

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

**EFEITO DA INTERAÇÃO DE MICRORGANISMOS BENÉFICOS  
ASSOCIADOS AO GÊNERO *Ananas* ssp. EM MUDAS  
MICROPROPAGADAS DE ABACAXIZEIROS**

**Amanda Bahiano Passos Sousa**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
2020**

**EFEITO DA INTERAÇÃO DE MICRORGANISMOS BENÉFICOS ASSOCIADOS  
AO GÊNERO *Ananas ssp.* EM MUDAS MICROPROPAGADAS DE  
ABACAXIZEIROS**

**Amanda Bahiano Passos Sousa**  
Engenheira Florestal  
Universidade do Recôncavo da Bahia

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

**Orientadora:** Dr<sup>a</sup>. Fernanda Vidigal Duarte Souza  
**Coorientador:** Dr. Eduardo Chumbinho de Andrade  
**Coorientador:** Dr. Saulo Alves Santos de Oliveira

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
2020**

## FICHA CATALOGRÁFICA

S725e	<p>Sousa, Amanda Bahiano Passos. Efeito da interação de microrganismos benéficos associados ao Gênero Ananas ssp. em mudas micropropagadas de abacaxizeiros / Amanda Bahiano Passos Sousa._ Cruz das Almas, Bahia, 2020. 64f.; il.</p> <p>Orientadora: Fernanda Vidigal Duarte Souza.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais.</p> <p>1.Abacaxi – Cultivo. 2.Abacaxi – Doenças e pragas. 3.Controle biológico – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 634.774</p>
-------	---

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

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA**

**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS PROGRAMA  
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS**

**EFEITO DA INTERAÇÃO DE MICRORGANISMOS BENÉFICOS  
ASSOCIADOS AO GÊNERO *Ananas ssp.* EM MUDAS  
MICROPROPAGADAS DE ABACAXIZEIROS**

**Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação  
Amanda Bahiano Passos Sousa**

Aprovada em 30 de novembro de 2020

Dra. Fernanda Vidigal Duarte Souza  
Embrapa Mandioca e Fruticultura  
(Orientadora)

Dr. Hermínio Souza Rocha  
Embrapa Mandioca e Fruticultura

Dr. Thiago Alves Santos de Oliveira  
Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS

A Deus, que sempre foi minha força e minha coragem.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por estar sempre ao meu lado, me iluminando e abrindo os caminhos para que eu possa seguir em frente.

À minha mãe por todo suporte, carinho e dedicação durante minha caminhada.

À minha família por todo apoio.

Agradeço à minha orientadora Fernanda Vidigal, pelo carinho, pelo respeito, pelos ensinamentos, por ter me acolhido e ter confiado em mim durante todo processo.

Aos meus coorientadores, Eduardo Chumbinho e Saulo Alves, que foram pessoas fundamentais no meu aprendizado como mestranda, me recebendo sempre com toda paciência, compreensão e carinho.

Aos técnicos e analistas de laboratório da Embrapa, em especial, Andresa, Hélder, Vandesson, Raimundo e Leandro, que sempre estavam dispostos e de braços abertos a me ajudar e sanar qualquer dúvida e dificuldade que eu vinha a ter.

Aos estagiários Adailson e Danilo que pegaram no pesado junto comigo para a realização dos trabalhos.

A todos os meus colegas de laboratório que compartilharam comigo toda labuta do dia a dia, em especial àqueles que estenderam a mão quando precisei Anelita, Cíntia, Zanon e Wanderley, nunca me esquecerei de vocês.

Agradeço também aos meus colegas do mestrado e a todos os professores e funcionários que de alguma forma cruzaram meu caminho e contribuíram nessa etapa da minha vida.

Muito obrigada a todos!

## **EFEITO DA INTERAÇÃO DE MICRORGANISMOS BENÉFICOS ASSOCIADOS AO GÊNERO *Ananas* ssp. EM MUDAS MICROPROPAGADAS DE ABACAXIZEIROS**

**RESUMO:** O abacaxi está entre as frutas tropicais mais consumidas no mundo e o Brasil se destaca como um dos maiores produtores. Entretanto, a ocorrência da murcha do abacaxizeiro, doença causada por um complexo viral (PMWaV) pode comprometer a planta e causar impactos na produtividade. A doença gera perda de turgescência dos tecidos foliares e do fruto e pode acarretar a morte da planta. Assim, se tem buscado uma forma de viabilizar mudas de abacaxizeiros, livres de vírus, e que possam vir acompanhadas de agentes promotores de crescimento a fim de reduzir de forma significativa seu tempo de aclimatização e cultivo em campo, permitindo a produção de plantas saudáveis e com vigor. Pensando nisso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento de microrganismos associados ao gênero *Ananas*, na promoção de crescimento, tanto em condição de casa de vegetação como em canteiro, assim como, no auxílio da defesa da planta contra a murcha do abacaxizeiro em campo. Plantas da cultivar BRS Imperial que se encontravam em condições de campo a 15 meses e que receberam tratamento com microrganismos benéficos ainda em fase do cultivo *in vitro*, foram submetidas a indexação viral para detectar o efeito da microbiolização sobre a defesa da planta contra a infecção pelo vírus da murcha. Paralelo a isso, uma escala de notas foi desenvolvida para identificar os sintomas iniciais e mais severos da doença. Posteriormente, plantas da variedade Pérola provenientes de cultura de tecidos foram conduzidas para casa de vegetação, e logo depois do processo de adaptação foram submetidas à inoculação por microrganismos associados ao gênero *Ananas*, sendo avaliadas periodicamente quanto ao desenvolvimento vegetativo. Após 90 dias, essas plantas foram encaminhadas para canteiro e lá também passaram por avaliações periódicas. Observou-se que nas plantas que se encontravam em condição de campo todos os tratamentos apresentaram pelo menos uma planta infectada com o vírus PMWaV e que, de acordo com a escala de notas, algumas plantas infectadas não estavam apresentando sintomas naquele período de avaliação. As plantas da variedade Pérola que estavam em condição de casa de vegetação mostraram que a inoculação com os microrganismos foi eficiente e causou crescimento diferenciado em relação ao controle que não foi microbiolizado e apresentou resultados bem inferiores aos demais tratamentos. O mesmo comportamento foi notado quando essas plantas passaram para o ambiente em condição de canteiro. Pesquisas devem ser aprimoradas para entender mais a fundo o papel desses microrganismos e obter respostas mais consistentes quanto às suas potencialidades para garantir a qualidade da muda do abacaxizeiro, não apenas como potencial promotor de crescimento, mas também para promover indução de resistência à murcha do abacaxizeiro.

**Palavras-chave:** Abacaxi; Murcha do abacaxizeiro; Promotores de crescimento; Resistência

**ABSTRACT:** Pineapple is among the most consumed tropical fruits in the world and Brazil stands out as one of the largest producers. However, the occurrence of pineapple wilt, a disease caused by a viral complex (PMWaV) can compromise the plant and impact productivity. The disease causes loss of turgidity in the leaf tissues and fruit and can cause the death of the plant. Thus, a way has been sought to make pineapple seedlings viable, free of viruses, and that may be accompanied by growth-promoting agents in order to significantly reduce their acclimatization and cultivation time in the field, allowing the production of healthy and plants with vigor. With this in mind, the objective of this work was to evaluate the behavior of microorganisms associated with the genus *Ananas*, in promoting growth, both in greenhouse conditions and in beds, as well as in helping to defend the plant against the wilt of pineapples in the field. Plants of the BRS Imperial cultivar that had been in field conditions for 15 months and that would have received treatment with beneficial microorganisms still in the stage of in vitro cultivation, were subjected to viral indexing to detect which of the treatments were free or infected with the wilt virus. Parallel to this, a scale of grades was developed to identify the initial and most severe symptoms of the disease. Subsequently, plants of Pérola variety from tissue culture were taken to a greenhouse, and soon after the adaptation process they were subjected to inoculation by microorganisms associated with the genus *Ananas*, being periodically evaluated for plant growth. After 90 days, these plants were sent to the flower bed site and also underwent periodic evaluations there. What could be noticed was that in the plants that were in field condition, all treatments presented at least one plant infected with the PMWaV virus and that, according to the scale of notes, some infected plants were not showing symptoms in that period evaluation. Plants of vc Pérola that were in a greenhouse condition showed that inoculation with microorganisms was efficient and caused different growth between treatments and in relation to the control that did not receive any type of microbiolozation and that presented results well below the other treatments, the same behavior was noticed when these plants passed into the flower bed. Research must be improved to better understand the role of these microorganisms and obtain more consistent answers as to their potential to guarantee the quality of the cultivated pineapple seedling, not only as a potential growth promoter, but also to promote the induction of wilt resistance of the pineapple.

**Keywords:** Pineapple; Pineapple wilt; Growth promoters; Resistance



## SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA .....	9
1.1 A murcha do abacaxizeiro associada à cochonilha.....	10
1.2 Micropropagação do Abacaxizeiro .....	11
1.3 Microrganismos Benéficos, promoção de crescimento e tolerância às doenças .....	13
REFERÊNCIAS .....	16
CAPÍTULO 1: DETECÇÃO DO COMPLEXO VIRAL DA MURCHA DO ABACAXIZEIRO EM PLANTAS MICROPROPAGADAS DE 'BRS IMPERIAL' TRATADAS COM MICRORGANISMOS ASSOCIADOS AO GÊNERO <i>Ananas</i> ssp.21	
1.0 INTRODUÇÃO .....	23
2.0 MATERIAIS E MÉTODOS.....	255
2.1 Material vegetal.....	255
2.2 Extração do RNA total.....	27
2.3 Detecção das espécies do PMWaV por RT-PCR.....	29
2.4 Análise da severidade dos sintomas .....	29
3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
4.0 CONCLUSÕES .....	38
REFERÊNCIAS.....	39
CAPÍTULO 2: POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS AO GÊNERO <i>Ananas</i> ssp. NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE MUDAS MICROPROPAGADAS DA VARIEDADE PÉROLA .....	
1.0 INTRODUÇÃO .....	45
2.0 MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
2.1 Material vegetal.....	46
2.2 Isolados bacterianos e Microbiolização.....	46
2.3 Fase casa de vegetação .....	48
2.4 Fase de Canteiro.....	49
3.0 RESULTADO E DISCUSSÃO .....	49
3.1 Fase Casa de Vegetação.....	49
3.2 Fase de Canteiro.....	52
4.0 CONCLUSÕES .....	60
REFERÊNCIAS.....	61

## 1.0 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O abacaxi (*Ananas comosus* (L) Merrill) é um fruto originário das Américas e se tornou símbolo de regiões tropicais e subtropicais, sendo difundido para todo o mundo, em razão de sua aparência, aroma e sabor característico (CRESTANI et al. 2010). Esta fruteira pertence à família Bromeliaceae, a qual engloba a 3.646 espécies distribuídas em 78 gêneros e é uma das maiores famílias de plantas originárias do “Novo Mundo” (GOUDA et al. 2020).

O Brasil é um dos centros de origem e diversidade do gênero, que abriga duas espécies, *Ananas comosus* composta por diploides auto-incompatíveis, propagados vegetativamente a partir de rebentos axilares e da coroa do fruto, e *A. macrodontes*, um tetraploide autofértil e sem coroa que se reproduz por meio de sementes e estolões. A espécie *A. comosus* é composta de cinco variedades botânicas: *A. comosus* var. *microstachys*, *A. comosus* var. *parguazensis*; *A. comosus* var. *comosus*; *A. comosus* var. *erectifolius*; e *A. comosus* var *bracteatus* (COPPENS D’EECKEMBRUGGE et al. 2018).

