (Ed), hipoderme (H) e parênquima aquífero (Pa). C: epiderme abaxial (Eb), parênquima clorofiliano (Pc) e presença de tricomas (T) escamiformes. D: mesofilo diferenciado em parênquima aquífero (Pa) e parênquima clorofiliano (Pc) contendo os feixes vasculares (Fv). E: detalhe dos cristais do tipo ráfide (R). F, detalhe dos cordões de fibra (Fi) presentes no mesofilo. Imagens obtidas por microscopia ótica.

**Quadro 4 . Características anatômicas da lâmina foliar e teor de pigmentos fotossintéticos do abacaxizeiro ‘Vitória’ em resposta à aplicação de diferentes doses de ácidos húmicos de vermicomposto e de torta de filtro**

Tratamentos <sup>(1)</sup>	Características anatômicas <sup>(2)</sup>			Pigmentos fotossintéticos <sup>(3)</sup>						
	N. estoma.	P. aquífero	P. clorofil.	<i>Cl<sub>a</sub></i>	<i>Cl<sub>b</sub></i>	<i>Cl<sub>t</sub></i>	<i>Car</i>	<i>Cl<sub>a</sub> / Cl<sub>b</sub></i>	<i>Cl<sub>t</sub> / Car</i>	SPAD
	-unidade-	-----µm-----		-----µg mL <sup>-1</sup> -----						
(-)	12,17	625,67	717,00	3,47	1,17	4,65	1,15	3,00	4,03	37,03
AHv(10)	12,83	703,67	752,67	3,65	1,19	4,83	1,20	3,15	4,02	39,25
AHv(20)	12,83	640,83	715,33	3,68	1,13	4,82	1,13	3,31	4,21	37,25
AHv(40)	12,50	664,83	751,17	4,42	1,34	5,76	1,31	3,29	4,36	40,00
AHtf(10)	12,17	623,00	731,17	3,97	1,14	5,10	1,18	3,57	4,28	39,18
AHtf(20)	12,00	692,83	720,17	3,46	1,05	4,51	1,11	3,35	4,06	38,22
AHtf(40)	12,50	682,00	733,50	3,60	1,08	4,68	1,19	3,39	3,93	42,17

<sup>(1)</sup> Tratamentos: (-), controle; AHv, ácido húmico de vermicomposto; AHtf, ácido húmico de torta de filtro; (10), (20) e (40) são as concentrações de 10, 20 e 40 mmol L<sup>-1</sup> de C, respectivamente. <sup>(2)</sup> Características anatômicas: N. de estoma. = número de estômatos; P. aquífero = comprimento do parênquima aquífero; P. clorofil. = comprimento do parênquima clorofiliano. <sup>(3)</sup> Pigmentos fotossintéticos: *Cl<sub>a</sub>* = clorofila *a*; *Cl<sub>b</sub>* = clorofila *b*; *Cl<sub>t</sub>* = clorofila total; *Car* = carotenóides; *Cl<sub>a</sub>/Cl<sub>b</sub>* = razão entre clorofila *a* e clorofila *b*; *Cl<sub>t</sub>/Car* = razão entre clorofila total e carotenóide; SPAD = teor de clorofila pelo índice SPAD (medição da intensidade da cor verde).

**Quadro 5 . Contrastes médios, incrementos relativos, quadrado médio do resíduo (QMR) e coeficiente de variação (CV) para as características anatômicas da lâmina foliar e o teor de pigmentos fotossintéticos do abacaxizeiro ‘Vitória’ em resposta à aplicação de diferentes doses de ácidos húmicos de vermicomposto e de torta de filtro**

F.V. <sup>(1)</sup>	G.L.	Contrastes médios (incrementos relativos <sup>(5)</sup> )									
		Características anatômicas <sup>(2)</sup>			Pigmentos fotossintéticos <sup>(3)</sup>						
		N. estoma.	P. aquífero	P. clorofil.	Cl <sub>a</sub>	Cl <sub>b</sub>	Cl <sub>t</sub>	Car	Cl <sub>a</sub> / Cl <sub>b</sub>	Cl <sub>t</sub> / Car	SPAD
		-unidade-	-----µm-----		-----µg mL <sup>-1</sup> -----						
(-) vs AH	1	0,31	42,19	17,00	0,32	-0,02	0,30	0,04	0,35**	0,11	2,31
		(2,51)	(6,74)	(2,37)	(9,25)	(1,53)	(6,54)	(3,55)	(11,54)	(2,76)	(6,24)
AHv vs AHtf	1	-0,50	-3,83	-11,44	-0,24	-0,13	-0,37	-0,06	0,19	-0,10	1,02
		(4,09)	(0,58)	(1,57)	(6,54)	(12,06)	(7,80)	(4,90)	(5,42)	(2,50)	(2,63)
QMR	35	1,55	10342,11	4670,65	0,821	0,111	1,50	0,049	0,106	0,233	32,47
CV (%)		10,03	15,37	9,34	24,17	28,80	24,99	18,70	9,87	11,70	14,60

<sup>(1)</sup> F.V.: (-), controle; AH, ácido húmico; AHv, ácido húmico de vermicomposto; AHtf, ácido húmico de torta de filtro. <sup>(2)</sup> Características anatômicas: N. de estoma. = número de estômatos; P. aquífero = parênquima aquífero; P. clorofil. = parênquima clorofiliano. <sup>(3)</sup> Pigmentos fotossintéticos: Cl<sub>a</sub> = clorofila a; Cl<sub>b</sub> = clorofila b; Cl<sub>t</sub> = clorofila total; Car = carotenóides; Cl<sub>a</sub>/Cl<sub>b</sub> = razão entre clorofila a e clorofila b; Cl<sub>t</sub>/Car = razão entre clorofila total e carotenóide; SPAD = teor de clorofila pelo índice SPAD (medição da intensidade da cor verde). <sup>(5)</sup> Incrementos relativos: 100(x-y)/y, sendo x a média do tratamento de maior valor e y a média do tratamento de menor valor. \*\*, significativo a 1 % de probabilidade pelo teste F.

**Quadro 6. Equações de regressão para as características de crescimento, acúmulo de nutrientes e de pigmentos fotossintéticos do abacaxizeiro ‘Vitória’ em resposta à aplicação de diferentes doses de ácidos húmicos de vermicomposto e de torta de filtro**

Variáveis <sup>(1)</sup>	Desdobramentos <sup>(2)</sup>	Equações de regressão	R <sup>2</sup>
Crescimento da parte aérea			
NF	AHv	$\hat{y} = \bar{y} = 19,54$	
	AHtf	$\hat{y} = 17,8470 + 0,1393 x - 0,0028 x^2$	0,998
ALT	AHv	$\hat{y} = \bar{y} = 12,21$	
	AHtf	$\hat{y} = 11,5311 - 0,0951 x - 0,0018 x^2$	0,961
DR	AHv	$\hat{y} = 18,1408 + 3,1221 x^{0,5} - 0,4211 x$	0,778
	AHtf	$\hat{y} = 17,9135 + 1,5688 x^{0,5} - 0,1603 x$	0,999
DC	AHv	$\hat{y} = 14,1493 + 1,7303 x^{0,5} - 0,4211 x$	0,971
	AHtf	$\hat{y} = 14,4624 + 0,9126 x^{0,5} - 0,0993 x$	0,995
MFPA	AHv	$\hat{y} = 11,4073 + 3,8215 x^{0,5} - 0,4778 x$	0,795
	AHtf	$\hat{y} = 11,0794 + 2,6534 x^{0,5} - 0,2859 x$	0,995
MSPA	AHv	$\hat{y} = 1,0649 + 0,3952 x^{0,5} - 0,0499 x$	0,837
	AHtf	$\hat{y} = 1,0355 + 0,2495 x^{0,5} - 0,0271 x$	0,989
AF	AHv	$\hat{y} = 127,8480 + 36,4116 x^{0,5} - 4,2588 x$	0,860
	AHtf	$\hat{y} = 125,0960 + 26,2723 x^{0,5} - 2,7970 x$	0,989
Crescimento da raiz			
MFR	AHv	$\hat{y} = 2,3877 + 0,9391 x^{0,5} - 0,1031 x$	0,999
	AHtf	$\hat{y} = 2,4106 + 0,9101 x^{0,5} - 0,1244 x$	0,967
MSR	AHv	$\hat{y} = 0,3255 + 0,1374 x^{0,5} - 0,0181 x$	0,961
	AHtf	$\hat{y} = 0,3265 + 0,0171 x - 0,0004 x^2$	0,986
R / PA	AHv	$\hat{y} = \bar{y} = 0,32$	
	AHtf	$\hat{y} = 0,3187 - 0,0003 x - 0,00002 x^2$	0,948
AR	AHv	$\hat{y} = 101,026 + 31,9591 x^{0,5} - 4,3777 x$	0,949
	AHtf	$\hat{y} = 99,6385 + 22,4674 x^{0,5} - 0,0320 x$	0,982
Acúmulo de nutrientes			
N	AHv	$\hat{y} = 11,6765 + 3,5332 x^{0,5} - 0,4325x$	0,635
	AHtf	$\hat{y} = 11,2464 + 1,9464 x^{0,5} - 0,1800 x$	0,991
P	AHv	$\hat{y} = 3,57784 + 1,55220 x^{0,5} - 0,00199 x$	0,709
	AHtf	$\hat{y} = 3,26565 + 0,23491 x^{0,5} - 0,00447 x$	0,927
K	AHv	$\hat{y} = 63,3534 + 21,3370 x^{0,5} - 0,0276 x$	0,804
	AHtf	$\hat{y} = 62,4274 + 2,6786 x^{0,5} - 0,0549 x$	0,993
Ca	AHv	$\hat{y} = 6,8244 + 2,2117 x^{0,5} - 0,2735 x$	0,827
	AHtf	$\hat{y} = 6,6674 + 1,7632 x^{0,5} - 0,1947 x$	0,999
Mg	AHv	$\hat{y} = 5,5128 + 2,8573 x^{0,5} - 0,4338 x$	0,710
	AHtf	$\hat{y} = 5,2522 + 1,4223 x^{0,5} - 0,1628 x$	0,990
Pigmentos fotossintéticos			
Cl <sub>a</sub>	AHv	$\hat{y} = 3,5038 + 0,0013 x - 0,0005 x^2$	0,980
	AHtf	$\hat{y} = \bar{y} = 3,63$	
Cl <sub>b</sub>	AHv	$\hat{y} = 1,1859 - 0,0063 x + 0,0003 x^2$	0,909
	AHtf	$\hat{y} = 1,1826 - 0,0086 x - 0,0001 x^2$	0,860
Cl <sub>t</sub>	AHv	$\hat{y} = 4,6897 - 0,0049 x + 0,0008 x^2$	0,970
	AHtf	$\hat{y} = \bar{y} = 4,74$	

## Continuação do Quadro 6.

Car	AHv	$\hat{y} = 1,1645 - 0,0031 x - 0,0002 x^2$	0,806
	AHtf	$\hat{y} = \bar{y} = 1,16$	
Cla/Clb	AHv	$\hat{y} = 2,9886 + 0,0225 x - 0,0004 x^2$	0,982
	AHtf	$\hat{y} = 3,0143 + 0,2294 x^{0,5} - 0,0278 x$	
Clt/Car	AHv	$\hat{y} = 4,0272 - 0,0318 x^{0,5} - 0,0136 x$	0,944
	AHtf	$\hat{y} = 4,0432 + 0,1291 x^{0,5} - 0,0237 x$	
SPAD	AHv	$\hat{y} = \bar{y} = 38,38$	0,854
	AHtf	$\hat{y} = 37,4488 + 0,0454 x - 0,0017 x^2$	

<sup>(1)</sup> Variáveis: NF = número de folhas; ALT = altura (cm); DR = diâmetro da roseta (cm); DC = diâmetro do caule (mm); MFPA = matéria fresca da parte aérea (g); MSPA = matéria seca da parte aérea (g); AF = área foliar (cm<sup>2</sup>); MFR = matéria fresca da raiz (g); MSR = matéria seca da raiz (g); RPA = razão entre raiz e parte aérea; AR = área radicular (%); N, P, K, Ca, Mg = conteúdo de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, respectivamente (g planta<sup>-1</sup>); Cla = clorofila *a* (μg mL<sup>-1</sup>); Clb = clorofila *b* (μg mL<sup>-1</sup>); Clt = clorofila total (μg mL<sup>-1</sup>); Car = carotenóides (μg mL<sup>-1</sup>); Cla/Clb = razão entre clorofila *a* e clorofila *b*; Clt/Car = razão entre clorofila total e carotenóide; SPAD = teor de clorofila pelo índice SPAD (medição da intensidade da cor verde). <sup>(2)</sup> Desdobramentos: AHv = ácido húmico de vermicomposto; AHtf = ácido húmico de torta de filtro.

**PROMOÇÃO DO CRESCIMENTO DO ABACAXIZEIRO ‘VITÓRIA’ PELO USO  
CONJUNTO DE ÁCIDO HÚMICO E *Burkholderia spp.* DURANTE  
A ACLIMATIZAÇÃO<sup>(1)</sup>**

**Lílian Estrela Borges Baldotto<sup>(2)</sup>, Marihus Altoé Baldotto<sup>(3)</sup>, Luciano Pasqualoto Canellas<sup>(3)</sup>,  
Ricardo Bressan-Smith<sup>(4)</sup>, Fábio Lopes Olivares<sup>(5)</sup>**

**RESUMO**

Apesar das vantagens de produção de mudas sadias e uniformes de abacaxizeiro por propagação *in vitro*, a necessidade de um longo período de aclimatização onera essa prática agrícola. A aceleração do crescimento das plântulas de abacaxizeiro pelo uso conjunto de ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas pode ser útil para diminuir esse período. O objetivo neste trabalho foi avaliar o desempenho inicial do abacaxizeiro ‘Vitória’ propagado por cultura de tecidos em resposta à aplicação de ácido húmico de vermicomposto e bactérias promotoras de crescimento do gênero *Burkholderia* durante o período de aclimatização em casa de vegetação. Foram avaliadas as características de crescimento da parte aérea, do sistema radicular e o conteúdo de nutrientes foliares. Os

---

<sup>(1)</sup> Parte da Tese de Doutorado da primeira autora.