A produção de abacaxi está voltada para o atendimento do consumo da fruta *in natura*, produção de frutas secas ou processadas e sucos (ROHRBACH & JONHSON, 2003). Entretanto, estudos mais recentes têm demonstrado sua potencialidade para vários usos (SOUZA et al., 2018a), como ornamental (SOUZA et al., 2012; SOUZA et al., 2014), fonte de fibra para indústrias variadas (SENA NETO et al., 2015) como uma fonte de moléculas bioativas com propriedades medicinais e atividade anticâncer (GUEDES et al., 2018), e atividade anti-helmíntica (RODRIGUES et al., 2020). Assim como toda planta cultivada, o abacaxizeiro tem sua produção significativamente afetada pela ocorrência de estresses abióticos e bióticos, como é o caso de déficit hídrico e ocorrência de pragas e doenças.

Dentre as principais enfermidades que acometem o abacaxi estão a fusariose e a murcha associada à cochonilha (VENTURA et al., 2009). O programa de melhoramento genético de abacaxi da Embrapa Mandioca e Fruticultura já lançou três cultivares resistentes à fusariose, o BRS Ajubá (CABRAL & MATOS, 2008), BRS Vitória (VENTURA et al., 2009) e BRS Imperial (CABRAL & MATOS, 2009), como uma alternativa ao cultivo da variedade Pérola. Entretanto, esses mesmos materiais, que são resistentes à fusariose são altamente susceptíveis à murcha do

abacaxizeiro, devido a um de seus parentais ser a cultivar Smooth Cayenne, reconhecidamente suscetível à murcha. Essa cultivar apresenta frutos com características apropriadas para o consumo *in natura* e para o processamento industrial, graças às suas propriedades sensoriais e físico-químicas. No entanto, ocorrem perdas de rendimento variáveis na produção desta cultivar, já que à presença da cochonilha da murcha do abacaxizeiro em todas as regiões de cultivo (MATOS & REINHARD, 2009).

### 1.1 A murcha do abacaxizeiro associada à cochonilha

Essa doença é causada pelo *Pineapple mealybug wilt-associated vírus* (PMWaV), em associação com a cochonilha (*Dysmicoccus brevipes*) que é considerada um fator limitante para a produção de abacaxi, pois sua atuação reduz o desenvolvimento da planta, além de restringir a expansão da produção (SANTA-CECÍLIA et al. 2004; GUERRA et al. 2020).

Em relação ao complexo viral, já foram caracterizadas três espécies, denominadas *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3), que se diferenciam pela sequência e organização do genoma (MELZER et al., 2001; 2008; SETHER et al., 2009). A literatura cita a existência de mais duas espécies, o PMWaV-4 e PMWaV-5 (SETHET et al., 2005; GAMBLEY et al., 2008). Estudos atuais descrevem a caracterização genômica adicional dos vários vírus associados à murcha da cochonilha do abacaxi (PMWaV) usando sequenciamento de alto rendimento (HTS). O genoma PMWaV-1 completo foi descrito anteriormente, mas os genomas de PMWaV-2, PMWaV-3 e espécies PMWaV-4 e PMWaV-5 ainda demandam uma caracterização completa. Os autores, com base nos resultados obtidos, sugerem que PMWaV-4 seja designado PMWaV-1 cepa 4 (MN539275), além de terem obtido um novo isolado de PMWaV-1 (MN539276) e terem complementado as sequências disponíveis dos genomas de PMWaV-2 (MN539272 e MN539273) e PMWaV-3 (MN53 9274) em suas regiões 5' terminais (GREEN et al., 2020).

A doença caracteriza-se por apresentar sintomas que iniciam no ressecamento das raízes seguido de descoloração gradual das folhas e dobramento dos bordos, as folhas curvam-se em direção ao solo e as pontas secam perdendo completamente a turgescência (VENTURA & COSTA, 2002).

De acordo com Cunha, et al. (1994), 42 dias após a infestação da cochonilha, o desenvolvimento radicular já é afetado, porém a sintomatologia foliar se evidencia de dois a três meses após a infecção, pois ocorre um período de incubação que pode ser muito variável a depender da idade da planta e do período alimentar das cochonilhas.

Além da *D. brevipes*, outra espécie de cochonilha, a *Dysmicoccus neobrevipes* é relatada como vetor da murcha em todas as regiões que produzem abacaxi (JAHN et al., 2003). A diferença relatada por Gonzáles-Hernández et al. (1999) é que a *D. brevipes* infesta raízes, folhas, frutos, flores e coroa, enquanto a *D. neobrevipes* infesta apenas folhas, frutos e coroas. De fácil reconhecimento, a cochonilha tem forma oval alongada e é recoberta por uma secreção serosa branca, sem a qual aparece sua coloração rosada. A fêmea pode chegar até 3mm de comprimento (BEARDSLEY, 1993).

Um componente importante para o complexo da murcha do abacaxizeiro são as formigas doceiras (*Pheidole* e *Solenopsis*), que se alimentam da secreção açucarada produzida pelas cochonilhas. Essas formigas que vivem em simbiose por protocooperação com as cochonilhas, protegem as colônias com uma cobertura de restos orgânicos, das intempéries e dos inimigos naturais. Além disso, atuam como agentes de dispersão na cultura transportando as cochonilhas jovens dos hospedeiros nativos e restos de cultura para novos plantios (SANCHES & MATOS, 1999).

O sistema de propagação vegetativo do abacaxizeiro dissemina a doença por meio do plantio de mudas infectadas. Não existem ainda fontes de resistência identificadas para o complexo viral PMWaV, demandando novas abordagens na busca por soluções. Dentre essas novas abordagens o uso de microrganismos associados tem despontado como um estudo promissor e com um grande potencial de aplicação prática, tanto no que tange à produção de mudas como na busca por tolerância ou resistência.

## **1.2 Micropropagação do Abacaxizeiro**

Conforme já explicitado nos tópicos anteriores, a forma de propagação vegetativa do abacaxizeiro, seja pelo método convencional de produção de mudas a partir de brotações laterais da planta (mudas tipos filhote e rebentão), ou mesmo

pelo plantio da coroa, implica em materiais vegetais com potencial de disseminação de pragas e doenças, comprometendo os novos plantios, assim como a taxa de propagação obtida é muito baixa, considerando que a demanda de mudas para um hectare de abacaxi pode variar de 25.000 a 40.000 (REINHARDT & SOUZA, 2000).

Para aumentar e acelerar essa taxa de multiplicação, algumas estratégias foram desenvolvidas, como a produção de mudas por seccionamento de talo (REINHARDT & CUNHA, 2006) ou por técnicas de micropropagação (SOUZA et al., 2013; REINHARDT et al., 2018). A micropropagação é uma das técnicas de cultura de tecidos vegetais que permite a obtenção de mudas em larga escala e vem sendo realizada com êxito para a cultura do abacaxizeiro (BARBOZA, 1999; GUERRA et al., 1999; ALBUQUERQUE et al., 2000; TEIXEIRA et al., 2001; VESCO et al., 2001; FIROOZABADY & GUTTERSON, 2003; SOUZA et al., 2003; SOUZA et al., 2013).

Esta técnica tem o potencial de produzir um elevado número de plantas saudáveis e uniformes, desde que o material de partida seja sadio ou quando seja associada ao procedimento de cultivo de ápices caulinares em tamanhos bem reduzidos e que permite a eliminação de vírus. (SILVA et al., 2016; GUERRA et al., 2020).

Assim, o uso dessa técnica deveria amenizar, não apenas o problema da baixa taxa de multiplicação do abacaxizeiro por propagação convencional, mas também a disseminação de mudas infectadas (SOUZA et al., 2009). Entretanto, a adoção desse tipo de muda tem sido muito lenta por parte dos produtores, devido principalmente ao custo elevado da planta que é resultado do longo tempo de aclimatização, que é o período de adaptação que a planta precisa após sua saída do laboratório.

Estudos têm sido conduzidos com vistas a entender os eventos fisiológicos que ocorrem durante essa fase, assim como reduzir esse tempo a fim de otimizar o sistema como um todo (VILLALOBO et al., 2012.; SCHERER et al., 2015 ). Uma das estratégias que podem ser usadas para reduzir esse tempo de aclimatização de mudas micropropagadas é a microbiolização, ou seja, a inoculação de microorganismos benéficos que sejam promotores de crescimento e possam acelerar o desenvolvimento desse tipo de material (SOUZA, 2017).

### **1.3 Microrganismos Benéficos, promoção de crescimento e tolerância às doenças**

Existe um interesse permanente em conhecer os benefícios dos microrganismos nas diferentes culturas, devido à importância global e local no equilíbrio dinâmico dos ecossistemas para utilização em estratégias no manejo integrado de doenças e pragas, além da redução de produtos químicos na agricultura, contribuindo assim para a saúde e produtividade das safras. (GARCIA et al., 2015; LAALI et al., 2017; ALVAREZ et al., 2018).

Ao longo dos anos, pesquisas demonstraram que as bactérias e os fungos têm uma íntima interação com suas plantas hospedeiras e são capazes de promover o crescimento da planta assim como a resistência contra patógenos e parasitas, além de aprimorar resistência a condições de estresse biótico e abiótico, tornando as plantas mais tolerantes a altas temperaturas, secas prolongadas, salinidade, acidez do solo e outras condições de seu habitat de crescimento. (WHIPPS, 2001; CARDOSO & ESTRADA-BONILLA, 2019).

O sistema de cultivo intensivo, é um dos principais fatores que causam desequilíbrios de nutrientes, e manutenção de patógenos em ambiente de cultivo, diminuindo a fertilidade do solo, e a produtividade, além de alterar a qualidade dos alimentos (SINGH et al., 2017). Dessa forma, os microrganismos de importância agrícola podem representar uma estratégia ecológica chave para reduzir o uso de produtos químicos na agricultura, bem como para melhorar a produtividade das culturas (BHATTACHARYYA et al., 2016).

O uso de microrganismos promotores de crescimento pode ser útil no desenvolvimento de estratégias para facilitar o crescimento de plantas em condições normais, bem como em diversas condições de estresse abiótico. A aplicação de microrganismos com o objetivo de melhorar a disponibilidade de nutrientes para as plantas é uma prática importante e necessária para uma agricultura sustentável (MAJEED et al.; CHAUHAN et al., 2015; GODOY, 2020). Aumentos significativos no crescimento e rendimento de safras agronomicamente importantes em resposta à inoculação com microrganismos promotores de crescimento de plantas têm sido relatados repetidamente (YADAV et al., 2017).

Organismos que estão presentes na rizosfera podem ter efeitos profundos no crescimento, nutrição e saúde das plantas em agroecossistemas. Estes organismos

também podem afetar direta ou indiretamente a composição e biomassa da planta em ecossistemas naturais. Numerosos organismos contribuem para esses processos, levando à inúmeras interações entre plantas, antagonistas e mutualísticas simbiotes, tanto abaixo do solo quanto acima do solo (PHILIPPOT et al., 2013).

Os microrganismos que compõem o microbioma associado das plantas conferem vantagens produtivas às plantas uma vez que podem estar associados à promoção de crescimento vegetal e controle biológico. Estes microrganismos podem promover crescimento em plantas pela produção de fito-hormônios, solubilização de fosfato, produção de sideróforos, inibição da biossíntese do etileno e indução da resistência a fitopatógenos (BALDOTTO et al., 2010).

No caso do abacaxizeiro, os estudos da diversidade microbiana associada à planta são ainda escassos, apesar de se acreditar que *Ananas spp.* mantém relações com uma grande variedade de microrganismos fitopatogênicos ou benéficos. Souza et al., (2019) quantificaram e compararam a diversidade de microrganismos cultiváveis considerados benéficos tanto em solo rizosférico, quanto em tecidos internos de *Ananas spp.* oriundos de três ambientes diferentes: populações naturais, áreas de cultivo comercial e um banco de germoplasma conservado *ex situ* por quase 40 anos. Os resultados permitiram o agrupamento de isolados de diferentes ambientes e frações, como os de solo, raiz e caule, no mesmo grupo, deixando evidente que existe correspondência na distribuição da microbiota benéfica (grupos funcionais) do solo para as partes aéreas de plantas. Além disso, as análises de correlação indicaram que as plantas estão sempre exigindo os mesmos grupos de microrganismos para sustentar o crescimento adequado das plantas.

Com base nos resultados desse trabalho plantas micropropagadas de abacaxi da cultivar BRS Imperial foram inoculadas, ainda na etapa *in vitro*, com diferentes grupos desses microrganismos a fim de se avaliar seu efeito no crescimento dessas plantas em fase de aclimatização (SOUZA et al., 2018b). Essas mesmas plantas foram levadas a campo para avaliações posteriores, principalmente no que se refere à tolerância ao vírus da murcha do abacaxizeiro e que constitui o primeiro capítulo desse trabalho.

Por outro lado, plantas micropropagadas da variedade Pérola foram inoculadas em casa de vegetação por grupos de microrganismos igualmente

advindos desse trabalho a fim de se avaliar o potencial de promoção de crescimento dos mesmos e cujos resultados estão no segundo capítulo desta dissertação.

Todo esse potencial de ação precisa ser mais bem compreendido na cultura do abacaxizeiro a fim de promover a busca por soluções mais sustentáveis e que possam promover uma melhoria no sistema de cultivo. Em vista disso esse trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento de microrganismos associados ao gênero *Ananas*, na promoção de crescimento, tanto em condição de casa de vegetação como em canteiro, assim como, no auxílio da defesa da planta contra a murcha do abacaxizeiro em campo.



## REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, C.V., CÂMARA, T.R., MENEZES, M., WILLADINO, L., MEUNIER, I., ULISSES, C. Cultivo in vitro de ápices caulinares de abacaxizeiro para limpeza clonal em relação à fusariose. **Scientia Agrícola**, v. 57, p. 363-366, 2000.

ALVAREZ, M., TUCTA, F., QUISPE, E., MEZA, V. Incidence of the inoculation of beneficial microorganisms in the strawberry (*Fragaria* sp.) crop. **Scientia Agropecuária**, v. 9, p. 33-42, 2018.

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

BARBOZA, S.B.S.C. Comparação de protocolos para micropropagação do abacaxizeiro [*Ananas comosus* (L.) Merrill]. 1999. 76f. **Dissertação** (Mestrado) - Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, 1999.

BEARDSLEY, J.W. The pineapple mealybugs complex; taxonomy, distribution and relationships. **Acta-hortic.**, v. 334, p. 383-386, 1993.

BHATTACHARYYA, P.N; GOSWAMI, M.P; BHATTACHARYYA, L.H. Perspective of beneficial microbes in agriculture under changing climatic scenario: A review. **Journal of Phytology** v.8, p.26-41, 2016.

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

CABRAL, J.R.S., MATOS, A.P. de. **BRS Ajubá, nova cultivar de abacaxi**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2008. 4 p.

CARDOSO, E. J. B. N., ESTRADA-BONILLA, G. A., Inoculantes agrícolas. In: ALTERTHUM, F., SCHMIDELL, W., LIMA, U. A., MORAES, I. **Coleção Biotecnologia Industrial**, v. 3, p. 305 -332, 2019.

CHAUHAN, H.BAGYARAJ, D. J. SELVAKUMAR, G., SUNDARAM, S. P. Novel plant growth promoting rhizobacteria – Prospects and potential. **Applied Soil Ecology**, v.95, p. 38-53, 2015.

COPPENS D'EECKENBRUGGE, G., DUVAL, M.F., LEAL, F. The Pineapple Success Story: From Domestication to Pantropical Diffusion. **Genetics and Genomics of Pineapple**, v. 22, p. 1-25, 2018.

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

CUNHA, G.A.P.; MATOS, A.P.; CABRAL, J.R.S.; SOUZA, L.F.S.; SANCHES, N.F.; REINHARDT, D.H.R.C. Abacaxi para exportação: aspectos técnicos da produção. Brasília: **Embrapa**, 41p, 1994.

FIROOZABADY, E.; GUTTERSON, N. Cost effective in vitro propagation methods for pineapple. **Plant Cell Reports**, v. 21, p. 844–850, 2003.

GAMBLEY, C.F.; STEELE, V.; GEERING, A.D.W.; HOMAS, J.E. The genetic diversity of ampeloviruses in Australian pineapples and their association with mealybug wilt disease. **Australian Plant Pathology**, v. 37, p. 95-105, 2008.

GARCIA, T.V., KNAAK, N., FIUZA, L. M. Bactérias endofíticas como agentes de controle biológico na orizicultura. **agricultural microbiology / article review**. São Paulo, v.82, 1-9, 2015.

GODOY, F. de A. Identificação de bactérias promotoras de crescimento de trigo e seu impacto na comunidade bacteriana da rizosfera. **Dissertação**. USP, 2020.

GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, H., JOHNSON, M. W., REIMER, N. J. *Impact of Pheidole megacephala (F.) (Hymenoptera: Formicidae) on the Biological Control of Dysmicoccus brevipes (Cockerell) (Homoptera: Pseudococcidae)*. **Biological Control**, v.15(2), p. 145–152, 1999.

GOUDA, E.J. Tillandsia BROMELIACEAE. In: Egli U Nyffeler R. (eds) Moncotyledons. Illustrated Handbook of Succulent Plants. **Springer**, Berlin, Heidelberg, 2020.

GREEN, J.C, RWAHNIH, M. A., OLMEDO-VELARDE, A., MELZER, M. J., HAMIM, I., BORTH, W. B., BROWER, T. M., WALL, M., HU, J. S. Further genomic characterization of pineapple mealybug wilt-associated viruses using high-throughput sequencing. **Trop. plant pathol**, v. 45, p. 64–72, 2020.

GUEDES, J.A.C., ALVES FILHO, E. de G., RODRIGUES, T.H.S., SILVA, M.F.S., SOUZA, F.V.D., e SILVA, L.M.A., ALVES, R.E., CANUTO, K.M., de BRITO, E.S., PESSOA, C. do Ó, NASCIMENTO, R. F., ZOCOLO, G. J. Metabolic profile and cytotoxicity of non-polar extracts of pineapple leaves and chemometric analysis of different pineapple cultivars. **Industrial Crops and Products**, v. 124, p. 466-474, 2018.

GUERRA, M.P., VESCO, L.L.D, PESCADOR, R., SCHUELTER, A. R., NODARI, R. O. Estabelecimento de um protocolo regenerativo para micropropagação do abacaxizeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, p. 1557-1563, 1999.

GUERRA, P.A., SOUZA, E.H., ANDRADE, E.C., MAX, D.A.S., OLIVEIRA, R.S., SOUZA, F.V.D. Comparison of shoot tip culture and cryotherapy for eradication of ampeloviruses associated with Pineapple mealybug wilt in wild varieties. **In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant**, 2020.

JAHN, C.G.; BEARDSLEY, J. W.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, H. A Review of the Association of Ants with Mealybug Wilt Disease of Pineapple. **Proc. Haw. Entomol. Soc.**, v.36, p.9-28, 2003.

LAILI, N.; RADZIAH, O.; ZAHARAH, S. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and their effects on growth of strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.). **Bangladesh Journal of Botany**, v. 46(1), p. 277-282, 2017.

MAJEED, A., ABBASI, M. K., HAMEED, S., IMRAN, A., RAHIN, N. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion. *Frontiers in microbiology*, 6:198, 2015.

MATOS, A. P. de., REINHARDT, D.H.R.C. Pineapple in Brazil: characteristics, research and perspectives. **Acta Horticulturae**, v. 822, p. 25-36, 2009.

MELZER, M. J.; SETHER, D. M.; KARASEV, A. V.; BORTH, W.; HU, J. S. Complete nucleotide sequence and genome organization of pineapple mealybug wilt-associated virus-1. **Archives of Virology**, v. 153, n. 4, p. 707-714, 2008.

MELZER, M.J.; KARASEV, A.V; SETHER, D.M.; HU, J.S. Nucleotide sequence, genome organization and phylogenetic analysis of pineapple mealybug wilt associated virus-2. **Journal of General Virology**, V. 82, p. 1–7, 2001.

NIREMBERG, H.. I.; O'DONNELL, K. New *fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, v.90, p.434-458, 1998.

PHILIPPOT, L., RAAIJMAKERS, Jos M., LEMANCEAU, P., van der PUTTEN, W. H. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, p. 789–799, 2013.

REINHARDT, D.H.R.C., BARTHOLOMEW, D.P., SOUZA, F.V.D., de CARVALHO, A. C.P.P., de Pádua, T.R.P., Junghans, D.T., de Matos, A.P. Advances in pineapple plant propagation. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 40, n. 6: (e-302), 2018.

REINHARDT, D.H.; CUNHA, G.A.P. A propagação do abacaxizeiro. Brasília: **Embrapa Informação Tecnológica (Coleção Plantar 52)**, p. 59, 2006.

REINHARDT, D.H., SOUZA, J. da S. Pineapple industry and research in Brazil. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 529, p. 57-71, 2000.

RODRIGUES, C.I., COSTA, D.M. da, SANTOS, A.C.V., b , BATATINHA, M.J.M., SOUZA, F. V.D. SOUZA, E. H. de, BOTURA, M.B, ALVES C. Q., SOARES, T.L. BRANDÃO, H.N. Assessment of in vitro anthelmintic activity and bio-guided chemical analysis of BRS Boyra ´ pineapple leaf extracts. **Veterinary Parasitology**, v.285, p. 109-219, 2020.

ROHRBACH, K.G.; JONHSON, M.W. Pests, diseases and weeds. In: BARTHOLOMEW, D. P.; PAUL, R. E.; ROHRBACH, K. G. (Ed.). The pineapple: botany, production and uses. **Oxon: CAB International**, p. 203- 251, 2003.

SANCHES, N.F.; MATOS, A.P. Murcha associada à cochonilha *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell,1893). In: O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia: Brasília: **EMBRAPA-CNPMP**, p. 343-366, 1999.

SANTA-CECÍLIA, L. V. C.; BUENO, V. H. P.; PRADO, E. Desenvolvimento de *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) (Hemiptera: Pseudococcidae) em duas cultivares de abacaxi. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 5, p. 1015-1020, 2004.

SCHERER, R. F., HOLDERBAUM, D. F., GARCIA, A.C., SILVA, D. A. da, STEINMACHER, D. A., GUERRA, M. P. Effects of immersion system and gibberellic acid on the growth and acclimatization of micropropagated pineapple. **Crop Breed. Appl. Biotechnol**, v. 15, p. 66-71, 2015.

SENA NETO, A.R., ARAUJO, M.A.M., BARBOZA, R.M.P., FONSECA, A.S., TONOLI, G.H., SOUZA, F.V.D., MATTOSO, L.H.C., MARCONCINI, J.M. Comparative study of 12 pineapple leaf fiber varieties for use as mechanical reinforcement in polymer composites. **Ind. Crop Prod.**, v. 64, pp. 68-78, 2015.

SETHER, D. M.; MELZER, M.J.; BUSTO, J. Diversity and Mealybug Transmissibility of Ampeloviruses in Pineapple. **Plant Disease**, v.89, n.6, p.450-456, 2005.

SETHER, D.M.; MELZER, M.J.; BORTH, W.B.B.; HU, J.S. Genome organization and phylogenetic relationship of Pineapple mealybug wilt associated virus-3 with family Closteroviridae members. **Virus Genes**, v. 38, p. 414, 2009.