<sup>(2)</sup> Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). Av. Alberto Lamego, 2000, CEP 28013-602, Campos dos Goytacazes, RJ. E-mail: liborges@uenf.br

<sup>(3)</sup> Professor do Laboratório de Solos da UENF. E-mails: marihus@uenf.br; canellas@uenf.br

<sup>(4)</sup> Professor do Laboratório de Fisiologia Vegetal da UENF. E-mail: bressan@uenf.br

<sup>(5)</sup> Professor do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da UENF. E-mail: fabioliv@uenf.br

resultados mostraram incrementos no crescimento e desenvolvimento da parte aérea e do sistema radicular com a aplicação isolada e, principalmente, conjunta, de ácido húmico e bactérias, bem como acúmulo de N, P, K, Ca e Mg. O uso conjunto de ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas para promoção do crescimento das mudas durante o período de aclimatização pode ser uma prática importante na adaptação do abacaxizeiro ao ambiente *ex vitro*.

**Termos de indexação:** *Ananas comosus*, cultura de tecidos, bactérias promotoras de crescimento vegetal, bactérias diazotróficas, substâncias húmicas, inoculante.

**SUMMARY:** *GROWTH PROMOTION OF PINEAPPLE 'VITÓRIA' USING HUMIC ACIDS AND Burkholderia spp. DURING ACCLIMATIZATION*

*Despite the advantages of the healthy, uniform pineapple plantlets grown in vitro, the need for a long acclimatization period boosts the costs of this agricultural practice. Accelerating pineapple plantlets growth by the combined use of humic acid and diazotrophic bacteria might reduce this period. The objective of this study was to evaluate the initial response of pineapple 'Vitória' plantlets to applications of humic acids from vermicompost and growth-promoting bacteria of the genus Burkholderia during greenhouse acclimatization. The growth characteristics of shoot and roots as well as leaf nutrient contents were evaluated. Results showed increases in plant growth and shoot and root development by the separate and particularly the combined application of humic acid and bacteria, as well as accumulation of N, P, K, Ca, and Mg. The combined use of humic acid and bacteria for increased plant growth promotion during the acclimatization period may become an important practice in the adaptation of pineapple to ex vitro conditions.*

*Index terms: Ananas comosus, tissue culture, plant growth-promoting bacteria, diazotrophic bacteria, humic substances, inoculant.*

## INTRODUÇÃO

A propagação do abacaxizeiro é realizada predominantemente de maneira vegetativa, por meio de mudas do tipo filhote, rebentão e filhote-rebentão, retiradas das plantas adultas após a colheita dos frutos (d'Eeckenbrugge & Leal, 2003). Apesar da vantagem do baixo custo de produção desses propágulos, há limitações que comprometem a qualidade e expansão da abacaxicultura, como, por exemplo, a quantidade insuficiente de mudas isentas de pragas e doenças e de porte homogêneo. Como alternativa, alguns métodos usados para a propagação *in vitro* do abacaxizeiro (Teixeira et al., 2001; Almeida et al., 2002), têm resultado na produção de maior quantidade de mudas saudáveis e uniformes em um espaço reduzido e com a possibilidade de estabelecimento de cronogramas de produção.

Após a propagação *in vitro*, as plântulas de abacaxizeiro são aclimatadas em condições *ex vitro*, para posterior adaptação ao campo (Teixeira et al., 2001). A aclimatização é necessária, pois abacaxizeiros cultivados *in vitro* apresentam características morfológicas desfavoráveis para suportar as condições edafoclimáticas no campo. Como exemplo, podem-se citar menor espessamento da cutícula e das paredes periclinais externas das células epidérmicas e menor densidade estomática (Barboza et al., 2006). O período de aclimatização do abacaxizeiro varia entre 6 a 8 meses em casa de vegetação, para que as plantas alcancem entre 200 a 300 mm de altura, tamanho adequado para a transferência para o campo (Teixeira et al., 2001). O longo período de aclimatização onera a produção das mudas de abacaxizeiro *in vitro*, portanto, estratégias que objetivam acelerar o crescimento da planta com o intuito de diminuir esse tempo são almejadas. Dentro deste contexto, a aplicação foliar de ácidos húmicos (Baldotto et al., 2009) e a inoculação de bactérias promotoras de crescimento (Mello et al., 2002; Weber et al., 2003a, b) têm apresentado resultados promissores.

Os ácidos húmicos, componentes da matéria orgânica do solo, são formados por agregados moleculares heterogêneos e estabilizados por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas (Piccolo, 2001). Atuam favorecendo o desenvolvimento do sistema radicular (Façanha et al., 2002; Zandonadi et al., 2007) e o acúmulo de nutrientes nas plantas (Chen & Avid, 1990; Chen et al., 2004). Em abacaxizeiro, a aplicação foliar de ácido húmico isolado de vermicomposto na concentração de 15 mmol L<sup>-1</sup> de C favorece o crescimento da parte aérea e do sistema radicular, bem como o acúmulo de nutrientes foliares na cultivar 'Vitória' durante a aclimatização (Baldotto et al., 2009).

O abacaxizeiro 'Vitória', lançado em 2006, apresenta caracteres promissores para aceitação por produtores e consumidores, como resistência à fusariose, folhas sem espinhos, frutos

cilíndricos com casca amarelada, polpa branca com elevado teor de açúcar e bom perfilhamento (INCAPER, 2006). Assim como as demais variedades de abacaxizeiro, essa cultivar apresenta crescimento lento durante a aclimatização. A aplicação de biofertilizantes constituídos por bactérias diazotróficas endofíticas pode resultar na aceleração do crescimento das plântulas de abacaxizeiro durante esse período (Mello et al., 2002; Weber et al., 2003a, b). Relatos sobre incrementos da matéria seca de abacaxizeiros em resposta à inoculação incluem *Burkholderia cepacia* AB213 em plântulas de ‘Smooth Cayenne’ e *Asaia bogorensis* em plântulas de ‘Cayenne Champac’ (Weber et al., 2003a).

O uso de bactérias na formulação de biofertilizantes está bem documentada (Vessey, 2003). Recentemente, Marques Júnior et al. (2008) constataram que a aplicação de biofertilizante constituído por bactérias promotoras de crescimento e ácidos húmicos em microtoletes de cana-de-açúcar tratados termicamente resultou em incrementos na biomassa vegetal. Em abacaxizeiro, o uso dessa mesma tecnologia inovadora de aplicação conjunta de ácidos húmicos e bactérias promotoras de crescimento pode ser uma estratégia viável na aclimatização de plantas propagadas *in vitro*, buscando promover maior crescimento e redução do tempo necessário para a transferência das plantas para o campo.

Portanto, objetivou-se, neste trabalho, avaliar, durante o processo de aclimatização, o crescimento da planta e o acúmulo de nutrientes foliares do abacaxizeiro ‘Vitória’ propagado *in vitro*, em resposta à aplicação isolada e conjunta de ácido húmico de vermicomposto e bactérias promotoras de crescimento do gênero *Burkholderia*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Tratamentos

A matriz experimental [(2+2+1)+1] consistiu nos seguintes fatores em estudo: dois tratamentos com a inoculação de bactérias, *Burkholderia sp.* UENF 114111 (B1) e *Burkholderia silvatlantica* UENF 117111 (B2); outros dois tratamentos com a aplicação conjunta de ácido húmico de vermicomposto e bactérias, *Burkholderia sp.* UENF 114111 (B1+AH) e *Burkholderia silvatlantica* UENF 117111 (B2+AH); um tratamento com aplicação de ácido húmico de vermicomposto (AH); e um tratamento controle (-), sem aplicação de ácido húmico e bactérias. A unidade experimental consistiu em uma planta de abacaxi por vaso. O experimento foi realizado no delineamento em blocos ao acaso, com 5 repetições, totalizando 30 unidades experimentais.

## Material Vegetal

Plântulas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill), da cultivar Vitória (INCAPER, 2006), foram fornecidas pelo Laboratório de Biotecnologia BioMudas. As plântulas foram propagadas *in vitro*, em potes de vidro tipo *baby food*, e mantidas em meio MS descrito por Murashige & Skoog (1962), sem adição de reguladores de crescimento e vitaminas. As plântulas *in vitro* foram mantidas em sala de crescimento, com fluxo de fótons fotossintéticos de  $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , temperatura de  $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 16 horas. Após três meses de cultivo, as plântulas foram transferidas para novo meio MS, em tubos de ensaio. Para realização das etapas experimentais posteriores, foram selecionadas plântulas com aproximadamente 1,5 g de matéria fresca.

## Crescimento Bacteriano e Inoculação

Os isolados bacterianos utilizados foram provenientes da coleção de bactérias diazotróficas do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Ambas as estirpes *Burkholderia sp.* UENF 114111 e *Burkholderia silvatlantica* UENF 117111 foram isoladas de plantas de *Ananas comosus* (L.) Merrill, cultivar Smooth Cayenne, oriundas da área do Sistema Integrado de Produção Agroecológica, Embrapa Agrobiologia, Município de Seropédica, RJ (Santos, 2008) e apresentaram também a capacidade de solubilizar fosfatos *in vitro* (Baldotto et al., 2008).

As bactérias cresceram em meio líquido DYGS (Döbereiner et al., 1995) por 24 h, em agitador a 120 rpm, a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Para inoculação bacteriana, as plântulas foram retiradas dos tubos de ensaio, lavadas em água corrente para a limpeza do meio de cultivo e as raízes foram imersas em 10 mL do meio bacteriano ( $10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) por 30 min e posterior aplicação do mesmo meio no substrato (Mello et al., 2002). Nos tratamentos contendo ácido húmico as plântulas foram previamente colocadas em potes de vidro tipo *baby food* contendo 50 mL de ácido húmico isolado de vermicomposto na concentração de  $15 \text{ mmol L}^{-1}$  de C por 24 h (Baldotto et al., 2009). O ácido húmico de vermicomposto foi previamente caracterizado (Baldotto et al., 2007; Busato, 2008), e apresenta como características principais  $485 \text{ g kg}^{-1}$  de C,  $25 \text{ g kg}^{-1}$  de N, relação C / N de 19,4, 3040 e 2850  $\text{mmol}_c \text{ kg}^{-1}$  de acidez carboxílica e fenólica, respectivamente. O tratamento controle foi imerso por 30 min em meio DYGS autoclavado. Posteriormente, os abacaxizeiros foram transferidos para vasos de  $1,0 \text{ dm}^3$  contendo substrato Plantmax Hortaliças®, para serem

aclimatados, em casa de vegetação, por um período de 90 dias. A cada 15 dias durante a aclimatização, todas as plantas receberam 5 mL de solução nutritiva (Hoagland & Arnon, 1950) e para os tratamentos contendo ácidos húmicos também foram adicionados 5 mL ( $15 \text{ mmol L}^{-1}$  de C), aplicados nas axilas das folhas basais dos abacaxizeiros, usando-se pipeta automática (Baldotto et al., 2009).

### **Análises de crescimento**

Aos 90 dias da aclimatização, as plantas foram coletadas para a mensuração das seguintes variáveis: matéria fresca da raiz (MFR) e da parte aérea (MFPA), matéria seca da raiz (MSR) e da parte aérea (MSPA) obtidas pela secagem em estufa sob ventilação forçada de ar a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  por 7 dias e a área foliar (AF) obtida no medidor de área foliar de bancada modelo LI-3100, LI-COR, USA.

### **Análises nutricionais**

Após a secagem, as folhas dos abacaxizeiros foram moídas em moinho do tipo Wiley acoplado a peneiras de 60 malhas  $\text{cm}^{-2}$ . Em seguida, o pó obtido foi submetido à digestão sulfúrica combinada com peróxido de hidrogênio e determinados os teores totais de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg). Para N, foi utilizado o método de Nessler e a dosagem de P foi obtida por espectrofotometria de absorção molecular (colorimetria), após reação com vitamina C e molibdato de amônio, no comprimento de onda de 725 nm; a determinação de K foi realizada por fotometria de chama e os teores de Ca e de Mg foram dosados por espectrofotometria de absorção atômica. Todas as análises foram realizadas conforme os métodos usuais para a cultura do abacaxizeiro (Ramos et al., 2006). Os conteúdos de N, P, K, Ca e Mg foram estimados por meio da multiplicação da matéria seca da parte aérea e o teor do nutriente considerado.

### **Contagem bacteriana**

A contagem das bactérias presentes nas raízes e na parte aérea foi realizada por meio da técnica do Número Mais Provável (Döbereiner et al., 1995). Amostras de 1 g das raízes e 1 g da parte aérea foram maceradas em 9 mL de solução salina ( $\text{NaCl}$ ,  $8,5 \text{ g L}^{-1}$ ) e, a partir destas diluições ( $10^{-1}$ ), foram realizadas as diluições seriadas tomando-se 1 mL da diluição original em 9

mL de solução salina até a diluição  $10^{-7}$ . Alíquotas de 100  $\mu$ L das diluições foram transferidas para frascos de vidro contendo 5 mL do meio JMV (Baldani, 1996). Os frascos foram incubados a 30 °C, por 7 dias. Decorrido este período, avaliou-se o crescimento bacteriano pela presença de uma película branca na superfície do meio. O número de bactérias foi obtido pela consulta à Tabela de McCrady para três repetições por diluição.

### **Análises estatísticas**

Os resultados foram submetidos à análise de variância e os efeitos dos tratamentos foram desdobrados em contrastes médios (Quadro 1) conforme Alvarez V. & Alvarez (2006). A aplicação do teste F aos desdobramentos dos fatores foi realizada aos níveis de 10, 5 e 1 % de probabilidade.

## **RESULTADOS**

De posse das médias apresentadas no quadro 2, foram obtidos os contrastes médios (Quadro 3) que representam a diferença em real magnitude entre a média dos tratamentos comparados (Alvarez V. & Alvarez, 2006). Foi possível observar diferenças no crescimento dos abacaxizeiros propagados *in vitro* durante a aclimatização com a aplicação isolada e conjunta de ácido húmico e bactérias promotoras de crescimento. O contraste que compara a matéria seca da parte aérea e do sistema radicular dos abacaxizeiros, entre o controle e aplicação isolada de ácido húmico (controle versus AH), mostrou incrementos de 13 e 8 %, respectivamente (Quadro 3). Para as características nutricionais dos abacaxizeiros que receberam apenas AH foram também verificados incrementos de 20, 14, 3, 25, 52 % de N, P, K, Ca, Mg, respectivamente, sobre o controle. Entretanto, essas diferenças não foram significativas pelo teste F (Quadro 3).

Para a aplicação isolada de bactérias, todas as características de crescimento da parte aérea e do sistema radicular, bem como os conteúdos de nutrientes foliares dos abacaxizeiros, apresentaram incrementos significativos sobre o controle (controle versus B), como, por exemplo, aumento, em média de 52,03 cm<sup>2</sup> de área foliar, correspondente a um incremento relativo de 97 % (Quadro 3). Para N, P, K a inoculação das bactérias do gênero *Burkholderia* incrementaram em 115, 112 e 69 %, respectivamente, os conteúdos desses nutrientes nas folhas dos abacaxizeiros quando comparados com o do controle (Quadro 3).

A superioridade da aplicação conjunta de AH e *Burkholderia* sobre o controle (controle versus B+AH) foi verificada para todas as características de crescimento avaliadas, apresentando incrementos de 147 % de matéria fresca da parte aérea, 104 % de matéria seca, 122 % de área foliar, 105 % de matéria fresca da raiz e 61 % de matéria seca da raiz (Quadro 3). A promoção de crescimento das mudas com o uso conjunto de AH e bactérias resultaram também em aumentos nos conteúdos dos nutrientes foliares, como, por exemplo, 132, 131 e 80 %, de N, P e K, respectivamente, sobre o controle (Quadro 3).

As aplicações conjuntas de AH e bactérias foram significativamente superiores à aplicação isolada de AH para todas as características avaliadas (AH versus B+AH), com incrementos, por exemplo, de 111 % de matéria seca da parte aérea, 49 % de matéria seca da raiz, 93 e 102 % nos conteúdos foliares de N e P, respectivamente (Quadro 3). De outra forma, na comparação entre a aplicação conjunta de AH e bactéria com a inoculação isolada da bactéria (B versus B+AH) foram observados incrementos percentuais para todas as características de crescimento e nutricionais dos abacaxizeiros avaliadas, como, por exemplo, 13 % de área foliar, 3 % de matéria seca de raiz, 8 e 9 % no conteúdo foliar de N e P, respectivamente. No entanto esses incrementos não foram significativos (Quadro 3).

Com relação ao nível populacional de bactérias diazotróficas endofíticas introduzidas nas plântulas de abacaxizeiro, ficou evidenciado um efeito marcante da inoculação que elevou respectivamente em 3 e 2 unidades logarítmicas a população de bactérias no tecido radicular e na parte aérea. Não foram observadas alterações no número mais provável (NMP) de bactérias presentes no sistema radicular com a aplicação de AH (Quadro 4). No entanto, para a parte aérea dos abacaxizeiros houve uma diminuição entre 1 e 1,5 unidades log quando se aplicou AH (Quadro 4). Ademais, observou-se que ao final do experimento, plantas não inoculadas abrigavam uma população natural de bactérias diazotróficas entre  $10^3$  e  $10^4$  células  $g^{-1}$  de massa fresca vegetal.

## DISCUSSÃO

No presente estudo foi constatado o efeito biofertilizante e bioestimulante da aplicação isolada e, principalmente, conjunta, de ácido húmico (AH) de vermicomposto e bactérias do gênero *Burkholderia*, que resultaram em incrementos nas características de crescimento e nutricionais do abacaxizeiro ‘Vitória’ durante a aclimatização (Quadros 2 e 3). O período de aclimatização do abacaxizeiro é considerado crítico por causa das baixas taxas de crescimento do

sistema radicular e da parte aérea. Nesta fase, ajustes estruturais e fisiológicos das plântulas às condições *ex vitro* são necessários para acomodar a fase subsequente de estabelecimento da cultura no campo (Barboza et al., 2006). Abordagens tecnológicas que resultem na promoção do crescimento das plântulas de abacaxizeiro podem ter impacto significativo na produção e adaptação de mudas oriundas de cultura de tecidos no ambiente de produção.

A aplicação isolada de AH de vermicomposto resultou, em média, em incrementos nas características de crescimento e acúmulo de nutrientes do abacaxizeiro ‘Vitória’ aos 90 dias de aclimatização em relação ao controle. No entanto, esses resultados não foram significativos. Esse fato sugere uma resposta tempo dependente da aplicação foliar do AH na promoção de crescimento das plântulas de abacaxizeiro, uma vez que Baldotto et al. (2009), relataram aumentos significativos nas mesmas características em resposta a aplicação de AH de vermicomposto no abacaxizeiro ‘Vitória’ aos 150 dias de aclimatização.

A expressão da promoção de crescimento do abacaxizeiro pelo uso de AH pode ser, em parte, atribuída à sua atividade similar a auxinas, hormônios sintetizados pelas plantas que em concentrações variando de micro a nanomolares, estimulam a atividade da bomba eletrogênica H<sup>+</sup>-ATPase de membrana plasmática (Chen & Avid, 1990; Canellas et al., 2002). Com a acidificação do apoplasto, enzimas degradadoras de parede celular ficariam ativas, tornando as células mais susceptíveis à ação da pressão de turgescência vacuolar. Com isso, ocorreria a expansão celular (Hager et al., 1991; Frias et al., 1996). Sondergaard et al. (2004) propuseram que os AH são responsáveis pela ativação de transportadores secundários, acarretando aumento da absorção de macro e micronutrientes, mecanismo que pode ser explicado pela ação das H<sup>+</sup>ATPases na polarização da membrana plasmática e, conseqüentemente, na ativação de transportadores. Recentemente, Canellas et al. (2008) verificaram que a exsudação radicular de ácidos orgânicos, como, por exemplo, cítrico e oxálico, foi aumentada em raízes de milho em resposta à aplicação de ácidos húmicos. Esses ácidos orgânicos podem causar a fragmentação da estrutura supramolecular dos AH (Piccolo, 2001), liberando moléculas bioativas previamente estabilizadas por ligações fracas, candidatas a ativar a bomba de prótons da membrana plasmática de células de raiz (Façanha et al., 2002; Canellas et al., 2006). Bactérias do gênero *Burkholderia* também sintetizam e secretam ácidos orgânicos (Rodríguez & Fraga, 1999), fato que poderia, em parte, explicar os efeitos sinérgicos do uso conjunto de AH e bactéria no desenvolvimento do abacaxizeiro.

Com relação aos tratamentos que foram inoculados com *Burkholderia*, foram observados, sistematicamente, efeitos superiores, para todas as características avaliadas de crescimento e nutricionais do abacaxizeiro ‘Vitória’, em relação ao controle e ao uso isolado de AH (Quadros 2 e

3). A promoção do crescimento das plantas em resposta à inoculação de *Burkholderia* foi também relatada em abacaxizeiros 'Pérola' e 'Smooth Cayenne' (Weber et al., 2003a). Outras espécies, tais como tomateiro (Caballero-Mellado et al., 2007; Jiang et al., 2008), guandu (Pandey & Maheshwari, 2007), milho (Bevinino et al., 2000; Jiang et al., 2008) e videira (Ait Barka et al., 2000) também se beneficiam com a interação planta-*Burkholderia*. Esse gênero abriga uma ampla gama de bactérias, incluindo desde bactérias fitopatogênicas (Burkholder, 1950), bactérias diazotróficas endofíticas (Weber et al., 1999; Cruz et al., 2001), a estirpes simbiotes do grupo beta-rizóbio que induzem a formação de nódulos fixadores de nitrogênio nas raízes das plantas hospedeiras (Rasolamampianina et al., 2005; Elliot et al., 2007). As estirpes usadas no presente trabalho são diazotróficas endofíticas, sendo *Burkholderia silvatlantica* identificada pela primeira vez associada a plantas de milho e cana-de-açúcar (Perin et al., 2006). Os mecanismos envolvidos na promoção do crescimento vegetal pela ação das *Burkholderia* envolvem não apenas a fixação biológica de nitrogênio, como também podem ser atribuídos à solubilização de fosfatos (Anandham et al., 2007; Jiang et al., 2008), produção de fitohormônios (Jiang et al., 2008), atuação na atividade da ACC desaminase (Pandey et al., 2005; Jiang et al., 2008), síntese de sideróforos (Bevinino et al., 1994; Jiang et al., 2008) e biocontrole (Cain et al., 2000; Vandamme et al., 2007). Em estudos prévios de seleção de bactérias diazotróficas isoladas de abacaxizeiro, as estirpes usadas no presente trabalho destacaram-se quanto à capacidade, *in vitro*, de solubilizar fosfato de cálcio ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ) e óxido de zinco ( $\text{ZnO}$ ), secretar compostos indólicos e atuar antagonicamente ao fungo fitopatogênico *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* (nesta tese).

Devido aos diferentes mecanismos envolvidos na promoção do crescimento das plantas, as *Burkholderia* são potencialmente usadas na formulação de biofertilizantes (Vessey et al., 2003; Anandham et al., 2007), visando a incrementos na produção de biomassa com menor ônus econômico e ambiental. Compant et al. (2008), no entanto, alertam para a necessidade de mais estudos sobre os riscos da dispersão dessas bactérias no ambiente agrícola, uma vez que as *Burkholderia* apresentam elevada plasticidade genômica e capacidade de adaptação a novas condições ambientais, e algumas estirpes são patogênicas às plantas (Burkholder, 1950; Takahashi et al., 2004), aos animais e seres humanos (Valvano et al., 2005, 2006).

Os dados populacionais revelaram que, independentemente da aplicação do ácido húmico, a bacterização das plântulas de abacaxizeiro por imersão do sistema radicular foi eficiente no estabelecimento da associação endofítica. Estudos prévios (Marques Júnior et al., 2008; Conceição et al., 2008) envolvendo respectivamente plantas de cana-de-açúcar e milho evidenciaram aumento de 10 a 1000 unidades log na população bacteriana associada à planta hospedeira, fato não observado no presente trabalho. Estudos estruturais mais detalhados devem ser realizados para

avaliar as peculiaridades da aplicação conjunta bactéria-AH em plantas de abacaxizeiro. Para os tratamentos não inoculados foi constatada a presença de bactérias em menor quantidade, o que condiz com Weber et al. (1999), que relatam a presença natural de bactérias diazotróficas associadas a abacaxizeiros.

Embora respostas positivas a aplicação de AH isolado de vermicomposto nas concentrações na faixa de 10 a 80 mg L<sup>-1</sup> de C estejam fartamente documentadas na literatura (Cacco & Dell’Agnola, 1984; Nardi et al., 1996; Muscolo et al., 1999; Façanha et al., 2002; Quaggiotti et al., 2004; Zandonadi et al., 2007), sua variabilidade de magnitude de resposta aponta para necessidade de intensificar os estudos envolvendo a estrutura química das substâncias húmicas e sua relação com bioatividade e mecanismos de ação sobre as plantas (Canellas et al., 2006). Também são necessários estudos adicionais para explicar os efeitos sinérgicos da aplicação conjunta de AH e bactérias diazotróficas endofíticas no desenvolvimento das plantas.

Os resultados obtidos no presente trabalho apontam para a possibilidade de uso de um novo insumo biológico baseado na combinação de bactérias promotoras de crescimento do gênero *Burkholderia* e frações bioativas da matéria orgânica na forma de ácidos húmicos em formulações biofertilizantes, visando acelerar o crescimento das plantas propagadas *in vitro* de abacaxizeiro durante a fase de aclimatização, o que pode representar alternativa importante para a redução de custos de produção com base na maior eficiência nutricional e de crescimento.

## CONCLUSÕES

1. Ácido húmico de vermicomposto e bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia* promoveram de maneira isolada e, principalmente, conjunta, o crescimento das plantas originadas de cultura *in vitro* do abacaxizeiro ‘Vitória’ na fase de aclimatização, uma vez que foram observados incrementos no crescimento da parte aérea, do sistema radicular e nos conteúdos de N, P, K, Ca e Mg.

2. O uso em conjunto de ácido húmico de vermicomposto e *Burkholderia* alterou o nível populacional de bactérias diazotróficas endofíticas na parte aérea e não alterou na raiz das plântulas de abacaxizeiro.

3. A promoção do crescimento das mudas de abacaxizeiro propagadas *in vitro* pela aplicação conjunta de ácido húmico de vermicomposto e *Burkholderia* melhorar a adaptação das plântulas ao ambiente *ex vitro*, reduzindo o período de aclimatização.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laboratório Biomudas, pelo fornecimento das mudas *in vitro* de abacaxizeiro, ao CNPq (projetos n. 484671/2007-3 e 308368/2007-0), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para a Fixação Biológica de Nitrogênio (INCT/CNPq), FAPERJ e IFS, pelo auxílio financeiro, ao professor Dr. Pedro Henrique Monnerat (UENF) e ao Sr. José Acácio da Silva (UENF), pela colaboração nas análises nutricionais.

## LITERATURA CITADA

- AIT BARKA, E.; BELARBI, A.; HACHET, C.; NOWAK J. & AUDRAN J.C. Enhancement of *in vitro* growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* L. co cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. FEMS Microbiol Lett 186: 91–95, 2000.
- ALMEIDA, W.A.B.; SANTANA G.S.; RODRIGUEZ, A.P.M. & COSTA, M.A.P.C. Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. Rev. Bras. de Frutic., 24: 296-300, 2002.
- ALVAREZ V. V.H. & ALVAREZ, G.A.M. Comparações de médias ou testes de hipóteses? Contrastes! Boletim Informativo da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 31: 24-34, 2006.
- ANANDHAM, R.; CHOI, K.H.; GANDHI, P.I.; YIM, W.J.; PARK, S.J.; KIM, K.A.; MADHAIYAN, M. & AS, T.M. Evaluation of shelf life and rock phosphate solubilization of *Burkholderia* sp. in nutrient-amended clay, rice bran and rock phosphate-based granular formulation. World J. Microbiol. Biotechnol., 23: 1121-1129, 2007.
- BALDANI, V.L.D. Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz, e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica. Seropédica : UFRRJ, 1996. 238p. Tese de Doutorado.
- 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 aclimatização. Revista Brasileira de Ciência do Solo, 2009a. (aceito para publicação).
- BALDOTTO, L.E.B.; BALDOTTO, M.A.; OLIVARES, F.L. & BRESSAN-SMITH, R. Solubilização de fosfatos por bactérias diazotróficas endofíticas e epifíticas. In: Fertbio, Londrina. Fertbio: desafios para o uso do solo com eficiência e qualidade ambiental, 2008.