SILVA, R. L.; FERREIRA, C. F.; LÊDO, C. A. S.; SOUZA, E. H.; COSTA, M. A. P. C.; SOUZA, F. V. D. Viability and genetic stability of pineapple germplasm after 10 years of in vitro conservation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 127, n. 1, p. 123-133, 2016.

SINGH, D.; Geat, N.; RAJAWAT, M.V.S.; PRASANNA, R.; SAXENA, A.K.; RAJEEV, K. Isolation and Characterization of Plant Growth Promoting Endophytic Diazotrophic Bacteria from Wheat Genotypes and their Influence on Plant Growth Promotion. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences** 1533-1540, 2017.

SOUZA, C.P.F. et al., Promoção de crescimento em plantas aclimatizadas de abacaxi inoculadas com microrganismos associados ao gênero *Ananas*. In: Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, v. 2018, P.345, Fortaleza. **Anais**, Brasília: SBRG, 2018b.

SOUZA, C. R. S. Comparação da microbiota funcional cultivável associada à *Ananas* spp. em diferentes ambientes. **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2017.

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

SOUZA, E.H. de. et al. Genetic variation of the *Ananas* genus with ornamental potential. **Genet. Resour. Crop. Evol.**, v. 59, p. 1357–1376, 2012.

SOUZA, E.H.; COSTA.M. A. P. C.; SANTOS-SEREJO, J. A.; SOUZA, F. V. D. Seletion and use recommendation in hybrids os ornamental pineapple. **Revista Ciências Agronômicas**, v. 45, n. 2, p. 409-416, 2014.

SOUZA, F.V.D. et al. Micropropagação do abacaxizeiro e outras bromeliáceas. In: JUNGHAS, T.G.; SOUZA, A.S. (Org.). **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, v. 1, p. 177-205, 2009.

SOUZA, F.V.D. et al. Produção de mudas de abacaxi por micropropagação. Cruz das Almas, BA: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2003. 8 p. (Circular técnica, 61).

SOUZA, F.V.D.; SOUZA, A.S.; SANTOS-SEREJO, J.A.; SOUZA, E. H.; JUNGHANS, T.G.; SILVA, M.J. Micropropagação do abacaxizeiro e outras bromeliáceas. In: JUNGHANS, T. G.; SOUZA, A. S. **Aspectos práticos da micropropagação de plantas**. 2ed., Brasília, v. 1, p. 345-372, 2013.

SOUZA, F.V.D.; SOUZA, E.H.; SENA NETO, A.R.; MARCONCINI, J. M.; ASSIS, S.A. Production for Other Uses. In: SANEWSKI, G. M.; BARTHOLOMEW, D. P.;

PAULL, R. E. (Org.). **The Pineapple: Botany, Production and Uses**. 2ed. Herndon: CAB International, v. 1, p. 222-232, 2018a.

TEIXEIRA, J.B., CRUZ, A.R.R., FERREIRA, F.R., CABRAL, J.R.S. **Produção de mudas de abacaxide alta qualidade através da micropropagação**. Documentos 70. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001, 26p.

VENTURA, J.A.; CABRAL, J.R.S.; MATOS, A.P.; COSTA, H. 'Vitória': new pineapple cultivar resistant to fusariose. **Acta Horticulturae**, v. 822, p. 51-54, 2009.

VENTURA, J.A.; COSTA, H., Manejo integrado das doenças de fruteiras tropicais: Abacaxi, banana e mamão. In: L. Zambolim (ed.) **Manejo integrado; fruteiras tropicais - doenças e pragas**, v. 672, p. 279-352, 2002.

VESCO, L.L.D, PESCADOR, R., BELÓ, A., FEUSER, S., OLIVEIRA, E. N., BRANCHER, A., ZAFFARI, G.R., NODARI, R.O., GUERRA, M.P. Qualidade genotípica de mudas e performance a campo de plantas micropropagadas de abacaxizeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 22, p. 80-85, 2001.

VILLALOBO, A., GONZÁLEZ, J., SANTOS, R., RODRÍGUEZ, R. Morpho-physiological changes in pineapple plantlets [*Ananas comosus* (L.) merr.] during acclimatization. **Ciênc. agrotec.**, v. 36, n. 6, p. 624-630, 2012.

WHIPPS, J. M., Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, p. 487–511, 2001.

YADAV, A. N., VERMA, P., SINGH, B., CHAUHAN, V. S, SUMAN, A SAXENA, A. K. Plant Growth Promoting Bacteria: Biodiversity and Multifunctional Attributes for Sustainable Agriculture. **Advances in Biotechnology & Microbiology**, v. 5 I. 5, 2017.

## CAPÍTULO 1

**DETECÇÃO DO COMPLEXO VIRAL DA MURCHA DO ABACAXIZEIRO EM  
PLANTAS MICROPROPAGADAS DE 'BRS IMPERIAL' TRATADAS COM  
MICROORGANISMOS ASSOCIADOS AO GÊNERO *Ananas* ssp.**

**RESUMO:** O PMWaV é o agente responsável por causar a murcha do abacaxizeiro, uma doença transmitida pelas cochonilhas *Dysmicoccus brevipes* e *D. neobrevipes* que são os vetores das três espécies virais, PMWaV 1, 2 e 3. A murcha do abacaxizeiro causa perda de produção e por isso, busca-se uma forma de viabilizar o uso de mudas micropropagadas de abacaxi, livre de vírus, acompanhadas de agentes promotores de crescimento. O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de PMWaVs (1, 2 e 3) em plantas de BRS Imperial em condições de campo, infectadas naturalmente com o vírus. Essas plantas foram obtidas por meio de micropropagação de matrizes livres de vírus, e foram inocuadas com microrganismos benéficos ainda na condição *in vitro*. Foram 18 tratamentos, cada um com um mix de isolados de bactérias ou fungos provenientes do solo e endofíticos de raízes, caules e folhas de ambiente natural ou cultivado, além do controle. As mudas microbiolizadas foram plantadas em campo e avaliou-se o efeito destes microrganismos na resposta do abacaxizeiro à murcha. As avaliações foram feitas por meio da indexação das plantas e por uma escala de notas visual dos sintomas em condições de campo que foi desenvolvida neste estudo. Os resultados mostraram que todos os tratamentos estavam com pelo menos uma planta infectada. O controle e os tratamentos BEFPAC (Bactérias endofíticas de Folhas de Plantas de Ambiente Cultivado), PSAN (*Pseudomonas* de Solo de Ambiente Natural), BASAN (*Bacillus* de Solo de Ambiente Natural), FEFPAN (Fungos Endofíticos de Folhas de Plantas de Ambiente Natural), FERPAC (Fungos Endofíticos de Raiz de Planta de Ambiente Cultivado), FTSAC (Fungos Totais de Solo de Ambiente Cultivado) e BECPAN (Bactérias Endofíticas de Caule de Plantas de Ambiente Natural), apresentaram 100% das plantas infectadas. O tratamento PSAC (*Pseudomonas* de Solo de Ambiente Cultivados) e BTSAC (Bactérias Totais de Solo de Ambiente Cultivado) apresentaram um número baixo de plantas infectadas com 23,07 e 25% respectivamente. TSAC (*Trichoderma* de Solo de Ambiente Cultivado) foi único tratamento que não apresentou infecção por PMWaV-1. As análises mostraram também que a presença do vírus PMWaV-2 foi menor nos tratamentos testados, com 37,28% do total de plantas infectadas. A escala de nota desenvolvida mostrou-se eficiente para classificar os diferentes níveis de severidade dos sintomas causados pelo vírus da murcha do abacaxizeiro.

**Palavras-chave:** Campo; Cochonilha; Escala de notas; Vírus

**ABSTRACT:** PMWaV is the agent responsible for causing pineapple wilt, a disease transmitted by scale insects *Dysmicoccus brevipes* and *D. neobrevipes* that are the vectors of the three viral species, PMWaV 1, 2 and 3. The wilt of pineapple causes loss of production and therefore, a way is sought to make the use of micropropagated pineapple seedlings, virus-free, accompanied by growth-promoting agents feasible. The objective of this work was to evaluate the presence of PMWaVs (1, 2 and 3) in BRS Imperial plants in field conditions, naturally infected with the virus. These plants were obtained by micropropagation of virus-free matrices, and were inoculated with beneficial microorganisms still *in vitro* condition. There were 18 treatments, each with a mix of isolates of bacteria or fungi from the soil and endophytic roots, stems and leaves from a natural or cultivated environment and the control. The microbiolized seedlings were planted in the field and the effect of these microorganisms on the pineapple's response to wilt was evaluated. The evaluations were made through the indexing of the plants and a scale of visual notes of symptoms in field conditions that was developed in this study. The results showed that all treatments had at least one infected plant. The control and treatments BEFPAC (Endophytic Bacteria on Leaves of Cultivated Environment Plants), PSAN (*Pseudomonas* of Soil of Natural Environment), BASAN (*Bacillus* of Soil of Natural Environment), FEFPAN (Endophytic Fungi of Leaves of Natural Environment Plants), FERPAC (Endophytic Fungi of Plant Root of Cultivated Environment), FTSAC (Total Fungi of Soil of Cultivated Environment) and BECPAN (Endophytic Stem Bacteria of Plants of Natural Environment), presented 100% of the infected plants. The treatment PSAC (*Pseudomonas* of Soil of Cultivated Environment) and BTSAC (Total Cultivated Environment Soil Bacteria) showed a low number of infected plants with 23,07 and 25% respectively. TSAC (*Trichoderma* of Soil of Cultivated Environment) was the only treatment that did not present infection by PMWaV-1. The analyzes also showed that the presence of the PMWaV-2 virus was lower among treatments, with 37,28% of the total infected plants. The grade scale developed was efficient to classify the different levels of severity of the symptoms caused by the pineapple wilt virus.

**Keywords:** Field; Mealybug; Scale of notes; Virus



## 1.0 INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se na produção de abacaxi, assumindo grande importância econômica no mercado internacional de frutas, reforçando a relevância para o desenvolvimento de atividades voltadas para a conservação dos recursos genéticos da espécie (CABRAL et al., 2004). O abacaxi está entre as frutas tropicais mais apreciadas no mundo com uma produção global que atingiu 27,4 milhões de toneladas em 2017. Foi constatado crescimento de 12,52% na produção da fruta no período entre 2012 e 2017 (FAOSTAT, 2019). O Brasil é o segundo maior produtor mundial de fruta, com uma produção de 2,69 milhões de toneladas e que pode ser encontrada na forma de cultivo na maioria dos estados do país (FAOSTAT, 2019).

Para garantir uma boa comercialização, a cultura do abacaxizeiro apesar de ser adaptado a clima seco (REINHARDT et al., 2000), exige uma boa disponibilidade hídrica além de tecnologias e conhecimentos adequados que possibilitem êxito econômico (SANCHES & MATOS, 2013).

A produção de abacaxi corre grandes riscos devido às doenças que a acometem, destacando-se a murcha do abacaxizeiro, considerada a principal doença em nível mundial (SETHER & HU, 2002). A murcha é causada pelo complexo viral do *Pineapple mealybug wilt-associated virus* (PMWaV) com três espécies já caracterizadas, denominados PMWaV-1, PMWaV-2, e PMWaV-3, que se diferenciam pela sequência e organização do genoma (MELZER et al., 2001; 2008; SETHER et al., 2009). No campo, os vírus são transmitidos pela cochonilha *Dysmicoccus brevipes* e *D. neobrevipes*. (CULIK, 2009).

A espécie *D. brevipes* tem distribuição mais global do que *D. neobrevipes*, ocorrendo em quase todos os lugares onde o abacaxi é cultivado. Ambas as espécies, apareceram pela primeira vez no Havaí em 1905. Na Tailândia, a *D. neobrevipes* foi descoberta em 1988, infestando árvores, mas não tem sido relatada em abacaxizeiros. No Brasil, apenas a *D. brevipes* foi relatada em 1931 (AMORIM, 2011).

A cochonilha *D. brevipes* ocasiona o enfraquecimento das plantas devido à sucção da seiva que associada a infecção pelo PMWaV impede a frutificação normal, podendo ocasionar também a morte das plantas antes do período reprodutivo (CULIK et al., 2008).

O vírus apresenta infecção sistêmica, prejudicando o desenvolvimento do sistema radicular do abacaxizeiro e induzindo sintomas foliares que podem apresentar coloração vermelho-bronzeada, margens curvadas e pontas enroladas e necrosadas (MATOS & MEISSNER FILHO, 2013). Muitas vezes as plantas doentes não apresentam sintomas visuais e assim as mudas dessas plantas assintomáticas podem levar a doença para novos locais (AMORIM, 2011).

O manejo da doença é realizado pelo plantio de mudas livres de vírus e o controle da cochonilha vetora. Uma nova proposta para reduzir os danos devidos à infecção pelo PMWaV é a utilização de microrganismos benéficos que atuem na indução da resistência do abacaxizeiro a fitopatógenos, como por exemplo, os microrganismos habitantes do solo e endofíticos (SUN et al. 2015).

Os microrganismos benéficos aumentam a capacidade da planta em resistir às pragas e doenças, sobretudo por melhorar o desempenho e crescimento vegetal, refletindo também no ganho em produtividade (CHAPARRO et al., 2014).

Desta forma, o estudo de bactérias e fungos que compõem o microbioma rizosférico e endofítico associado ao gênero *Ananas* apresenta potencial para a descoberta de ferramentas biotecnológicas de interesse agrícola, com foco no controle de fitopatógenos. Assim, é cada vez maior o número de pesquisas que visam a bioprospecção de microrganismos benéficos à planta, além da sua aplicação para o melhoramento de cultivares. Vale destacar que estudos sobre a composição da microbiota e suas interações com o gênero *Ananas* spp. ainda são escassos (SOUZA, 2017).

Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar a ocorrência do vírus PMWaV em plantas de 'BRS Imperial' inoculadas com microrganismos benéficos associados ao gênero *Ananas*, assim como estabelecer uma escala de notas para classificação visual da severidade de sintomas da murcha do abacaxizeiro.

## **2.0 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Material vegetal**

Foram avaliados abacaxizeiros da cultivar 'BRS Imperial' cultivados no campo experimental da Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizada no município de Cruz

das Almas, Bahia, área com ocorrência elevada de *D. brevipes* e PMWaV. Plantas obtidas por micropropagação a partir de matrizes livres de vírus foram inoculadas ainda em condições *in vitro* com microrganismos benéficos associados ao gênero *Anana* ssp. Foram separados tubos de ensaio nos quais foram introduzidos 10 g de substrato autoclavado. Nesses tubos de ensaio foram adicionados ao substrato, 4 mL de meio líquido contendo sais e vitaminas MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) suplementado com BAP 0,20 mg L<sup>-1</sup>, o qual teve seu pH ajustado para 5,7. Após a inserção do meio líquido ao substrato nos tubos de ensaio que foram autoclavados a 121°C durante 20 minutos. Para cada uma das suspensões bacterianas, as absorbâncias foram definidas e ajustadas para 0,1 ( $\lambda = 550$  nm) que corresponde a 10<sup>8</sup> ufc/mL (SOUZA, 2011; CUNHA et al., 2006), já para os tratamentos com fungos todas as suspensões foram ajustadas para concentração de 10<sup>7</sup> esporos.mL<sup>-1</sup> pela contagem de esporos em hemacitômetro do tipo Neubauer. As suspensões com bactérias foram semeadas nos substratos esterilizados e as plantas foram inseridas três dias após a semeadura. Para os tratamentos com fungos, as plantas foram inseridas no substrato dez dias após a semeadura. Feito isso, os tratamentos foram mantidos em pré-aclimatização a 22 °C e 12 horas de fotoperíodo, por 42 dias. Posteriormente, as mudas foram aclimatizadas em casa de vegetação, passando por canteiro e em seguida campo. Foram testados 18 tratamentos, cada um composto de mix de isolados de bactérias ou fungos provenientes do solo e organismos endofíticos de raízes, caules e folhas de ambiente natural ou cultivado (Tabela 1), além do controle que não recebeu microrganismos, totalizando 19 tratamentos. Cada tratamento foi composto por um número variável de repetições, totalizando 177 plantas. 210 dias após a microbiolização, as mudas foram encaminhadas para o campo. No momento das avaliações, as plantas estavam em condição de campo há 15 meses, sujeitas à infestação natural das cochonilhas e consequente infecção pelos PMWaVs (Figura 1.A).

**Tabela 1.** Grupos de microrganismos que compõem os tratamentos inoculados em plantas de abacaxizeiros da cultivar 'BRS Imperial'.

TRATAMENTOS	SIGLAS
Controle	CONTROLE
Bactérias endofíticas de raiz de plantas de ambiente natural	BERPAN
Bactérias endofíticas de raiz de plantas de ambiente cultivado	BERPAC
<i>Bacillus</i> de solo de ambiente natural	BASAN
<i>Bacillus</i> de solo de ambiente cultivado	BSAC
<i>Pseudomonas</i> de solo de ambiente cultivado	PSAC
<i>Pseudomonas</i> de solo de ambiente natural	PSAN
Bactérias totais de solo ambiente cultivado	BTSAC
Bactérias totais de solo de ambiente natural	BTSAN
Fungos endofíticos de folhas de plantas de ambiente natural	FEFPAN
Fungos endofíticos de raiz de planta de ambiente cultivado	FERPAC
Fungos totais de solo de ambiente cultivado	FTSAC
Bactérias endofíticas de caule de plantas de ambiente natural	BECPAN
Bactérias endofíticas de folhas de plantas de ambiente cultivado	BEFPAC
Bactérias endofíticas de folhas de plantas de ambiente natural	BEFPAN
Bactérias endofíticas de caule de plantas de ambiente cultivado	BECPAC
<i>Actinobactérias</i> de solo de ambiente natural	ASAN
<i>Actinobactérias</i> de solo de ambiente cultivado	ASAC
<i>Trichoderma</i> de solo de ambiente cultivado	TSAC

## 2.2 Extração do RNA total para realização das análises de indexação para o PMWaV em plantas de abacaxizeiro

A amostra biológica consistiu de uma folha intermediária de cada planta de abacaxizeiro. Após a coleta, as amostras foram lavadas em água corrente e água destilada, depois, secadas com papel toalha e em seguida realizada a extração do RNA total. Para as extrações, foram utilizadas aproximadamente 100 mg de amostra foliar, retirado da parte basal aclorofilada da folha (Figura 1.B). Utilizou-se plantas de abacaxi livre de vírus provenientes do laboratório de cultura de tecido como controle negativo e plantas previamente indexadas e diagnosticadas como positivas para os três vírus como controle positivo.



Figura 1. Plantas da cultivar BRS Imperial em condições de campo, 15 meses após o plantio (A). Folha de abacaxizeiro proveniente do campo com a parte aclorofilada em destaque (B).

Procedeu-se as extrações de RNA através do método do reagente Trizol<sup>®</sup>, seguindo as recomendações do fabricante. As amostras coletadas foram maceradas em nitrogênio líquido, adicionados ao macerado 1 mL de Trizol<sup>®</sup> e incubado por 5 minutos em temperatura ambiente. O macerado foi transferido para microtubos de 1,5 mL, sendo adicionados 200  $\mu$ L de clorofórmio, agitando-se vigorosamente por 30 segundos e a amostra foi incubada por 3 minutos em temperatura ambiente. Logo após, centrifugou as amostras a 12.000 G a 4° C por 15 minutos. Transferiu-se a fase aquosa para novo tubo, adicionou-se 500  $\mu$ L de álcool isopropílico, incubou-se por 3 minutos a temperatura ambiente e centrifugou-se a 12.000 G por 10 minutos a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante e o pellet foi lavado com e 1000  $\mu$ L de álcool etílico 75 % (v/v) e centrifugou-se a 11.500 G por 5 minutos, a 4°C. Removeu-se o sobrenadante e o *pellet* foi deixado por aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram ressuspendidas em 30  $\mu$ L de água livre de nucleases, incubadas em banho-maria a 50 °C por 10 minutos e armazenada a -80°C. Para confirmar a qualidade dos RNAs extraídos, amostras foram avaliadas em eletroforese em gel de agarose a 1% em TAE 1X a voltagem de 80mV por 30 minutos, e a quantidade do RNA nas amostras foi estimado por espectrofotometria de UV em aparelho Nanovue (GE Healthcare). O RNA total foi tratado com a Turbo DNase<sup>®</sup> (ThermoFisher) para remoção do DNA genômico e a concentração do RNA de cada amostra foi padronizado para 100 ng/ $\mu$ L.

### 2.3 Identificação das espécies do PMWaV por RT-PCR

A reação da transcrição reversa (RT) consistiu em duas etapas consecutivas. Durante a primeira etapa foram adicionados em um microtubo: 1µg de RNA total, 0,25µg *Random Primer* e o volume foi completado para 12µL com água livre de nucleases. A amostra foi incubada por 10 minutos a 70 °C em termociclador, e em seguida transferida para o gelo. A segunda etapa consistiu em adicionar 1 µL da mistura de dNTPs a 10 mM, 2µL do tampão da reação, 1µL da enzima transcriptase reversa (M-MLV, ThermoFisher). A Reação final foi incubada em termociclador a 37°C por uma hora e em seguida por 10 minutos a 80°C.

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada utilizando oligonucleotídeos específicos para o PMWaV-1, PMWaV-2 e PMWaV-3 (Tabela 2). A reação consistiu de 3,0µL de cDNA, 2,50µL do tampão da reação, 1,50µL de MgCl<sub>2</sub> nmol, 1µL de dNTPs a 2,5 mM, 1µL (1U) da Taq Platinum DNA Polimerase (ThermoFisher) e 1µL de cada oligonucleotídeo a 10 mM. O volume da reação foi completado para 25µL adicionando-se água livre de nucleases. O processo de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguida de 38 ciclos a 94°C por 45 segundos, anelamento dos primers a 48°C por 40 segundos e extensão a 72°C por 7 minutos. Os amplicons foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

Tabela 2 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações, de acordo com Sether et al. (2001) e (2005).

Oligonucleotídeos	Sequência
PMWaV-1F	5'-ACAGGAAGGACAACACTCAC-3'
PMWaV-1R	5'-CGCACAAACTTCAAGCAATC-3'
PMWaV-2F	5'-CATACGAACTAGACTCATACG-3'
PMWaV-2R	5'-CCATCCACCAATTTTACTAC-3'
PMWaV-3F	5'-AGTTCACTGTAGATTTTCGGA-3'
PMWaV-3R	5'-ATTGATGGATGTGTATCG-3'

### 2.4 Análise da severidade dos sintomas

Após a confirmação de plantas positivas para o vírus, foi estabelecida uma escala de notas para a classificação visual da severidade dos sintomas da murcha

do abacaxizeiro em condições de campo. A escala de notas foi desenvolvida com base nos sintomas característicos provocados pela murcha do abacaxizeiro através de uma avaliação visual dos acessos de abacaxi do banco ativo de germoplasma da Embrapa Mandioca e Fruticultura de Cruz das Almas, BA. Foram selecionados dezenove acessos e desses, seis foram escolhidos para compor a escala de severidade. Os sintomas foram observados levando em consideração plantas sintomáticas e plantas assintomáticas. A escala considerou notas de 0 a 5 com níveis de severidade crescentes (Figura 2).