- BALDOTTO, M.A.; CANELLAS, L.P.; CANELA, M.C.; SIMÕES, M.L.; MARTIN-NETO, L.; FONTES, M.P.F. & VELLOSO A.C.X. Propriedades redox e grupos funcionais de ácidos húmicos isolados de adubos orgânicos. R. Bras. Ci. Solo, 31: 465-475, 2007.
- 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. Pesq. Agropec. Bras., 41: 185-194, 2006.
- BEVIVINO, A.; DALMASTRI, C.; TABACCHIONI, S. & CHIARINI, L. Efficacy of *Burkholderia cepacia* MCI 7 in disease suppression and growth promotion of maize. Biol Fertil Soils 31: 225–231, 2000.
- BEVIVINO, A.; TABACCHIONI, S.; CHIARINI, L.; CARUSI, M.V.; DEL GALLO, M. & VISCA, P. Phenotypic comparison between rhizosphere and clinical isolates of *Burkholderia cepacia*. Microbiology 140: (5) 1069–1077, 1994.
- BURKHOLDER W.H. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. Phytopathology, 40: 115–117, 1950.
- BUSATO, J.G. Química do húmus e fertilidade do solo após adição de adubos orgânicos. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Campos dos Goytacazes, RJ, 2008. 135p.
- CABALLERO-MELLADO J., ONOFRE-LEMUS J., ESTRADA-DE LOS SANTOS P. & MARTÍNEZ-AGUILAR L. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. Appl Environ Microbiol 73: 5308–5319, 2007.
- CACCO, G. & DELL'AGNOLA, G. Plant growth regulator activity of soluble humic complexes. Can. J. Soil Sci., 64:225-228, 1984.
- CAIN, C.C.; HENRY, A.T.; WALDO, R.H.; CASIDA, L.J. & FALKINHAM, J.O. Identification and characteristics of a novel *Burkholderia* strain with broad-spectrum antimicrobial activity. Appl Environ Microbiol 66: 4139–4141, 2000.
- CANELLAS, L.P.; FAÇANHA, A.O.; FAÇANHA, A.R. & OLIVARES, F.L. Humic acids isolated from earthworm induces root mitotic sites and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. Plant Physiol., 30:1951-1957, 2002.
- CANELLAS, L.P.; TEIXEIRA JUNIOR, L.R.L.; DOBBSS, L.B.; SILVA, C.A.; MÉDICI, L.O.; ZANDONADI, D.B. & FAÇANHA, A.R. Humic acids crossinteractions with root and organic acids. Annals Applied Biol., 153:157-166, 2008.

- CANELLAS, L.P.; ZANDONADI, D.B.; OLIVARES, F.L. & FAÇANHA, A.R. Efeitos fisiológicos de substâncias húmicas - o estímulo às H<sup>+</sup>-ATPases. In: Manlio Silvestre Fernandes. (org.). Nutrição Mineral de Plantas. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006.
- CHEN, Y. & AVIAD, T. Effects of humic substances on plant growth. In: MaCCARTHY, P.; CAPP, C.E.; MALCOLM, R.L. & BLOOM, P.R., eds. Humic substances in soil and crop sciences: selected readings. Madison, American Society of America, 1990. p.161-186.
- CHEN, Y.; CLAPP, C.E. & MAGEN, H. Mechanisms of plant growth stimulation by humic substances: The role of organo-iron complexes. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 50:1089-1095, 2004.
- COMPANT, S.; NOWAK, J.; COENYE, T.; CLÉMENT, C. & BARKA, E.A. Diversity and occurrence of *Burkholderia* spp. in the natural environment. *FEMS Microbial Rev*, 32: 607-626, 2008.
- CONCEIÇÃO, P.M.; VIEIRA, H.D.; CANELLAS, L.P.; MARQUES JÚNIOR, R.B. & OLIVARES, F.L. . (NOTA CIENTÍFICA) Recobrimento de sementes de milho com ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43: 545-548, 2008.
- CRUZ, L.M.; MALTEMPI, DE SOUZA, E.M.; WEBER, O.B.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J & PEDROSA, F.O. 16S Ribosomal DNA Characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* spp.) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5): 2375-2379, 2001.
- D'EECKENBRUGGE, G.C. & LEAL, F. Morphology, Anatomy and Taxonomy. In: BARTHOLOMEW, D.P.; PAULL, R.E.; ROHRBACH, K.G. ed. *The Pineapple: Botany, Production and Uses*. CAB International, 2003, p. 13-32.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D. & BALDANI, J.I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. *Embrapa Agrobiologia, Seropédica*. 66p, 1995.
- ELLIOTT, G.N.; CHEN, W-M.; CHOU, J-H.; WANG, H-C.; SHEU, S-Y.; PERIN, L.; REIS, V.M.; MOULIN, L.; SIMON, M.F.; BONTEMPS, C.; SUTHERLAND, J.M.; BESSI, R.; DE FARIA, S.M.; TRINICK, M.J.; PRESCOTT, A.R.; SPRENT, J.I & JAMES, E.K. *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa* spp. and fixes nitrogen ex planta. *New Phytologist* 173, 168-180, 2007.
- FAÇANHA, A.R.; FAÇANHA, A.L.O.; OLIVARES, F.L.; GURIDI, F.; SANTOS, G.A.; VELLOSO, A.C.X.; RUMJANEK, V.M.; BRASIL, F.; SCHRIPEMA, J.; BRAZ-FILHO, R.; OLIVEIRA, M.A. & CANELLAS, L.P. Bioatividade de ácidos húmicos: Efeito

- sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. *Pesq. Agropec. Bras.*, 37: 1301-1310, 2002.
- FRIAS, I.; CALDEIRA, M.T.; PEREZ CASTINEIRA, J.R.; AVARRO AVINO, J.P.; CULIANEZ MACIA, F.A.; KUPPINGER, O.; STRANSKY, H.; PAGES, M.; HAGER, A. & SERRANO, R. A major isoform of the maize plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase, characterization and induction by auxin in coleoptiles. *Plant Cell*, 8: 1533-1544, 1996.
- HAGER, A.; DEBUS, G.; EDEL, H.G.; STRANSKY, H. & SERRANO, R. Auxin induces exocytosis and rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Planta*, 185: 527-537, 1991.
- HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. The water culture method of growing plants without soil. Berkeley, University of California, 1950. 32p.
- INCAPER (Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural). 'Vitória' nova cultivar de abacaxi resistente a fusariose. Documento n. 148, DCM-Incaper, Vitória, ES, 2006.
- JIANG, C.; SHENG, X.; QIAN, M. & WANG, Q. Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potencial in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. *Chemosphere*, 72: 157-164, 2008.
- MARQUES JUNIOR, R.; CANELLAS, L.P.; SILVA, L.G. & OLIVARES, F.L. Promoção de enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas. *R. Bras. Ci. Solo*, 32:1121-1128, 2008.
- MELLO, M.R.F.; MARIANO, R.L.R.; MENEZES, M.; CÂMARA, T.R. & ASSIS, S.M.P. Seleção de bactérias e métodos de bacterização de crescimento em mudas de abacaxizeiro micropropagadas. *Summa Phytopathol.*, 28:222-228, 2002.
- MURASHIGUE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plantarum*, 15: 473-497, 1962.
- MUSCOLO, A.; BOVALO, F.; GIONFRIDDO, F. & NARDI, S. Earthworm humic matter produces auxin-like effects on *Daucus carota* cell growth and nitrate metabolism. *Soil Biol. Biochem.*, 31: 1303-1311, 1999.
- NARDI, S.; CONCHERI, G.; DELL'AGNOLA, G. Biological activity of humus. In: Piccolo, A. ed. *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. Elsevier, New York, p. 361-406, 1996.
- PANDEY P., KANG S.C. & MAHESHWARI D.K. Isolation of endophytic plant growth promoting *Burkholderia* sp. MSSP from root nodules of *Mimosa pudica*. *Curr Sci* 89: 177-180, 2005.

- PERIN, L.; MARTINEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; BALDANI, J.I.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; REIS, V.M. & CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 1931–1937, 2006.
- PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances. *Soil Sci.*, 166: 810-832, 2001.
- QUAGGIOTTI, S.; RUPERT, B.; PIZZEGHELLO, D.; FRANCIOSO, O.; TUGNOLI, V. & NARDI, S. Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). *J. Exp. Bot.*, 55:803-813, 2004.
- RASOLOMAMPIANINA, R.; BAILLY, X.; FETIARISON, R.; RABEVOHITRA, R.; B'ENA, G.; RAMARROSEN, L.; RAHERIMANDIMBY, M.; MOULIN, L.; DE LAJUDIE, P.; DREYFUS, B. & AVARRE, J.C. Nitrogen-fixing nodules from rose wood legume trees (*Dalbergia* spp.) endemic to Madagascar host seven different genera belonging to  $\alpha$ - and  $\beta$ -Proteobacteria. *Mol Ecol* 14: 4135–4146, 2005.
- RAMOS, M.J.M.; MONNERAT, P. H.; CARVALHO, A.J.C. de ; PINTO, J.L.A. & SILVA, J.A. Nutritional deficiency in 'Imperial' pineapple in the vegetative growth phase and leaf nutrient concentration. *Acta Horticulturae*, 702: 133-139, 2006.
- RODRIGUEZ, H. & FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17: 319-339, 1999.
- SANTOS, S.T. Biogeografia de bactérias culturáveis associadas às fruteiras tropicais. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, Campos dos Goytacazes, RJ, 2008. 105p.
- SONDEGAARD, T.E.; SCHULZA, A. & PALMGREN, M.G. Energization of transport processes in plants. Roles of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Physiol.*, 136:2475-2482, 2004.
- TAKAHASHI, Y.; TAKAHASHI, K.; WATANABE, K. & KAWANO, T. Bacterial black spot caused by *Burkholderia andropogonis* on *Odontoglossum* and intergeneric hybrid orchids. *Biomed Life Sci*, 70: 284–287. 2004.
- TEIXEIRA, J.B.; CRUZ, A.R.R.; FERREIRA, F.R. & CABRAL, J.R. Biotecnologia aplicada à produção de mudas: produção de mudas micropropagadas de abacaxi. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, 3:42-47, 2001.
- VALVANO, M.A. Infections by *Burkholderia* spp.: the psychodramatic life of an opportunistic pathogen. *Future Microbiol* 1: 145–149, 2006.
- VALVANO, M.A.; KEITH, K.E. & CARDONA, S.T. Survival and persistence of opportunistic *Burkholderia* species in host cells. *Curr Opin Microbiol* 8: 99–105, 2005.

- VANDAMME, P.; OPELT, K.; KNÖCHEL, N.; BERG, C.; SCHÖNMANN, S.; DE BRANDT, E.; EBERL, L.; FALSEN, E. & BERG, G. *Burkholderia bryophyla* sp. nov. and *Burkholderia megapolitana* sp. nov., moss-associated species with antifungal and plant growth promoting properties. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 2228–2235, 2007.
- VESSEY, K.J. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*, 255: 571–586, 2003.
- WEBER, O.B.; CORREIA, D.; SILVEIRA, M.R.S.; CRISÓSTOMO, L.A.; OLIVEIRA, E. M. & SÁ, E. G. Efeito da bactéria diazotrófica em mudas micropropagadas de abacaxizeiros Cayenne Champac em diferentes substratos. *Pesq. Agropec. Bras.*, 38:689-696, 2003a.
- 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. *Pesq. Agropec. Bras.*, 38(12):1419-1426, 2003b.
- WEBER, O. B., BALDANI, V. L. D., TEIXEIRA, K. R. S., KIRCHHOF, G., BALDANI, J. I., DÖBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. *Plant and Soil*, 210, 103-113, 1999.
- ZANDONADI, D. B.; CANELLAS, L. P. & FAÇANHA, A. R. Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H<sup>+</sup> pumps activation. *Planta*, 225:1583-1595, 2007.

**Quadro 1. Coeficientes dos contrastes estudados para os tratamentos controle, ácido húmico, bactérias, bactérias e ácidos húmicos**

Tratamentos <sup>(1)</sup>	Contrastes <sup>(2)</sup>				
	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
(-)	-1	-2	-2	0	0
AH	+1	0	0	-2	0
B1	0	+1	0	0	-1
B2	0	+1	0	0	-1
B1+AH	0	0	+1	+1	+1
B2+AH	0	0	+1	+1	+1

<sup>(1)</sup> Tratamentos: (-) = controle; AH = ácido húmico; B1 = *Burkholderia sp.* UENF 114111; B2 = *Burkholderia silvatlantica* UENF 117111. <sup>(2)</sup> Contrastes: C<sub>1</sub> = controle versus ácido húmico; C<sub>2</sub> = controle (-) versus bactéria (B1, B2); C<sub>3</sub> = controle (-) versus bactéria e ácido húmico (B1+AH, B2+AH); C<sub>4</sub> = ácido húmico (AH) versus bactéria e ácido húmico (B1+AH, B2+AH); C<sub>5</sub> = bactéria (B1,B2) versus bactéria e ácido húmico (B1+AH, B2+AH).

**Quadro 2. Características de crescimento da parte aérea, do sistema radicular e o acúmulo de nutrientes do abacaxizeiro 'Vitória' em resposta a aplicação de ácido húmico e bactérias promotoras de crescimento durante a aclimatização**

Tratamentos <sup>(1)</sup>	Características de crescimento					Características nutricionais				
	Parte aérea <sup>(2)</sup>			Sistema radicular <sup>(3)</sup>		Conteúdo de nutrientes <sup>(4)</sup>				
	MFPA	MSPA	AF	MFR	MSR	N	P	K	Ca	Mg
	-----g-----		- cm <sup>2</sup> -	-----g-----		-----mg planta <sup>-1</sup> -----				
(-)	3,48	0,34	53,90	0,45	0,07	3,16	1,27	22,93	3,20	1,14
AH	3,96	0,38	56,75	0,67	0,07	3,80	1,45	23,55	4,01	1,74
B1	6,76	0,62	103,68	0,80	0,10	6,07	2,26	40,61	6,98	4,42
B2	7,31	0,66	108,18	0,81	0,10	7,50	3,11	37,02	7,12	5,09
B1+AH	8,40	0,76	120,52	0,91	0,11	7,96	3,18	46,64	7,96	7,04
B2+AH	8,74	0,61	119,32	0,92	0,11	6,68	2,66	35,86	6,83	5,20

<sup>(1)</sup> Tratamentos: (-) = controle; AH = ácido húmico; B1 = *Burkholderia sp.* UENF 114111; B2 = *Burkholderia silvatlantica* UENF 117111. <sup>(2)</sup> Parte aérea: MFPA = matéria fresca da parte aérea; MSPA = matéria seca da parte aérea; AF = área foliar. <sup>(3)</sup> Sistema radicular: MFR = matéria fresca da raiz; MSR = matéria seca da raiz. <sup>(4)</sup> Conteúdo de nutrientes: N, P, K, Ca, Mg = conteúdo de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, respectivamente.