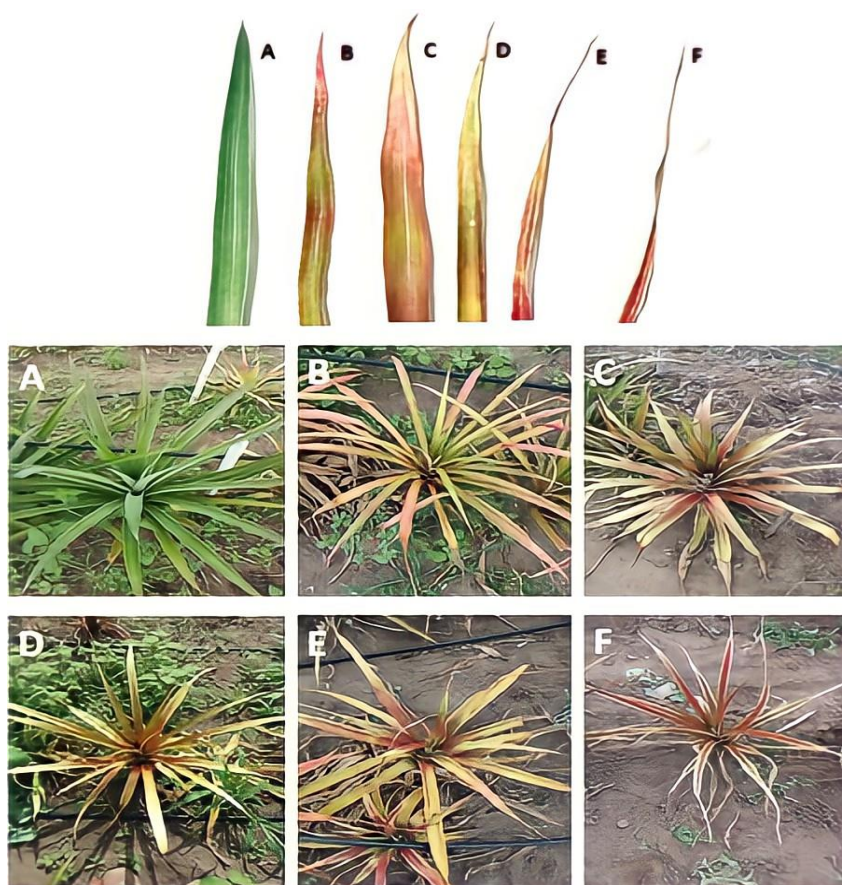


Figura 2. **A) 0:** Folha com aspecto sadio, sem sintomas visíveis de murcha. **B) Nível 1:** A folha começa a apresentar pontos de avermelhamento. **C) Nível 2:** Avermelhamento mais acentuado, pontos de amarelecimento e início de ressecamento das pontas. **D) Nível 3:** Aumento do ressecamento das pontas da folha. **E) Nível 4:** As bordas se dobram e o ressecamento das pontas começa a se espalhar em direção a base. **F) Nível 5:** A folha perde turgescência e ocorre necrose por quase toda a folha com a borda toda dobrada, causando um comprometimento total das folhas e posterior morte do abacaxizeiro.

A reação média de cada tratamento foi calculada através da média aritmética das notas das plantas avaliadas. Essa característica foi utilizada para discriminar as planta em cinco classes de reação à doença, sendo: 0,1 - 1,0 = início dos sintomas

(IS); 1,1 - 2,0 = severidade baixa (SB); 2,1 -3,0 = severidade mediana (SM); 3,1- 4,0 = severidade alta (SA); 4,1 - 5,0= severidade extrema (SE). (Figura 3).

Foi calculado o índice de severidade da doença (ID) de acordo com o índice de McKinney (1923), pela expressão:  $ID = [\Sigma(\text{grau da escala} \times \text{frequência}) / (\text{número total de unidades} \times \text{grau máximo da escala})] \times 100$ , utilizando-se os dados de severidade obtidos com a escala de notas. Após se obter a ID para cada planta, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott ( $P \leq 0,05$ ). As análises foram efetuadas com o auxílio do programa R (R Development Core Team, 2018).

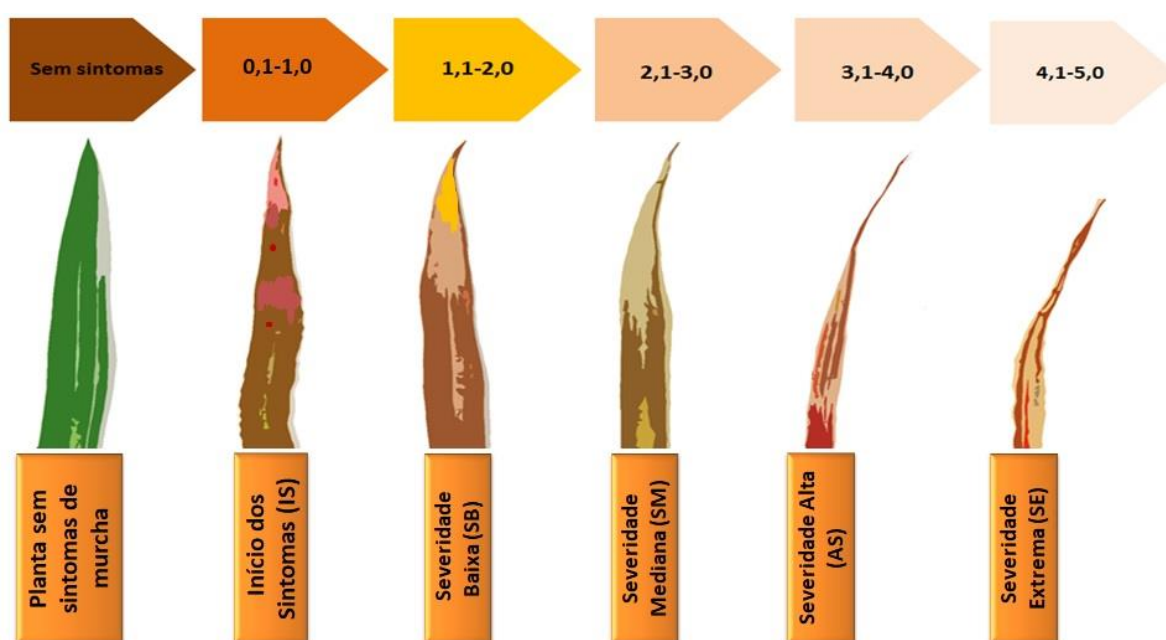


Figura 3. Classificação de nota representada pela média aritmética das notas das plantas avaliadas.

### 3.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foram avaliadas 177 plantas da cultivar ‘BRS Imperial’ distribuídas em 19 tratamentos, dos quais apenas 51 plantas (28,82%) estavam livres da infecção por PMWaV até o momento da avaliação (15 meses após o plantio em campo). Todos os tratamentos avaliados apresentaram ocorrência de pelo menos um dos três vírus.

Ao considerar todas as plantas analisadas, foi observado maior prevalência do PMWaV-3 com 62,14% das plantas infectadas, seguido do PMWaV-1 com 43,50% e PMWaV-2 com 37,28% (Figura 4). A frequência avaliada das três espécies de PMWaV também considerou infecção simples e mista (Figura 5), a qual mostra



que a maioria das plantas (24,30%) estavam infectadas com os três vírus. A apresentação da frequência detalhada está na Tabela 3.

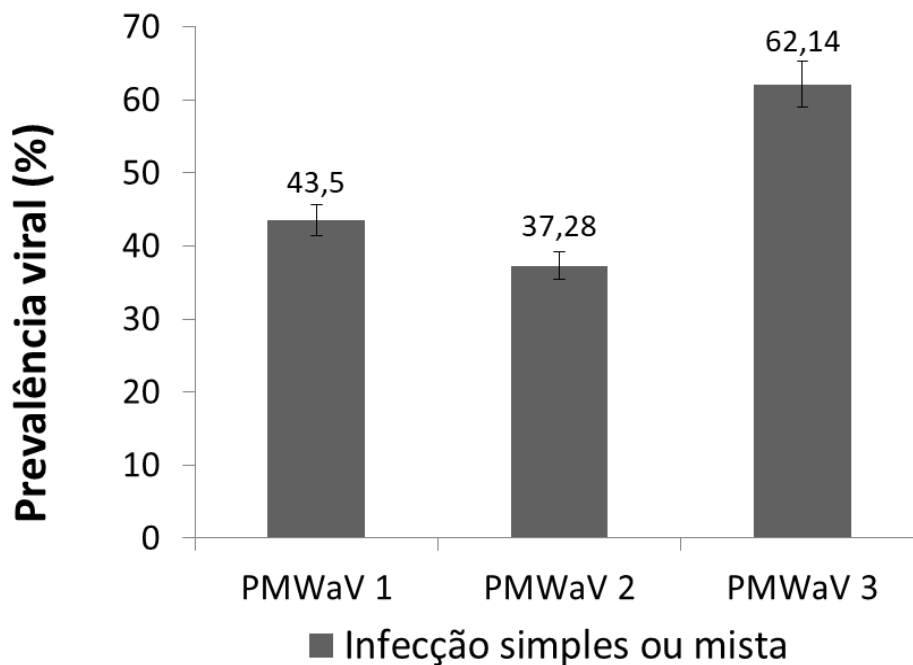


Figura 4. Frequência considerando infecção por PMWaV simples ou mista, os valores não somam 100%. Cruz das Almas – BA, out/2020.

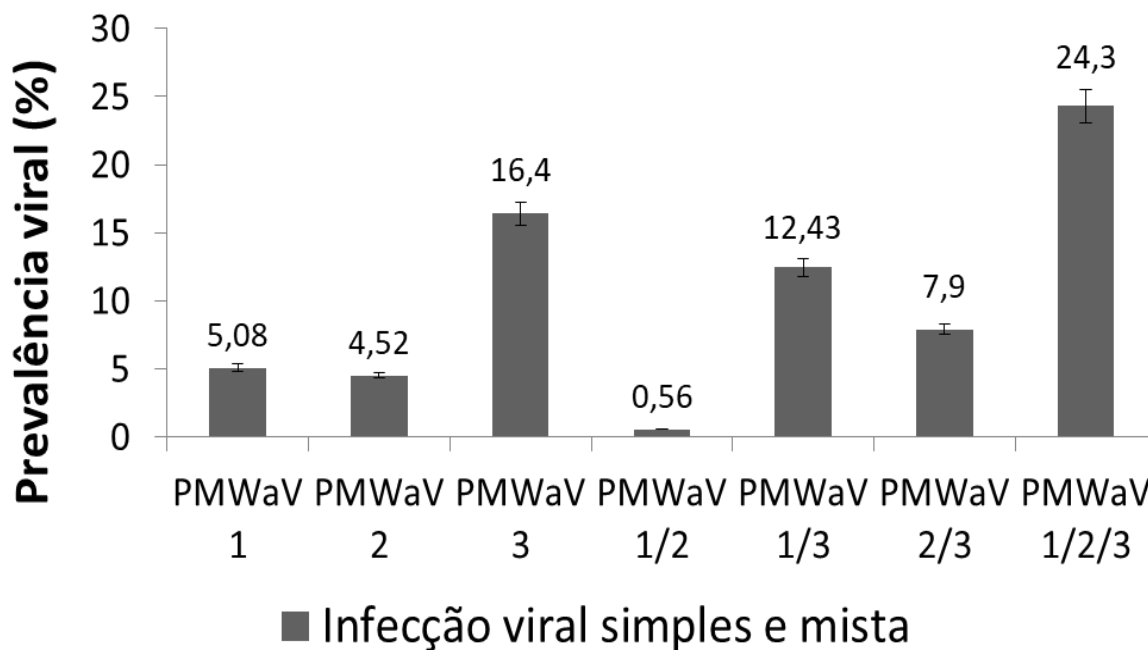


Figura 5. Frequência considerando infecção por PMWaV simples e mista. Cruz das Almas – BA, out/2020.