**Quadro 3. Contrastes médios, incrementos relativos, quadrado médio do resíduo (QMR) e coeficiente de variação (CV) para as características de crescimento da parte aérea, sistema radicular e acúmulo de nutrientes no abacaxizeiro 'Vitória' em resposta à aplicação de ácido húmico e bactérias promotoras de crescimento durante a aclimatização**

F.V. <sup>(1)</sup>	G.L.	Contrastes médios (incrementos relativos <sup>(5)</sup> )									
		Características de crescimento					Características nutricionais				
		Parte aérea <sup>(2)</sup>			Sistema radicular <sup>(3)</sup>		Conteúdo de nutrientes <sup>(4)</sup>				
		MFPA	MSPA	AF	MFR	MSR	N	P	K	Ca	Mg
		-----g-----		- cm <sup>2</sup> -	-----g-----		-----mg planta <sup>-1</sup> -----				
(-) vs AH	1	0,49 (14)	0,04 (13)	2,85 (5)	0,22 (50)	0,005 (8)	0,64 (20)	0,18 (14)	0,62 (3)	0,82 (25)	0,60 (52)
(-) vs B	1	3,56* (102)	0,31* (92)	52,03** (97)	0,36** (81)	0,037* (56)	3,63* (115)	1,42* (112)	15,88° (69)	3,85* (120)	3,61° (315)
(-) vs B+AH	1	5,10** (147)	0,35** (104)	66,02** (122)	0,47** (105)	0,040* (61)	4,16* (132)	1,66* (131)	18,32* (80)	4,20** (131)	4,98* (435)
AH vs B+AH	1	4,61** (116)	0,30* (80)	63,16** (111)	0,24° (36)	0,035* (49)	3,52* (93)	1,48* (102)	17,69* (75)	3,38* (84)	4,38* (251)
B vs B+AH	1	1,53 (22)	0,04 (6)	13,99 (13)	0,11 (13)	0,003 (3)	0,54 (8)	0,24 (9)	2,43 (6)	0,35 (5)	1,37 (29)
QMR	24	5,57	0,05	1057,17	0,05	0,0008	8,59	1,47	202,96	6,40	11,53
CV (%)		36,62	41,19	34,69	30,30	31,29	49,98	52,25	41,37	42,07	82,67

<sup>(1)</sup> F.V.: (-) = controle; AH = ácido húmico; B = bactéria (B1, B2); B+AH = bactéria e ácido húmico (B1+AH, B2+AH). <sup>(2)</sup> Parte aérea: MFPA = matéria fresca da parte aérea; MSPA = matéria seca da parte aérea; AF = área foliar. <sup>(3)</sup> Sistema radicular: MFR = matéria fresca da raiz; MSR = matéria seca da raiz. <sup>(4)</sup> Conteúdo de nutrientes: N, P, K, Ca, Mg = conteúdo de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, respectivamente. <sup>(5)</sup> Incrementos relativos:  $100(x-y)/y$ , sendo x a média do tratamento de maior valor e y a média do tratamento de menor valor. °, \*, \*\*, significativo a 10, 5 e 1 % de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

**Quadro 4. Contagem do Número Mais Provável (NMP) de bactérias diazotróficas endofíticas presentes na parte aérea e no sistema radicular do abacaxizeiro ‘Vitória’ em resposta à aplicação de ácido húmico e bactérias promotoras de crescimento durante a aclimatização**

Tratamentos <sup>(1)</sup>	Número mais provável de bactérias diazotróficas endofíticas	
	Parte aérea	Sistema radicular
(-)*	4,5 x 10 <sup>3</sup>	2,5 x 10 <sup>4</sup>
AH*	1,5 x 10 <sup>3</sup>	4,5 x 10 <sup>4</sup>
B1	9,5 x 10 <sup>5</sup>	1,1 x 10 <sup>7</sup>
B2	9,5 x 10 <sup>5</sup>	1,4 x 10 <sup>7</sup>
B1+AH	4,5 x 10 <sup>4</sup>	1,4 x 10 <sup>7</sup>
B2+AH	7,5 x 10 <sup>4</sup>	1,4 x 10 <sup>7</sup>

<sup>(1)</sup> Tratamentos: (-) = controle; AH = ácido húmico; B1 = *Burkholderia sp.* UENF 114111; B2 = *Burkholderia silvatlantica* UENF 117111. \* Representa a população de bactérias diazotróficas endofíticas naturalmente associada a planta hospedeira.

#### 4. RESUMO E CONCLUSÕES

A inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas e epifíticas em conjunto com ácidos húmicos pode ser uma estratégia viável na aclimatização de mudas de abacaxizeiro propagadas *in vitro*, pois poderia promover o seu crescimento, diminuindo o longo tempo necessário para a transferência para as condições de campo. Nessa direção, no presente trabalho teve-se por objetivos: (i) avaliar o potencial de 20 estirpes de bactérias diazotróficas endofíticas e epifíticas em solubilizar fosfato de cálcio e óxido de zinco, sintetizar compostos indólicos e possuírem atividade antagônica ao fungo *Fusarium subglutinans f. sp. ananas*, em ensaios *in vitro*; (ii) avaliar o crescimento da planta e o conteúdo de nutrientes foliares do abacaxizeiro 'Vitória' em resposta à inoculação bacteriana durante a aclimatização e posteriormente selecionar as estipes promissoras; (iii) caracterizar estruturalmente a interação entre a bactéria marcada com *gfp* *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 e plântulas do abacaxizeiro 'Vitória'; (iv) avaliar as características anatômicas da lâmina foliar, o teor de pigmentos fotossintéticos, o crescimento da planta e o acúmulo de nutrientes foliares do abacaxizeiro 'Vitória' em resposta à aplicação de diferentes doses de ácidos húmicos isolados de vermicomposto e de torta de filtro durante a aclimatização; (v) avaliar o crescimento da planta e o acúmulo de nutrientes foliares do abacaxizeiro 'Vitória' em resposta à aplicação conjunta de ácido húmico de vermicomposto e bactérias promotoras de crescimento selecionadas (*Burkholderia spp.*) durante a aclimatização. Os resultados mostraram que as bactérias diazotróficas diferiram na capacidade de sintetizar compostos indólicos, solubilizar óxido de zinco e

fosfato de cálcio e atuar antagonicamente ao *Fusarium*. Com auxílio da análise multivariada, foi possível diferenciar os tratamentos e gerar critérios para selecionar as estirpes promissoras (UENF 118503b, UENF 118503a, UENF 117221 e UENF 114111) com base nas características de crescimento e nutricionais do abacaxizeiro 'Vitória'. Dentre essas características, a matéria seca da parte aérea, a matéria seca da raiz e o conteúdo foliar de K foram as que mais contribuíram para discriminar a variabilidade entre os tratamentos. Já as que menos contribuíram foram a área radicular e a altura das plantas. Os passos da interação entre a bactéria diazotrófica endofítica *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 e o abacaxizeiro 'Vitória' foram caracterizados por meio da microscopia ótica de campo claro, microscopia ótica de fluorescência e microscopia eletrônica de varredura: 1) colonização epifítica nas raízes sob os pêlos e nas junções das células epidérmicas, na parte aérea nas flanges cuticulares, tricomas, complexos estomáticos; 2) penetração radicular através das cavidades formadas pelo rompimento das células epidérmicas durante a emergência de raízes laterais, na parte aérea através dos ostíolos; 3) colonização endofítica nas raízes nos espaços intercelulares do parênquima cortical, na parte aérea nas câmaras subestomáticas e espaços intercelulares do parênquima clorofiliano; 4) formação de biofilmes no rizoplano e filoplano. O ácido húmico isolado de vermicomposto se mostrou mais bioativo do que o de torta de filtro, uma vez que promoveu incrementos no crescimento, no acúmulo de nutrientes e na relação clorofila *a* / clorofila *b* do abacaxizeiro 'Vitória' com menor dose aplicada (15 mmol<sup>-1</sup> de C). O uso conjunto de ácido húmico de vermicomposto e bactérias selecionadas (*Burkholderia spp.*) promoveu os maiores incrementos no crescimento da planta e nos conteúdos foliares de N, P, K, Ca e Mg do abacaxizeiro 'Vitória'. A inoculação conjunta alterou o nível populacional de bactérias diazotróficas na parte aérea e não o alterou na raiz das plântulas de abacaxizeiro. Portanto, a promoção do crescimento das mudas de abacaxizeiro propagadas *in vitro* pela aplicação conjunta das bactérias selecionadas e ácidos húmicos pode melhorar a adaptação das plântulas ao ambiente *ex vitro*, reduzindo o período de aclimatização.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, W. A. B., Santana G. S., Rodriguez, A. P. M., Costa, M. A. P. C. (2002). Optimization of a protocol for the micropropagation of pineapple. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 24: 296-300.
- Alström, S. (2001) Characteristics of bacteria from oilseed rape in relation to their biocontrol activity against *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, 149: 57-64.
- Andrews, J. H., Harris, R. F. (2000) The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. *Annual Review of Phytopathology*, 38: 145-80.
- Aquino, A. R. L. de, Vieira, A., Azevedo, J. A. de, Genú, P. J. de C., Kliemann, H. J. (1986) Nutrição mineral e adubação do abacaxizeiro. In: Haag, P. H. Nutrição mineral e adubação de frutíferas tropicais. Campinas, Fundação Cargill, p. 31-58.
- Arkhipova, T. N., Veselov, S. U., Melentiev A. I., Martynenko E. V., Kudoyarova, G. R. (2005) Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant and Soil*, 272: 201–209.
- Baldani, J. I., Salles, J. F., Olivares, F. L. (2002) Bactérias endofíticas como vetores de genes de resistência a insetos. In: L. L. Nass, A. C. C. Valois, I. S. de Melo, M. C. Valadares-Ingliš. (org.) Recursos Genéticos e Melhoramento - Microrganismos. 1ed. Brasília, v. 1, p. 589-602.
- Baldani, J. I., Caruso, L., Baldani, V. L., Goe, S. R., Döbereiner, J. (1997) Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 29: 911-922.

- Baldotto, L.E.B., Olivares, F.L. (2008) Phylloepiphytic interaction between bacteria and different plant species in a tropical agricultural system. *Canadian Journal of Microbiology*, 54: 918-31.
- Barboza, S. B. S. C., Graciano-Ribeiro, D., Teixeira, J. B., Portes, T. A., Souza, L. A. C. (2006) Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 41: 185-194.
- Barboza, S.B.S.C., Caldas, L.S., Souza, L.A.C. (2004). Micropropagação do híbrido PE x SC-52 e da cultivar Smooth Cayenne de abacaxizeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39: 725-733.
- Bashan, Y. (1998) Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, 16: 729 – 770.
- Bastián, F., Cohen, A., Piccoli, P., Luna, V., Baraldi, R., Bottini, R. (1998) Production of indole-3-acetic acid and gibberellin A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regulation*, 24: 7-11.
- Benhamou, N., Kloepper, J. W., Tuzun, S. (1998) Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. *Planta*, 204: 153-168.
- Byrne, J. M., Dianese, A. C., Ji, P., Campbell, H. L., Cuppels, D. A., Louws, F. J., Miller, S. A., Jones, J. B., Wilson, M. (2005) Biological control of bacterial spot of tomato under field conditions at several locations in North America. *Biological Control*, 32: 408–418.
- Bregonci, I. S., Schmildt, E. R., Coelho, R. I., Reis, E. F., Brum, V. J. , Santos, J. G. (2008) Adubação foliar com macro e micronutrientes no crescimento de mudas micropropagadas do abacaxizeiro cv. Gold [*Ananas comosus* (L.) Merrill] em diferentes recipientes. *Ciência e Agrotecnologia*, 32:705-711.
- Boddey, R. M., Urquiaga, S., Alves, B. J. R., Reis, V. M. (2003) Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. *Plant and Soil*, 252: 139-149.
- Bucher, C. A., Reis, V. M. (2008) Biofertilizante contendo bactérias diazotróficas. (Documentos / Embrapa Agrobiologia, 247) Seropédica, Embrapa Agrobiologia, 17p.

- Cabral, J. R. S., Matos, A. P. de (2003) Abacaxi 'Imperial' – variedade resistente à fusariose. Cruz das Almas, Embrapa Mandioca e Fruticultura (folder).
- Cabral, J. R. S., Souza, J. S., Ferreira, F. R. (1999) Variabilidade genética e melhoramento do abacaxi. In: Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro. Petrolina. Anais. 9p.
- Cabral, J. R. S. (1999) Melhoramento Genético. In: Cunha, G. A. P. da, Cabral, J. R. S., Souza, L. F. Da S. (org.). O abacaxizeiro. Cultivo, agroindústria e economia. 1 ed. Brasília: SPI, p. 83-103.
- Catunda, P. E. A., Marinho, C. S., Gomes, M. M. A., Carvalho, A. J. C. (2008) Brassinosteróide e substratos na aclimatização do abacaxizeiro 'Imperial'. *Acta Scientiarum Agronomy*, 30: 345-352.
- Chabot, R., Beauchamp, C. J., Kloepper, J. W., Antoun, H. (1998) Effect of phosphorous on root colonization and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. *Soil Biology and Biochemistry*, 30: 1615-1618.
- Chen, Y., Avid, T. (1990) Effects of humic substances on plant growth. In: Maccarthy, P., Capp, C. E., Malcolm, R. L., Bloom, P. R., eds. Humic substances in soil and crop sciences: selected readings. American Society of America, p.161-186.
- Chen, Y., Clapp, C. E., Magen, H. (2004) Mechanisms of plant growth stimulation by humic substances: The role of organo-iron complexes. *Soil Science & Plant Nutrition*, 50:1089-1095.
- Collins, J. L. (1960) The pineapple, botany, cultivation and utilization. New York, Interscience Publishers. 244p.
- Cunha, G. A. P. da, Cabral, R. S. C. (1999) Taxonomia, espécies, cultivares e morfologia. In: Cunha, G. A. P. da, Cabral, J. R. S., Souza, L. F. da S. O abacaxizeiro – cultivo, agroindústria e economia. Brasília, Embrapa mandioca e Fruticultura, p. 17-51.
- Daeker, R., Rughley, R. J., Kennedy, I. R. (2004) Legume seed inoculation technology – a review. *Soil Biology & Biochemistry*, 36: 1275-1288.
- D'Eeckenbrugge G. P., Leal, F. (2003) Morphology, anatomy and taxonomy. In: Bartholomew, D. P., Paull, R. E., Rohrbach, K. G. (Ed.) The pineapple: botany, production and uses. New York: CAB International. p.13-32.

- Delfine, S., Tognetti, R., Desiderio, E., Alvino A. (2005) Effects of foliar application of N and humic acids on growth and yield of durum wheat. *Agronomy Sustainable Development*, 25:183-191.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Broek, A. V., Vanderleyden, J. (1999) Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasiliense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil*, 212: 155-164.
- Embrapa (2009) Disponível: Site <http://www.cnpab.embrapa.br> - Acesso em 24 de Junho de 2009.
- Façanha, A. R., Façanha, A. L. O., Olivares, F. L., Guridi, F., Santos, G. A., Velloso, A. C. X., Rumjanek, V. M., Brasil, F., Schripsema, J., Braz-Filho, R., Oliveira, M. A., Canellas, L. P. (2002) Bioatividade de ácidos húmicos: Efeito sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37: 1301-1310.
- Ferrara, G., Brunetti, G. (2008) Influence of foliar applications of humic acids on yield and fruit quality of table grape cv. Itália. *Journal International des Science du la Vigne et du Vin*, 42: 79-87.
- Ferreira, F. R., Cabral, J. R. S (1993) Pineapple germplasm in Brazil. *Acta Horticulturae*, 334: 23-26.
- Frias, I., Caldeira, M. T., Perez Castineira, J. R., Avarro Avino, J. P., Culianez Macia, F. A., Kuppinger, O., Stransky, H., Pages, M., Hager, A., Serrano, R. (1996) A major isoform of the maize plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase, characterization and induction by auxin in coleoptiles. *Plant Cell*, 8: 1533-1544.
- Fuentes-Ramirez, L. E., Jimenez-Salgado, T., Abarca-Ocampo, I. R., Cabellero-Mellado, J. (1993) *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant and Soil*, 154: 145-150.
- Garg, S. K., Bhatnagar, A., Kalla, A., Narula, N. (2001) In vitro fixation, phosphate solubilization, survival and nutrient release by *Azotobacter* strains in an aquatic system. *Bioresource Technology*, 80: 101-109.
- Gyaneshwar, P., Kumar, G. N., Pareky, L. J., Poole, P. S. (2002) Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil*, 245: 83-93.

- Goldstein, A. H., Braverman, K., Osorio, N. (1999) Evidence for mutualism between a plant growing in a phosphate-limited desert environment and a mineral phosphate solubilizing (MPS) rhizobacterium. *FEMS Microbiology Ecology*, 30: 295-300.
- Gonçalves, N. B, Carvalho, V. D. de (2000) Abacaxi-pós-colheita - 2. Característica da Fruta. *Frutas do Brasil*, Brasília, DF, 5:13-27.
- Guerra, J. C. M., Santos, G. A., Silva, L. S., Camargo, F. A. O. (2008) Macromoléculas e substâncias húmicas. In: Santos, G. A., ed. *Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais & subtropicais*. 2 ed. Porto Alegre, Metrópole, p. 19-26.
- Guerra, M. P., Dal Vesco, L. L., Pescador, R., Schuelter, A. R. , Nodari, R. O. (1999) Estabelecimento de um protocolo regenerativo para a micropropagação do abacaxizeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34: 1557-1563.
- Hallmann, J., Quadts-Hallmann, A., Mahaffee, W. F., Kloepper, J. W. (1997) Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43: 895-914.
- Hager, A., Debus, G., Edel, H.G., Stransky, H., Serrano, R. (1991) Auxin induces exocytosis and rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Planta*, 185: 527-537.
- Han, S. O., New, P. B. (1998) Variation in nitrogen fixing ability among natural isolates of *Azospirillum*. *Microbial Ecology*, 36: 193-201.
- IBGE, (2009). Disponível: Site <http://www.sidra.ibge.gov.br> - Acesso em 24 de Junho de 2009.
- INCAPER (Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural). 'Vitória' nova cultivar de abacaxi resistente a fusariose. Documento n. 148, DCM-Incaper, Vitória, ES, 2006.
- Jetiyanon, K., Kloepper, J. W. (2002) Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria for induction of systemic resistance against multiple plant diseases. *Biological Control*, 24: 285-291.
- Karadeniz, A., Topcuoglu, S. F., Inan, S. (2006) Auxin, gibberellin, cytokinin and abscisic acid production in some bacteria. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 22: 1061-1064.

- Katiyar, V., Goel, R. (2003) Solubilization of inorganic phosphate and plant growth promotion by cold tolerant mutants of *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology Research*, 158: 163-168.
- Kennedy, I. R., Choudhury, A. T. M. A., Kecskés, M. L. (2004) Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? *Soil Biology and Biochemistry*, 1-16.
- Klopper, J. W., Rodriguez-Ubana, R., Zehnder, G. W., Murphy, J. F., Sikora, E., Fernández, C. (1999) Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Australasian Plant Pathology*, 28: 21-26.
- Koenig, R. L., Morris, R. O., Polacco, J. C. (2002) tRNA is the source of low-level trans zeatin production in *Methylobacterium* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 184: 1832-1842.
- Kononova, M. M. (1982) *Matéria orgânica del suelo: su naturaleza, propiedades y métodos de investigacion*. Barcelona: Oikos-Tau, 365p.
- Kuklinsky-Sobral, J., Araújo, W. L., Mendes, R., Geraldi, I. O., Pizzirani-Kleiner, A. A., Azevedo, J. L. (2004) Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental Microbiology*, 6: 1244–1251.
- Kumar, V., Narula, N. (1999) Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. *Biology and Fertility of Soils*, 28: 301-305.
- Leal, J. R., Velloso, A. R. X. (1973) Adsorção de fosfato em latossolos sob vegetação de cerrado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 8: 81-88.
- Lindow, S. E., Brandl, M. T. (2003) Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 1875-1883.
- Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E. R. B., Taghavi, S., Mezgeay, M., van der Lelie, D. (2002) Endophytic bacteria and their potencial applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 21: 583-606.
- Lucangeli, C., Bottini, R. (1997) Effects of *Azospirillum* spp. on endogenous gibberellin content and growth of maize (*Zea mays* L.) treated with uniconazole. *Symbiosis*, 23: 63-72.
- Malavolta, E. (1982) Nutrição mineral e adubação do abacaxizeiro. In: *Anais do simpósio brasileiro de Abacaxicultura*, 1, Jaboticabal, p. 121-153.

- Malézieux, E., Bartholomew, D. P. (2003) Plant Nutrition. In: Bartholomew, D. P., Paul, R. E., Rohrbach, K. G. (eds.) The pineapple – botany, production and uses. Honolulu: CABI Publishing, p. 143-165.
- May, R., Völksch, B, Kampmann, G. (1997) Antagonistic activities of epiphytic bacteria from soybean leaves against *Pseudomonas syringae* pv. glycinea in vitro and in planta. *Microbial Ecology*, 34: 118-124.
- Manica, I. (1999) Fruticultura Tropical 5. Abacaxi. Porto Alegre: Cinco Continentes. 501p.
- MAPA, (2009). Disponível: Site <http://www.agricultura.gov.br> - Acesso em 24 de Junho de 2009.
- Moreira, M. A., Carvalho, J. G., Pasqual, M., Fráguas, C. B. , Silva, A. B. (2006) Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola. *Ciência Agrotecnologia*, 30:875-879.
- Moreira, M. A. (2001). Produção e aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro *Ananas comosus* (L) Merrill cv. Pérola. Tese (Doutorado UFLA) Lavras – MG, 81 p.
- Marques Junior, R., Canellas, L. P., Silva, L. G. , Olivares, F. L. (2008) Promoção de enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 32:1121-1128.
- Matos, A. P. (1999) Doenças e seu controle. In: Cunha, G. A. P. da, Cabral, J. R. S., Souza, L. F. Da S. (Org.). O abacaxizeiro. Cultivo, agroindústria e economia. 1 ed. Brasília: SPI, v. , p. 269-305.
- Matos, A. P., Cabral, J.R.S. (1998) Interação entre variedades de abacaxi e isolados de *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 10:55-61.
- Mello, M. R. F., Mariano, R. L. R., Menezes, M., Câmara, T. R., Assis, S. M. P (2002) Seleção de bactérias e métodos de bacterização para promoção de crescimento em mudas de abacaxizeiro micropropagadas. *Summa Phytopathologica*, 28: 222-228.
- Nannipieri, P., Greco, S., Dellágnola, G., Nardi, S. (1993) Proprietá biochimiche e fisiologiche della sostanza orgânica. In: Nannipieri, P. ed. Ciclo della sostanza orgânica nel suolo: aspect agronomici, chimici, ecologici, selvicolturali. Bologna, Patron, p. 67-78.

- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vianello, A. (2002) Physiological effects of humic substances in higher plants. *Soil Biology & Biochemistry*, 34:1527–1537.
- Nautiyal, C. S. (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170: 265-270.
- Novais, R. F., Smyth, T. J. (1999) Fósforo em solo e planta em condições tropicais. Viçosa: UFV, DPS. 399p.
- Nowak, J., Asiedu, S. K., Bensalim, S., Richards J., Stewart, A., Smith, C., Stevens, D., Sturz, A. V. (1998) From laboratory to applications: challenges and progress with in vitro dual cultures of potato and beneficial bacteria. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 50: 97-103.
- Okon, Y., Labandera-Gonzalez, C. A. (1994) Agronomic applications of *Azospirillum* – an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biology & Biochemistry*, 26: 1591-1601.
- Okon, Y., Itzigsohn, R. (1995) The development of *Azospirillum* as a commercial inoculant for improving crop yields. *Biotechnology Advances*, 13: 415-424.
- Özaktan, H., Bora, T. (2004) Biological control of fire blight in pear orchards with a formulation of *Pantoea agglomerans* strain EH 24. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35: 224-229.
- Patten, C. L., Glick, B. R. (2002) Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 3795-3801.
- Patten, C. L., Glick, B. R. (1996) Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, 42: 207-220.
- Paula, M. B. de, Mesquita, H. A. de, Nogueira, F. D. (1998) Nutrição e adubação do abacaxizeiro. *Informe Agropecuário*, 19: 33-39.
- Py, C., Lacoeyilhe, J. J., Teisson, C (1984) L' Ananás: sa culture, ses produits. Paris: Maisonneuve et Larose, 537p.
- Piccolo, A. (2001) The supramolecular structure of humic substances. *Soil Sci.*, 166: 810-832.
- Rayle, D. L., Cleland, R. E. (1992) The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology*, 99:1271-1274.

- Ramos, M. J. M. (2006) Caracterização e sintomas de deficiência de macronutrientes e de boro em abacaxizeiro cultivar Imperial. Tese (Doutorado em produção Vegetal), Universidade estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ. 95p.
- Reinhardt, D. H. R. C., Cunha, G. A. P. da (1999) Métodos de propagação. In: Cunha, G. A. P. da, Cabral, J. R. S., Souza, L. F. Da S. (Org.). O abacaxizeiro. Cultivo, agroindústria e economia. 1 ed. Brasília: SPI, v. , p. 83-103.
- Reis, V. M., Baldani, J. I., Baldani, V. L. D., Döbereiner, J. (2000) Biological dinitrogen fixation in gramineae and plam trees. *Critical Reviews in Plant Science*, 19: 227-247.
- Rocha, J. C., Rosa, A. H. (2003) Substâncias húmicas aquáticas: interação com espécies metálicas. São Paulo, Editora Unesp, 120p.
- Rodda, M. R. C., Canellas, L. P., Façanha, A. R., Zandonadi, D. B., Almeida, D. L., Guerra, J. G. M. , Santos, G. A. (2006) Estímulo no crescimento e na hidrólise de ATP em raízes de alface tratadas com humatos de vermicomposto. I - efeito da concentração *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 30: 649-656.
- Rodriguez, H., Gonzalez, T., Selman, G. (2000) Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. *Journal of Biotechnology*, 84: 155-161.
- Rodriguez, H., Fraga, R. (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17: 319-339.
- Siddiqui, I. A., Shaukat, S. S. (2003) Effects of *Pseudomonas aeruginosa* on the diversity of culturable microfungi and nematodes associated with tomato: impact on root-knot disease and plant growth. *Soil Biology & Biochemistry*, 35: 1359-1368.
- Singh, P., Piotrowski, M., Kloppstech, K., Gau, A. E. (2004) Investigations on epiphytic living *Pseudmonas* species from *Mallus domestica* with an antagonistic effect to *Venturia inaequalis* on isolated plant cuticle membranes. *Environmental Microbiology*, 11: 1149-1158.
- Sondegaard, T. E., Schulza, A., Palmgren, M. G. (2004) Energization of transport processes in plants. Roles of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Physiology*, 136: 2475-2482.

- Sottero, A. N., Freitas, S. S., Melo, A. M. T., Trani, P. E. (2006) Rizobactérias e alface: colonização rizosférica, promoção de crescimento e controle biológico. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 30: 225-234.
- Souza Júnior, E.E., Barboza, S. B. S. C. , Souza, L. A. C. (2001) Efeitos de substratos e recipientes na aclimatização de plântulas de abacaxizeiro [Ananas comosus (L.) Merrill] cv. Pérola. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 31: 147-151.
- Souza, L. F. da S. (1999) Exigências edáficas e nutricionais. In: Cunha, G. A. P. da, Cabral, J. R. S., Souza, L. F. da S. (orgs) *O abacaxizeiro, cultivo, agroindústria e economia*. Brasília: Embrapa comunicação para transferência de tecnologia, p. 67-82.
- Stevenson, F. J. (1994) *Humus chemistry – genesis, composition, reactions*. 2. ed. New York: John Willey, 496p.
- Sturz, A. V., Christies, B. R., Nowak, J. (2000) Bacterial endophytes, potencial role in developing sustainable systems of crop production. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 19: 1-30.
- Strobel, G. A. (2002) Rainforest endophytes and bioactive products. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22: 315-333.
- Taiz, I., Zeiger, E. (1991) *Plant Physiology*. Redwood City: the Benjamin / Cummings Publishing Company. 564p.
- Tapia-Hernández, A., Bustillos-Cristales, M. R., Jiménez-Salgado, T., Caballero-Mellado, J., Fuentes-Ramírez, L. E. (2000) Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. *Microbial Ecology*, 39: 49-555.
- Teixeira, J. B., Cruz, A. R. R., Ferreira, F. R., Cabral, J. R. (2001) Biotecnologia aplicada à produção de mudas: produção de mudas micropropagadas de abacaxi. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, v. 3, p. 42-47.
- Tejada, M., Gonzalez J. L. (2004) Effect of foliar application of a byproduct of the two-step olive oil mill process on rice yield. *European Journal of Agronomy*, 21: 31-40.
- Vaughan, D., Malcolm, R. E. (1985) Influence of humic substances on growth and physiological process. In: Vaughan, D., Malcolm, R. E. ed.. *Soil organic matter and biological activity*. Dordrecht: Kluwer Academic, 37-75.