Considerando as infecções por tratamento, além do controle, os tratamentos com BEFPAC (Bactéria Endofítica de Folha de Planta de Ambiente Cultivado), PSAN (*Pseudomonas* de Solo de Ambiente Natural), BASAN (*Bacillus* de Solo de Ambiente Natural), FEFPAN (Fungos Endofíticos de Folhas de Plantas de Ambiente Natural), FERPAC (Fungos Endofíticos de Raiz de Planta de Ambiente Cultivado), FTSAC (Fungos Totais de Solo de Ambiente Cultivado) e BECPAN (Bactérias Endofíticas de Caule de Plantas de Ambiente Natural) apresentaram 100% das plantas infectadas (Tabela 3).

Com exceção das plantas tratadas com PSAC (*Pseudomonas* de Solo de Ambiente Cultivado) e TSAC (*Trichoderma* de Solo de Ambiente Cultivado), todos os outros tratamentos apresentaram infecção mista. As plantas destes tratamentos podem ter adquirido os vírus em sucessivas inoculações, com um vírus de cada vez, ou com inoculações duplas ou triplas.

A ausência de infecção apenas pelo PMWaV-2 aconteceu na maioria dos tratamentos, somente cinco tratamentos exibiram essa infecção e com um número baixo de plantas dentre eles. Os tratamentos PSAC e BASAN por sua vez não apresentaram infecção pelo vírus PMWaV-2, nem em infecção única e tampouco em infecção mista. A baixa incidência do PMWaV-2 no controle indica que a presença de microrganismos, aparentemente não teve relação com a ausência desse vírus. Apesar de todos os vírus pertencerem ao gênero *Ampelovirus* e serem adquiridos e transmitidos por *D. brevipes* e *D. neobrevipes*, o PMWaV-2 difere filogeneticamente do PMWaV-1 e do PMWaV-3, que são mais semelhantes, o que poderia explicar esta diferença na taxa de transmissão (SETHER et al., 2009).

PSAC ainda apresentou o menor número de plantas infectadas, seguido do tratamento com BTSAC (Bactérias Totais de Solo de Ambiente Cultivado), apresentando 23,07% e 25% das plantas afetadas, respectivamente. Bactérias de solo promovem inúmeros efeitos vantajosos como, fixação de nitrogênio, produção de fito hormônio, enzimas, sideróforos, solubilização de potássio, zinco e controle de doenças por supressão ou morte de fitopatógenos, além de produzir uma ampla gama de metabólitos secundários devido a vários mecanismos de secreção e efetuar reações bioquímicas com enzimas líticas (NAYAK, 2017). A microbiota associada às plantas no ambiente de cultivo pode se sobressair em relação aos outros por possuírem interações bem estabelecidas com a cultura, apresentando

relativa importância quando se considera a seleção de microrganismos benéficos (SOUZA, 2017).

Bactérias benéficas associadas a plantas são conhecidas por suprimir doenças diretamente através do antagonismo microbiano ou indiretamente por indução de resistência em plantas. Indução de resistência confere na planta uma capacidade defensiva aumentada. Tais mecanismos desencadeiam respostas celulares, com rápida transdução do sinal, logo, os genes são sistematicamente ativados, o que resulta no aumento ou alteração da síntese proteica, induzindo mudanças metabólicas específicas na planta (SOUZA, 2020), ativando sua resistência latente, impedindo ou dificultando a infecção pelo patógeno e o consequente desenvolvimento da doença (SILVA JR. & BEHLAU, 2018).

Tabela 3. Prevalência detalhada, considerando infecção simples e mista, entre e dentro dos tratamentos avaliados.

Tratamentos	Nº infectados Testados	PMWaV	PMWaV	PMWaV	PMWaV	PMWaV	PMWaV	PMWaV
		1	2	3	1/2	1/3	2/3	1/2/3
CONTROLE	10 10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	9 (90%)	1 (10%)	0 (0%)
BECPAC	8 12 (66,6%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (8,3%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (16,6%)	5 (41,6%)
ASAN	7 9 (77,7%)	2 (22,2%)	1 (11,1%)	1 (11,1%)	0 (0%)	2 (22,2%)	0 (0%)	1 (11,1%)
BTSAN	7 9 (77,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (22,2%)	5 (55,5%)
BEFPAC	12 12 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (16,6%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (33,3%)	6 (50%)
BEFPAN	6 13 (46,1%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (23%)	0 (0%)	2 (15,4%)	0 (0%)	1 (7,7%)
PSAC	3 13 (23%)	2 (15,4%)	0 (0%)	1 (7,7%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
ASAC	3 8 (37,5%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (12,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (25%)
PSAN	10 10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (10%)	2 (20%)	7 (70%)
TSAC	4 7 (57,1%)	0 (0%)	3 (42,8%)	1 (14,3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
BASAN	5 5 (100%)	2 (40%)	0 (0%)	1 (20%)	0 (0%)	2 (40%)	0 (0%)	0 (0%)
FEFPAN	4 4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)	3 (75%)
FERPAC	4 4 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (75%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)
FTSAC	2 2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (50%)
BECPAN	10 10 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (60%)	0(0%)	1 (10%)	2 (20%)	1 (10%)
BTSAC	3 12 (25%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (16,6%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (8,3%)
BERPAC	8 11 (72,7%)	0(0%)	2 (18,2%)	0 (0%)	1 (9,1%)	2 (18,2%)	0 (0%)	3 (27,2%)
BERPAN	10 13 (76,9%)	1 (7,7%)	1 (7,7%)	2 (15,4%)	0 (0%)	2 (15,4%)	0 (0%)	4 (30,7%)
BSAC	10 13 (76,9%)	2 (15,4%)	1 (7,7%)	4 (30,7%)	0 (0%)	1 (7,7%)	0 (0%)	2 (15,4%)
TOTAL	126 177 (71,2%)	9(5,1%)	8(4,5%)	29(16,4%)	1(0,6%)	22(12,4%)	14(7,90%)	43(24,3%)

Os tratamentos também foram avaliados quanto à severidade da murcha de acordo com uma escala de notas. Para essa avaliação a escala de notas desenvolvida se mostrou eficiente. Das 177 plantas, 71 (40,1%) não apresentaram sintomas de murcha e nenhuma planta apresentou o nível extremo da doença, nível 5. Apenas 13 (7,34%) plantas foram identificadas com nível 4 indicando uma alta

severidade. Os níveis com maior número de plantas sintomáticas foram 1 e 2 com 44 (24,85%) e 34 (19,21%) plantas respectivamente. Um total de 15 (8,48%) plantas foram identificadas com o nível 3 de severidade (Tabela 4).

Entre os tratamentos avaliados, BSAC (*Bacillus* de Solo de Ambiente Cultivado) e PSAC (*Pseudomonas* de Solo de Ambiente Cultivados) apresentaram maiores números de plantas sem sintomas, ambos com 10 (76,92%), sendo que BSAC apresentou 76,92% das plantas infectadas pelo vírus da murcha, ou seja, das plantas infectadas, apenas três apresentaram sintomas. Essa observação pode levar a crer que o grupo de isolados destes microrganismos, apesar de não impedir a planta de ser infectada, pode proporcionar uma melhor resposta a infecção viral. Existem evidências da indução de mecanismos de resistência através de *Bacillus* spp. contra fungos, bactérias e nematóides fitopatogênicos, mas são escassos estudos relacionados à indução de resistência contra vírus (SAMANIEGO-GÁMEZ et al. 2017). *Bacillus* spp. já são considerados uma alternativa ecológica e bio-segura aos fungicidas e bactericidas químicos tradicionais devido à sua capacidade intrínseca de induzir vias antiestresse em plantas (LASTOCHKINA et al., 2019). Sugere-se que os mecanismos de tal ação incluam: competição por espaço/nutrientes com patógenos, produção de várias substâncias bioativas com atividade antibióticas, e compostos degradadores da parede celular, indução de resistência sistêmica e também por meio da promoção da saúde das plantas, manifestando assim um grande potencial (MACHADO et al., 2012; PAGE et al., 2019; LASTOCHKINA et al., 2019).

Muitos tratamentos apresentaram sintomas intermediários e mais severos, mas também, apresentaram um número elevado de plantas sem sintomas, como é o caso dos tratamentos BERPAN, BERPAC, BTSAC, PSAC, BEFPAN e BTSAN. É importante ressaltar que apesar da área ter infestação natural de cochonilha e vírus, a disseminação da cochonilha é aleatória e lenta pela sua baixa mobilidade que depende muito de formigas para se disseminar em uma área, a associação simbiótica das cochonilhas com as formigas favorece sua movimentação para as plantas vizinhas, surgindo sintomas da murcha em reboleira. Sem as formigas, as populações de cochonilhas são pequenas e lentas, o que reduz o fluxo de infestação e probabilidade de perda da produção (JANH et al., 2003). Além disso, o surgimento dos sintomas de murcha e a sua intensidade estão também ligados, ao ambiente e a

planta, como vigor, idade e cultivar (MATOS et al., 2007). O real impacto dos tratamentos deve ser avaliado em plantas forçadamente inoculadas.

Tabela 4. Prevalência viral, exibindo diferentes níveis de severidade nos tratamentos avaliados.

Tratamento	n	Níveis de severidade					
		0	1	2	3	4	5
CONTROLE	10	0 (0%)	5 (50%)	1 (10%)	2 (20%)	2 (20%)	0 (0%)
BECPAC	12	4 (33,3%)	4 (33,3%)	4 (33,3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
ASAN	9	0 (0%)	5 (55,5%)	2 (22,2%)	0 (0%)	2 (22,2%)	0 (0%)
BTSAN	9	5 (55,5%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (11,1%)	3 (33,3%)	0 (0%)
BEFPAC	12	4 (33,3%)	6 (50%)	1 (8,3%)	1 (8,3%)	0 (0%)	0 (0%)
BEFPAN	13	7 (53,8%)	3 (23%)	2 (15,4%)	1 (7,7%)	0 (0%)	0 (0%)
PSAC	13	10 (76,9%)	0 (0%)	1 (7,7%)	2 (15,4%)	0(0%)	0 (0%)
ASAC	8	5 (62,5%)	0 (0%)	3 (37,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
PSAN	10	2 (20%)	1 (10%)	7 (70%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
TSAC	7	3 (42,8%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (14,3%)	3 (42,8%)	0 (0%)
BASAN	5	1 (20%)	1 (20%)	3 (60%)	0(0%)	0 (0%)	0 (0%)
FEFPAN	4	0 (0%)	1 (25%)	3 (75%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
FERPAC	4	0 (0%)	3 (75%)	1 (25%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
FTSAC	2	0 (0%)	0 (0%)	1 (50%)	1 (50%)	0 (0%)	0 (0%)
BECPAN	10	2 (20%)	3 (30%)	1 (10%)	2 (20%)	2 (20%)	0 (0%)
BTSAC	12	9 (75%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (25%)	0 (0%)	0 (0%)
BERPAC	11	4 (36,4%)	4 (36,7%)	3 (27,3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
BERPAN	13	5 (38,5%)	6 (46,1%)	1 (7,7%)	1 (7,7%)	0 (0%)	0 (0%)
BSAC	13	10(76,9%)	2 (15,4%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (7,7%)	0 (0%)
TOTAL	177	71 (40,1%)	44(24,8%)	34 (19,2%)	15 (8,5%)	13 (7,3%)	0 (0%)

**0:** Folha com aspecto sadio, sem sintomas visíveis de murcha. **1:** A folha começa a apresentar pontos de avermelhamento. **2:** Avermelhamento mais acentuado, pontos de amarelecimento e início de ressecamento das pontas. **3:** Aumento do ressecamento das pontas da folha. **4:** As bordas se dobras e o ressecamento das pontas começa a se espalhar em direção a base. **5:** A folha perde turgescência e ocorre necrose por quase toda a folha com a borda toda dobrada, causando um comprometimento total das folhas e posterior morte do abacaxizeiro.