- Vazquez, P., Holguin, G., Puente, M. E., Lopez-Cortes, A., Bashan, Y. (2000) Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biology and Fertility of Soils*, 30: 460-468.
- Verma, S. C., Ladha, J. K., Tripathi, A. K. (2001) Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *Journal of Biotechnology*, 91: 127-141.
- Ventura, J. A., Zambolim, L., Gilbertson, R. L. (1993) Proposição de nova forma *specialis* em *Fusarium subglutinans* no abacaxizeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 18:280.
- Vessey, K. J. (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*, 255: 571–586.
- Weber, O. B., Correia, D., Silveira, M. R. da, Crisóstomo, L. A., Oliveira, E. M. de, Sá, E. G. (2003a) Efeito da bactéria diazotrófica em mudas micropropagadas de abacaxizeiro Cayenne Champac em diferentes substratos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38: 689-696.
- Weber, O. B., Correia, D., Rocha, M. W., Alvez, G. C., Oliveira, E. M., Sá, E. G. (2003b) Resposta de plantas micropropagadas de abacaxizeiro à inoculação de bactérias diazotróficas em casa de vegetação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38: 1419-1426.
- Weber, O. B., Baldani, V. L. D., Teixeira, K. R. S., Kirchhof, G., Baldani, J. I., Döbereiner, J. (1999) Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. *Plant and Soil*, 210: 103-113.
- Whipps, J. M. (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52: 487-511.
- Zahir, Z. A., Arshad, M., Frankenberger Jr, W. T. (2003) Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. *Advances in Agronomy*, 81: 97-168.
- Zandonadi, D. B., Canellas, L. P., Façanha, A. R. (2007) Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H<sup>+</sup> pumps activation. *Planta*, 225:1583-1595.

## **6. APÊNDICES**

## APÊNDICE A – CAPÍTULO 1

**Quadro 1. Média das características de crescimento da parte aérea do abacaxizeiro ‘Vitória’ em resposta à inoculação com bactérias endofíticas e epifíticas**

Tratamentos	Características de crescimento da parte aérea <sup>(1)</sup>						
	NF	ALT	DR	DC	MFPA	MSPA	AF
		-----cm-----		-mm-	-----g-----		-cm <sup>2</sup> -
Controle	17,11 b	10,50 b	15,78 c	13,34 b	12,75 c	1,05 d	125,13 d
UENF 111111	16,33 b	11,22 b	16,28 c	14,40 b	12,71 c	1,16 d	138,15 d
UENF 111221a	18,00 a	11,89 b	17,56 c	14,69 a	14,85 c	1,35 c	159,28 c
UENF 111221b	17,33 b	11,94 b	18,11 b	14,82 a	15,02 c	1,32 c	160,65 c
UENF 111222	17,89 a	12,78 a	18,50 b	14,39 b	16,28 c	1,44 c	187,62 b
UENF 112531	17,78 a	12,06 b	17,56 c	13,84 b	14,43 c	1,30 c	156,07 c
UENF 114111	18,56 a	12,72 a	20,67 a	15,37 a	18,26 b	1,61 b	201,64 b
UENF 114112	17,11 b	11,56 b	17,56 c	14,34 b	14,53 c	1,32 c	158,11 c
UENF 114121	16,78 b	11,67 b	16,89 c	14,80 a	14,39 c	1,30 c	155,00 c
UENF 114131	17,78 a	12,00 b	17,78 c	14,72 a	15,00 c	1,34 c	157,81 c
UENF 114132	18,67 a	13,00 a	18,33 b	14,89 a	17,49 b	1,62 b	183,60 b
UENF 114511	17,11 b	11,22 b	17,06 c	14,31 b	15,40 c	1,40 c	157,33 c
UENF 117111	16,78 b	11,56 b	18,56 b	14,32 b	15,53 c	1,49 c	161,86 c
UENF 117221	18,67 a	12,22 a	18,67 b	14,91 a	17,89 b	1,83 a	188,67 b
UENF 117222a	18,33 a	11,78 b	17,33 c	14,45 b	16,12 c	1,53 b	168,84 c
UENF 117222b	18,33 a	12,11 b	17,11 c	14,65 a	16,19 c	1,50 c	182,91 b
UENF 118501a	16,33 b	11,11 b	16,44 c	14,16 b	13,02 c	1,18 d	143,90 d
UENF 118501b	18,00 a	12,67 a	19,22 b	14,75 a	17,19 b	1,56 b	187,87 b
UENF 118502	19,33 a	13,00 a	18,67 b	15,31 a	18,78 b	1,70 b	201,11 b
UENF 118503a	19,11 a	12,67 a	19,00 b	15,70 a	20,78 a	1,93 a	226,10 a
UENF 118503b	19,44 a	12,56 a	20,11 a	15,57 a	21,60 a	1,96 a	223,44 a
QMR	2,31	1,41	2,91	1,25	8,47	0,075	782,53
CV (%)	8,51	9,88	9,50	7,64	18,07	18,60	16,21

<sup>(1)</sup> Características de crescimento da parte aérea: NF = número de folhas; ALT = altura; DR = diâmetro da roseta; DC = diâmetro do caule; MFPA = matéria fresca da parte aérea; MSPA = matéria seca da parte aérea; AF = área foliar. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott a 5 % de probabilidade.

**Quadro 2. Média das características de crescimento do sistema radicular do abacaxizeiro 'Vitória' em resposta à inoculação com bactérias endofíticas e epifíticas**

Tratamentos	Características de crescimento do sistema radicular <sup>(1)</sup>			
	MFR	MSR	R/PA	AR
	-----g-----			-%-
Controle	2,28 b	0,33 c	0,32 b	100,00 b
UENF 111111	3,12 b	0,38 c	0,33 a	102,40 b
UENF 111221a	3,58 a	0,45 b	0,34 a	113,61 a
UENF 111221b	3,56 a	0,43 b	0,32 a	113,16 a
UENF 111222	4,25 a	0,51 a	0,36 a	131,84 a
UENF 112531	3,68 a	0,50 a	0,39 a	133,40 a
UENF 114111	4,04 a	0,53 a	0,34 a	119,91 a
UENF 114112	2,99 b	0,37 c	0,29 b	98,78 b
UENF 114121	3,07 b	0,46 b	0,35 a	117,17 a
UENF 114131	2,77 b	0,44 b	0,34 a	102,63 b
UENF 114132	2,58 b	0,48 a	0,30 b	112,40 a
UENF 114511	3,03 b	0,41 b	0,31 b	113,12 a
UENF 117111	2,95 b	0,42 b	0,29 b	103,15 b
UENF 117221	3,62 a	0,53 a	0,29 b	107,49 b
UENF 117222a	3,27 b	0,45 b	0,30 b	104,03 b
UENF 117222b	3,25 b	0,45 b	0,31 b	106,32 b
UENF 118501a	2,53 b	0,34 c	0,30 b	95,57 b
UENF 118501b	3,08 b	0,43 b	0,28 b	100,78 b
UENF 118502	3,90 a	0,52 a	0,30 b	103,40 b
UENF 118503a	4,01 a	0,54 a	0,29 b	110,67 a
UENF 118503b	4,22 a	0,57 a	0,29 b	96,68 b
QMR	0,53	0,01	0,003	443,52
CV (%)	21,89	22,57	18,59	19,34

<sup>(1)</sup> Características de crescimento do sistema radicular: MFR = matéria fresca da raiz; MSR = matéria seca da raiz; R/PA = razão entre raiz e parte aérea; AR = área radicular. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott a 5 % de probabilidade.

**Quadro 3. Média dos conteúdos de nutrientes da parte aérea do abacaxizeiro 'Vitória' em resposta à inoculação com bactérias endofíticas e epifíticas**

Tratamentos	Conteúdo de nutrientes <sup>(1)</sup>				
	N	P	K	Ca	Mg
	-----mg planta <sup>-1</sup> -----				
Controle	11,66 b	3,46 b	67,28	6,37 b	4,51 c
UENF 111111	13,35 b	3,60 b	72,08 d	6,71 b	4,73 c
UENF 111221a	14,46 b	4,16 b	89,76 d	7,29 b	5,49 c
UENF 111221b	14,09 b	3,99 b	86,11 c	7,12 b	5,25 c
UENF 111222	12,63 b	4,64 b	100,77 c	8,34 b	6,07 b
UENF 112531	13,95 b	4,09 b	94,39 c	7,48 b	5,62 c
UENF 114111	16,08 b	5,75 a	113,75 b	8,39 b	6,56 b
UENF 114112	13,47 b	3,98 b	92,00 c	7,33 b	5,55 c
UENF 114121	13,65 b	4,22 b	95,17 c	7,41 b	5,85 c
UENF 114131	13,92 b	4,29 b	92,14 c	7,34 b	5,76 c
UENF 114132	15,54 b	4,00 b	95,28 c	8,52 b	6,59 b
UENF 114511	14,75 b	4,28 b	85,44 c	6,99 b	5,95 b
UENF 117111	14,17 b	3,88 b	94,32 c	7,55 b	6,26 b
UENF 117221	17,24 b	5,21 a	119,37 b	10,20 a	8,11 a
UENF 117222a	15,47 b	3,93 b	97,49 c	7,79 b	6,40 b
UENF 117222b	13,77 b	4,04 b	89,73 c	9,15 a	6,83 b
UENF 118501a	12,22 b	3,64 b	78,38 d	6,53 b	5,34 c
UENF 118501b	17,02 b	4,88 a	100,35 c	9,07 a	6,87 b
UENF 118502	16,68 b	5,42 a	115,80 b	9,95 a	7,85 a
UENF 118503a	18,85 b	5,73 a	136,14 a	10,28 a	8,42 a
UENF 118503b	40,05 a	5,99 a	139,22 a	11,04 a	8,53 a
QMR	50,58	1,30	351,83	2,78	1,46
CV (%)	44,86	25,67	19,17	20,51	19,13

<sup>(1)</sup> Conteúdo de nutrientes: N, P, K, Ca, Mg = conteúdo de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, respectivamente. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott e Knott a 5 % de probabilidade.

**Quadro 4. Análise de variância para as características de crescimento da parte aérea e do sistema radicular do abacaxizeiro 'Vitória' em resposta à inoculação de bactérias endofíticas e epifíticas**

F.V.	G.L.	Quadrados Médios										
		Parte aérea <sup>(1)</sup>						Sistema radicular <sup>(2)</sup>				
		NF	ALT	DR	DC	MFPA	MSPA	AF	MFR	MSR	R/PA	AR
			-----cm-----		-mm-	-----g-----		-cm <sup>2</sup> -	-----g-----			-%-
Tratamento	20	7,87**	4,14 **	13,47**	2,80**	51,93**	0,536**	6302,77**	2,88**	0,038**	0,007**	963,71**
Bloco	2	69,23**	44,22**	185,36**	32,30**	559,41**	5,01**	66478,04**	69,61**	0,39**	0,02**	6984,7**
Resíduo	166	2,31	1,41	2,91	1,25	8,47	0,075	782,53	0,53	0,01	0,003	443,52
CV (%)		8,51	9,88	9,50	7,64	18,07	18,60	16,21	21,89	22,57	18,59	19,34

<sup>(1)</sup> Parte aérea: NF = número de folhas; ALT = altura; DR = diâmetro da roseta; DC = diâmetro do caule; MFPA = matéria fresca da parte aérea; MSPA = matéria seca da parte aérea; AF = área foliar. <sup>(2)</sup> Sistema radicular: MFR = matéria fresca da raiz; MSR = matéria seca da raiz; R/PA = razão entre raiz e parte aérea; AR = área radicular. \*, significativo a 1 % de probabilidade pelo teste F.

**Quadro 5. Análise de variância para as características de conteúdo de nutrientes foliares do abacaxizeiro 'Vitória' em resposta à inoculação de bactérias endofíticas e epifíticas**

F.V.	G.L.	Quadrados Médios				
		Conteúdo de nutrientes <sup>(1)</sup>				
		N	P	K	Ca	Mg
		-----mg planta <sup>-1</sup> -----				
Tratamento	20	304,85**	5,19**	3031,29**	16,31**	11,68**
Bloco	2	8550,01**	70,41**	2611,28**	118,37**	72,68**
Resíduo	166	50,58	1,30	351,83	2,78	1,46
CV (%)		44,86	25,67	19,17	20,51	19,13

<sup>(1)</sup> Conteúdo de nutrientes: N, P, K, Ca, Mg = conteúdo de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, respectivamente. \*\*, significativo a 1 % de probabilidade pelo teste F.

**Quadro 6. Estimativas dos autovalores ( $\lambda_j$ ) associados às variáveis canônicas (VC) de 16 características do abacaxizeiro 'Vitória' inoculado com bactérias diazotróficas epifíticas e endofíticas durante a aclimatização**

<b>Variáveis Canônicas</b>	<b><math>\lambda_j</math></b>	<b><math>\lambda_j</math> (%)</b>	<b>Acumulado (%)</b>
VC <sub>1</sub>	6,58	38,38	38,38
VC <sub>2</sub>	4,03	23,48	61,87
VC <sub>3</sub>	1,79	10,45	72,32
VC <sub>4</sub>	1,34	7,84	80,15
VC <sub>5</sub>	0,92	5,36	85,51
VC <sub>6</sub>	0,62	3,64	89,16
VC <sub>7</sub>	0,49	2,89	92,05
VC <sub>8</sub>	0,40	2,36	94,42
VC <sub>9</sub>	0,27	1,57	95,99
VC <sub>10</sub>	0,24	1,40	97,39
VC <sub>11</sub>	0,19	1,08	98,48
VC <sub>12</sub>	0,11	0,63	99,10
VC <sub>13</sub>	0,81	0,47	99,58
VC <sub>14</sub>	0,34	0,20	99,78
VC <sub>15</sub>	0,23	0,13	99,91
VC <sub>16</sub>	0,15	0,87	100,00

## APÊNDICE B – CAPÍTULO 3

**Quadro 7. Análise de variância para as características de crescimento da parte aérea e do sistema radicular no abacaxizeiro ‘Vitória’ em resposta à aplicação de diferentes doses de ácidos húmicos isolados de vermicomposto e de torta de filtro**

F.V. <sup>(1)</sup>	G.L.	Quadrados Médios										
		Parte aérea <sup>(2)</sup>							Sistema radicular <sup>(3)</sup>			
		NF	ALT	DR	DC	MFPA	MSPA	AF	MFR	MSR	R/PA	AR
			-----cm-----		-mm-	-----g-----		-cm <sup>2</sup> -	-----g-----			-%-
(-) vs AH	1	16,77*	5,88	94,1**	29,5**	204,5*	1,95*	21533**	14,20*	0,17*	0,0008	7654,4*
AHv vs AHtf	1	8,03	0,84	18,78	7,42	17,51	0,30	2522	3,25	0,05	0,0023	3113,6
QMR	35	3,45	3,07	9,76	3,36	33,20	0,33	2783	2,31	0,03	0,0028	1130,87
CV (%)		9,58	14,01	14,47	11,01	34,85	36,46	29,14	39,90	36,98	17,13	25,27

<sup>(1)</sup> F.V.: (-) = controle; AH = ácido húmico; AHv = ácido húmico de vermicomposto; AHtf = ácido húmico de torta de filtro. <sup>(2)</sup> Parte aérea: NF = número de folhas; ALT = altura; DR = diâmetro da roseta; DC = diâmetro do caule; MF = matéria fresca da parte aérea; MS = matéria seca da parte aérea; AF = área foliar. <sup>(3)</sup> Sistema radicular: MF = matéria fresca da parte aérea; MS = matéria seca da parte aérea; R/PA = razão entre raiz e parte aérea; AR = área radicular. \*, \*\*, significativo a 5 e 1 % de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

**Quadro 8. Análise de variância para as características de acúmulo de nutrientes foliares no abacaxizeiro 'Vitória' em resposta à aplicação de diferentes doses de ácidos húmicos isolados de vermicomposto e de torta de filtro**

F.V. <sup>(1)</sup>	G.L.	Quadrados Médios				
		Conteúdo de nutrientes <sup>(2)</sup>				
		N	P	K	Ca	Mg
		-----mg planta <sup>-1</sup> -----				
(-) vs AH	1	175,4*	30,46*	4861,3*	77,3*	50,68*
AHv vs AHtf	1	38,34	3,49	1305,7	1,89	4,42
QMR	35	34,79	9,73	904,78	12,67	9,71
CV (%)		36,21	48,40	34,09	35,59	39,13

<sup>(1)</sup> F.V.: (-) = controle; AH = ácido húmico; AHv = ácido húmico de vermicomposto; AHtf = ácido húmico de torta de filtro. <sup>(2)</sup> Conteúdo de nutrientes: N, P, K, Ca, Mg = conteúdo de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, respectivamente. \*, significativo a 5 % de probabilidade pelo teste F, respectivamente.

**Quadro 9. Análise de variância para as características anatômicas da lâmina foliar e o teor de pigmentos fotossintéticos do abacaxizeiro ‘Vitória’ em resposta à aplicação de diferentes doses de ácidos húmicos isolados de vermicomposto e de torta de filtro**

F.V. <sup>(1)</sup>	G.L.	Quadrados Médios									
		Características anatômicas <sup>(2)</sup>			Pigmentos fotossintéticos <sup>(3)</sup>						
		N. estoma.	P. aquífero	P. clorofil.	Cl <sub>a</sub>	Cl <sub>b</sub>	Cl <sub>t</sub>	Car	Cl <sub>a</sub> / Cl <sub>b</sub>	Cl <sub>t</sub> / Car	SPAD
		-----µm-----			-----µg mL <sup>-1</sup> -----						
(-) vs AH	1	0,48	9156,19	1486,28	0,5316	0,0016	0,4747	0,0085	0,6156**	0,0636	27,469
AHv vs AHtf	1	2,25	132,25	1178,77	0,5195	0,1551	1,242	0,029	0,3119	0,0943	9,404
QMR	35	1,55	10342,11	4670,65	0,821	0,111	1,50	0,049	0,106	0,233	32,47
CV		10,03	15,37	9,34	24,17	28,80	24,99	18,70	9,87	11,70	14,60

<sup>(1)</sup> F.V.: (-), controle; AH, ácido húmico; AHv, ácido húmico de vermicomposto; AHtf, ácido húmico de torta de filtro. <sup>(2)</sup> Características anatômicas: N. de estoma. = número de estômatos; P. aquífero = parênquima aquífero; P. clorofil. = parênquima clorofiliano. <sup>(3)</sup> Pigmentos fotossintéticos: Cl<sub>a</sub> = clorofila *a*; Cl<sub>b</sub> = clorofila *b*; Cl<sub>t</sub> = clorofila total; Car = carotenóides; Cl<sub>a</sub>/Cl<sub>b</sub> = razão entre clorofila *a* e clorofila *b*; Cl<sub>t</sub>/Car = razão entre clorofila total e carotenóide; SPAD = índice SPAD. \*\*, significativo a 1 % de probabilidade pelo teste F.

## APÊNDICE C – CAPÍTULO 4

### 1. Sequenciamento parcial do gene 16S rDNA

O DNA bacteriano foi extraído usando o QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN) de acordo com as normas do fabricante. O gene 16S rDNA foi amplificado por PCR (reação em cadeia da polimerase) usando iniciadores universais, 16S direto (FD1 5'AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') e 16S reverso (RD1 5'AAG GAG GTG ATC CAG CC 3') (Weisburg et al., 1991). A amplificação foi realizada em um volume de 50 µL, contendo 0.2 µM de cada iniciador, 200 µM de deoxinucleotídeos trifosfato, tampão da enzima Taq fornecido pelo fabricante, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.0 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Brasil), e 20 ng de DNA molde. A PCR foi iniciada com 3 minutos de desnaturação a 94 °C, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento do iniciador a 55 °C por 30 s, extensão a 72°C por 2 min, extensão final por 7 min, em termociclador (TC-412 - TECHNE). Os produtos da PCR foram visualizados em geis de agarose a 1.0 %. As reações para o sequenciamento foram realizadas em um volume total de 10 µL, contendo 30-50 ng DNA, 5 µM de cada iniciador; 1 µL de ABI Prism<sup>®</sup> Big Dye™ (Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits, Applied Biosystems), e 2 µL de 2.5X tampão (Tris-HCL 200 mM pH 9,0; MgCl<sub>2</sub> 5mM). As reações foram realizadas nas mesmas condições de amplificação da PCR. Os produtos foram precipitados com isopropanol 75 % e lavados com etanol 70 %. As seqüências de nucleotídeos foram obtidas com o aparelho ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As seqüências foram analisadas no software Phred/Phrap/Consed (Ewing & Green, 1998; Ewing et al., 1998; Gordon et al., 1998). As seqüências foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos por meio do programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para comparação com seqüências homólogas depositadas no banco de dados público mundial GenBank [National Center for Biotechnology Information website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)].

### Referências Bibliográficas

- EWING, B. & GREEN, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research*, 8: 186-194.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C. & GREEN, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, 8: 175-185.
- GORDON, D.; ABAJIAN, C. & GREEN, P. (1998) Consed: a geographical tool for sequence finishing. *Genome Research*, 8: 195-202.
- WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A. & GENE-TRAK, D. J. L. (1991) 16S ribossomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173: 697-703.

### 1.1. Isolado bacteriano UENF 14111

>Contig1 UENF114111.fasta.screen.ace.1 from 20 to 1527

```

GGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGGACGGC
AGCGCGGGCTTCGGCCTGGCGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACATC
GGAACGTGTCCAGGAGTGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACC
GCATACGATCCATGGATGAAAGCGGGGGACCTTCGGGCCTCGCGCTGCTG
GGGCGGCCGATGGCGGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGC
CGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAG
ACACGGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATG
GGGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGT
TGTAAGCACTTTTGTCCGGGAAGAAAACCTTTTCGTCAATACCGGAAGG
GGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTAAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGC
GTGCGCAGGCGGTGATGTAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTG
GGAAGTGCATTGGTACTGCATCGCTGGAGTATGGCAGAGGGGGGTGGAA
TTCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCGATGGC
GAAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGG
AGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAAC
TGGTTGTCTGGGCTTCACTGGCTTGGTAACGTAGCTAACGCGTGAAGTTG
ACCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGG
GACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAA
ACCTTACCTACCCTTGACATGGACGGAATTCTGCCGAGAGGTGGAAGTGC
CCGAAAGGGAGCCGTCACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGT
CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTGGT
TGCTACGCAAGAGCACTCCAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG
GTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACG
TCATACAATGGCCGGAACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGCGGAGCCAAT
CCCGGAAAACCGGTCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTG
AAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTT
CCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTGCCA
GAAGTGGCTAGTCTAACCAGCAAGGAGGACGGTCACCACGGCAGGATTCAT
GACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGA
TCACCTCC

```

**Quadro 10. Análise da sequência por meio do programa Blast (Basic Local Alignment Search Tool) comparando com as sequências depositadas no NCBI (National Center for Biotechnology Information)**

Código de acesso no NCBI	Descrição	Valor E	Identidade máxima
EF139184.1	<i>Burkholderia</i> sp. TNe-862 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	98%

## 1.2. Isolado bacteriano UENF 17111

>Contig1 UENF117111.fasta.screen.ace.1 from 19 to 1483

```
GCTCAGATTGAACGCTGGCGGCATGCCTTACACATGCAAGTCGGACGGCA
GCGCGGGCTTCGGCCTGGCGGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCG
GAACATGTCCAGTAGTGGGGGATAGCCCGGCGAAAGCCGGATTAATACCG
CATACGATCTGTGGATGAAAGCGGGGGACCTTCGGGCCTCGCGCTATTGG
GGTGGCCGATGGCGGATTAGCTAGATGGTGGGGTAAAGGCCTACCATGGC
GACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGA
CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGG
GGGCAACCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTT
GTAAAGCACTTTTGTCCGGAAAGAAATCCTTTTCGATAATACCGGAAGGG
GATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG
CGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCG
TGCGCAGGCGGTGATGTAAGACCGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCTGG
GAACTGCATTGGTGACTGCATCGCTGGAGTATGGCAGAGGGGGGTAGAAT
TCCACGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCGATGGCG
AAGGCAGCCCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGA
GCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACT
GGTTGTCCGGGCCTTCACTGGCTTGGTAACGTAGCTAACCGGTGAAGTTGA
CCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGGAATTGACGGGG
ACCCGCACAAGCGGTGGATGATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAAAA
CCTTACCTACCCTTGACATGGACGGAAGGCCGGTGAGAGCTGGTTGTGCC
CGAAAGGGAGCCGTCACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTC
GTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTAGTT
GCTACGCAAGAGCACTCCAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG
TGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGT
CATACAATGGTCGGAACAGAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCCAATC
CCGGAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGA
AGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTT
CCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTGCCAG
AAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGGAGGACGGTCACCACGGCAGGATTCATG
ACTGGGGTGAAGTCCG
```

**Quadro 11. Análise da sequência por meio do programa Blast (Basic Local Alignment Search Tool) comparando com as sequências depositadas no NCBI (National Center for Biotechnology Information)**

Código de acesso no NCBI	Descrição	Valor E	Identidade máxima
AY965240.1	<i>Burkholderia silvatlantica</i> isolate SRMrh-20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	99%

**Quadro 12. Análise de variância para as características de crescimento da parte aérea, do sistema radicular e acúmulo de nutrientes no abacaxizeiro ‘Vitória’ em resposta à aplicação de ácido húmico de vermicomposto e bactérias promotoras de crescimento**

F.V. <sup>(1)</sup>	G.L.	Quadrados Médios									
		Características de crescimento					Características nutricionais				
		Parte aérea <sup>(2)</sup>			Sistema radicular <sup>(3)</sup>		Conteúdo de nutrientes <sup>(4)</sup>				
		MFPA	MSPA	AF	MFR	MSR	N	P	K	Ca	Mg
		-----g-----		-cm <sup>2</sup> -	-----g-----		-----mg planta <sup>-1</sup> -----				
(-) vs AH	1	0,59	0,005	20,33	0,13	0,00006	1,03	0,08	0,97	1,66	0,90
(-) vs B	1	42,30*	0,32*	9022,7**	0,43**	0,0046*	43,84*	6,71*	840,95	49,44*	43,47 <sup>o</sup>
(-) vs B+AH	1	86,58**	0,40**	14527,3**	0,73**	0,0053*	57,76*	9,14*	1118,3*	58,71**	82,54*
AH vs B+AH	1	70,82**	0,31*	13299,2**	0,19 <sup>o</sup>	0,00408*	41,29*	7,28*	1043,4*	38,12*	63,85*
B vs B+AH	1	11,77	0,007	978,53	0,059	0,00004	1,44	0,28	29,59	0,59	9,31
QMR	24	5,57	0,05	1057,17	0,05	0,0008	8,59	1,47	202,96	6,40	11,53
CV (%)		36,62	41,19	34,69	30,30	31,29	49,98	52,25	41,37	42,07	82,67

<sup>(1)</sup> F.V.: (-) = controle; AH = ácido húmico; B = bactéria (B1, B2); B+AH = bactéria e ácido húmico (B1+AH, B2+AH). <sup>(2)</sup> Parte aérea: MFPA = matéria fresca da parte aérea; MSPA = matéria seca da parte aérea; AF = área foliar. <sup>(3)</sup> Sistema radicular: MFR = matéria fresca da raiz; MSR = matéria seca da raiz. <sup>(4)</sup> Conteúdo de nutrientes: N, P, K, Ca, Mg = conteúdo de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, respectivamente. <sup>o</sup>, \*, \*\*, significativo a 10, 5 e 1 % de probabilidade pelo teste F, respectivamente.