Quanto à classificação da doença, houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 5). Dez tratamentos apresentaram severidade variando de 8,9 a 25,0 e os outros nove tratamentos obtiveram severidade com intervalos entre 30,0 e 50,0. Entre todos os tratamentos avaliados apenas três apresentaram uma severidade mediana, incluindo o controle. A maioria dos tratamentos apresentou reação com início dos sintomas (IS), e sete tratamentos apresentaram reação com severidade baixa (SB).

Tabela 5. Índice de severidade da murcha do abacaxizeiro em 'BRS Imperial' 15 meses após o plantio.

Tratamentos	Classe da doença		
	Média <sup>1</sup>	Reação <sup>2</sup>	Severidade (%) <sup>3</sup>
BSAC	0,46	IS	8,9 b
PSAC	0,6	IS	13,7 b
BTSAC	0,75	IS	15,0 b
ASAC	0,75	IS	16,66 b
BEFPAN	0,76	IS	18,4 b
BERPAN	0,8	IS	16,0 b
BEFPAC	0,9	IS	14,66 b
BERPAC	0,9	IS	18,66 b
BECPAC	1,0	IS	20,0 b
FERPAC	1,25	SB	25,0 b
BASAN	1,4	SB	30,0 a
PSAN	1,5	SB	30,56 a
BTSAN	1,6	SB	33,36 a
FEFPAN	1,75	SB	35,0 a
ASAN	1,8	SB	35,56 a
BECPAN	1,9	SB	33,3 a
CONTROLE	2,1	SM	38,3 a
TSAC	2,1	SM	42,2 a
FTSAC	2,5	SM	50,0 a
CV (%)			37,1

<sup>1</sup>Classe de reação da doença conforme escala de notas de 0 a 5. <sup>2</sup>Reação da doença: 0,1 - 1,0 = início dos sintomas (IS); 1,1 - 2,0 = severidade baixa (SB); 2,1 - 3,0 = severidade mediana (SM); 3,1 - 4,0 = severidade alta (SA); 4,1 - 5,0 = severidade extrema (SE). <sup>3</sup>Severidade da doença, calculada pelo índice de McKinney (1923), com a utilização das frequências de classes de doença considerando escala de notas de a 0 a 5. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

#### 4.0 CONCLUSÕES

Plantas de abacaxizeiros da cultivar BRS Imperial tratadas com *Pseudomonas* de Solo de Ambiente Cultivado (PSAC) e Bactérias Totais de Solo de Ambiente Cultivado (BTSAC) sob condições naturais apresentam as mais baixas incidências do PMWaV, assim como *Bacillus* de Solo de Ambiente Cultivado (BSAC) apresentou uma melhor resposta aos sintomas típicos da mucha do abacaxieiro.

## REFERÊNCIAS

- AMORIM, de. W. A. Detecção molecular do complexo viral da murcha do abacaxizeiro em plantas e no inseto vetor. **Dissertação** (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo). 2011, p.1-86.
- CABRAL, J.R.S., CASTELLEN, M.S., SOUZA, F.V.D., MATOS, A.P., FERREIRA, F.R. Banco Ativo de Germoplasma de Abacaxi. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2004.
- CHAPARRO, J. M.; BADRI, D. V.; VIVANCO, J. M. Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. **International Society for Microbial Ecology Journal**, v. 8, p.790–803, 2014.
- CULIK, M. P.; MARTINS, D. S.; VENTURA, J. A.; WOLFF, V. R. S. Diaspididae (Hemiptera: Coccoidea) of Espírito Santo, Brazil. **Journal of Insect Science**, Tucson, v. 8, p. 1-6, 2008.
- CULIK, M. P.; VENTURA, J. A. Scale insects (Hemiptera: Coccoidea) of pineapple in the State of Espírito Santo, Brazil. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 822, p. 215-218, 2009.
- CUNHA, J. de F. et al. Efeito “in vitro” de antibióticos e rizobactérias no controle de bactérias fitopatogênicas ao Eucalyptus spp. R. **Árvore**, Viçosa-MG, v.30, n.6, p.871-876, 2006.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO) Database, United States: Database. United States: **FAO/FAOSTAT**, Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data>, Acesso em: 20/04/2020.
- JANH, C.G.; BEARDSLEY, J. W.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, H. A Review of the Association of Ants with Mealybug Wilt Disease of Pineapple. **Proceedings of the Hawaiian Entomological Society**, v.36, p.9-28, 2003.
- KIRIGA, A.W., HAUKELAND, S., KARIUKI, G.M., COYNE, D.L., BEEK, N.V., Effect of Trichoderma Spp. And Purpureocillium Lilacinum on Meloidogyne Javanica in Commercial Pineapple Production in Kenya, **Biological Control**, 2018.
- LASTOCHKINA, O., SEFIKALHOR, M., ALINIAEIFARD, S., BAYMIEV, A., PUSENKOVA, L., 1, GARIPOVA, S., KULABUHOVA, D., MAKSIMOV, I. Bacillus Spp.: Efficient Biotic Strategy to Control Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables. **Plants**, 8, 97, 2019. doi:10.3390/plants8040097
- MACHADO, V.; BERLITZ, D. L.; MATSUMURA, A. T. S.; SANTIN, R. C. M.; GUIMARÃES, A.; SILVA, M. E.; FIUZA, L. M. Bactérias como agentes de controle biológico de fitonematoides. **Oecologia Australis**, v. 16, n. 2, p. 165-182, 2012.
- MATOS, A. P.; MEISSNER FILHO, P. E. Doenças. In: SANCHES, N. F.; MATOS, A. P. Abacaxi: o produtor pergunta, a Embrapa responde. Brasília: **Embrapa**, p. 141-150, 2013.
- MATOS, A.P.; SANCHES, N.F.; SOUZA, L.F. S; ELIAS JÚNIOR, E.; TEIXEIRA, F.A.; GOMES, D.C.; CORDEIRO, D. G. Proposta de um sistema de produção integrada



para a cultura do abacaxi. **Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical**, Cruz das Almas, 2007.

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

MELZER, M. J.; KARASEV, A. V.; SETHER, D. M.; HU, J. S. Nucleotide sequence, genome organization and phylogenetic analysis of pineapple mealybug wilt-associated virus-2. **Journal of General Virology**, Hawaii, v. 82, p. 1-7, 2001.

MELZER, M.J.; SETHER, D.M.; KARASEV, A.V.; BORTH, W.; HU, J.S. Complete nucleotide sequence and genome organization of pineapple mealybug wilt-associated virus-1. **Archives of Virology**, v. 153, p. 707–714, 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NAYAK, S.K.; NAYAK, S.; MISHRA B.B. Antimycotic Role of Soil *Bacillus* sp. Against Rice Pathogens: A Biocontrol Prospective. **Microbial Biotechnology**, 2017.

PAGE, A. P.; ROBERTS, M.; FÉLIX, M.; PICKARD, D.; PAGE, A.; WEIR, W. The golden death bacillus *Chryseobacterium nematophagum* is a novel matrix digesting pathogen of nematodes. **BMC Biology**, v. 17, n. 10, p. 1-13, 2019.

R version 3.5.2 "Eggshell Igloo" Copyright (C) 2018 **The R Foundation for Statistical Computing**, 2018.

REINHARDT, D.H.; SOUZA, L. F. S. DA; CABRAL, J.R.S. Abacaxi. Produção: aspectos técnicos. **Embrapa Mandioca e Fruticultura**, Cruz das Almas, p. 77, 2000.

SANCHES, N. F.; MATOS, A. P. Abacaxi: o produtor pergunta, a Embrapa responde. Brasília, DF: **Embrapa**, 2013.

SAMANIEGO-GÁMEZ B. Y., Reyes-Ramírez, A., MORENO-VALENZUELA, O. A., TUN-SUÁREZ, J. M. Induced systemic resistance against plant viruses elicited by inoculation with rhizobacteria *Bacillus* spp. **Rev. Protección Veg.**, v. 32, No. 1, p. 10-22, 2017.

SETHER, D. M.; HU J. S. Closterovirus Infection and Mealybug Exposure Are Necessary for the Development of Mealybug Wilt of Pineapple Disease. **Phytopathology**, v. 92, No. 9, p. 928 – 935, 2002.

SETHER, D. M.; KARASEV, A. V.; OKUMURA, C.; ARAKAWA, C.; ZEE F.; KISIAN, M. M.; BUSTO, J.L.; HU, J. S. Differentiation, distribution and elimination of two different pineapple mealybug wilt-associated viruses found in pineapple. **Plant Disease**, Hawaii, v.85, n.8, p. 856–864, 2001.

SETHER, D. M.; MELZER, M. J. ; BUSTO, J. ; ZEE, F.; HU, J. S. Diversity and mealybug transmissibility of ampeloviruses in pineapple. **Plant Disease**, Hawaii, v. 89, p. 450- 456, 2005.

SETHER, D.M.; MELZER, M.J.; BORTH, W.B; HU, J.S. Genome organization and phylogenetic relationship of Pineapple mealybug wilt associated virus-3 with family Closteroviridae Members. **Virus Genes**, v. 38, p.414–420, 2009.

SILVA-JUNIOR, G. J.; BEHLAU, F. Controle químico. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. Manual de fitopatologia: princípios e conceitos. 5.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, v. 1, cap. 16, p. 239-260, 2018.

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

SOUZA, C. R. S. Comparação da microbiota funcional cultivável associada à *Ananas* spp. em diferentes ambientes. **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia), 2017.

SOUZA, C.P.F. et al., Promoção de crescimento em plantas aclimatizadas de abacaxi inoculadas com microrganismos associados ao gênero *Ananas*. In: Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, v. 2018, P.345, Fortaleza. **Anais**, Brasília: SBRG, 2018.

SOUZA, D.H.G. Indução de resistência em soja e controle de *pratylenchus brachyurus* com fertilizante foliar a base de alecrim (*rosmarinus officinalis* L.). Dissertação. MARECHAL CÂNDIDO RONDON – PARANÁ, 2020.

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

SUN, S., ZENG, X., ZHANG, D., GUO, S. Diverse fungi associated with partial irregular heartwood of *Dalbergia odorifera*. **Scientific Reports**, v. 5, p. 7, 2015.

## CAPÍTULO 2

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS AO GÊNERO  
*Ananas* ssp. NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE MUDAS  
MICROPROPAGADAS DA VARIEDADE PÉROLA**

**RESUMO:** Tendo em vista a importância do setor produtivo de abacaxi no Brasil, o uso de novas abordagens capazes de promover melhorias no cultivo tornando-o mais sustentável é de total relevância. As primeiras etapas de produção de mudas de abacaxi micropropagadas envolvem o cultivo em casa de vegetação e canteiro, sendo ambas as etapas onerosas e de lento desenvolvimento das plantas. Estudos anteriores demonstraram que microrganismos benéficos podem contribuir para o bom desenvolvimento do abacaxizeiro em diferentes etapas do cultivo, como é o caso da produção de mudas *in vitro*. Diante disso, esse trabalho teve por objetivo avaliar o potencial de promoção de crescimento de bactérias provenientes do microbioma associado de *Ananas* spp. em plantas micropropagadas da variedade Pérola durante as etapas de casa de vegetação e canteiro. Para a condução do experimento, as plantas que tinham sido multiplicadas no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais da Embrapa Mandioca e Fruticultura foram levadas para casa de vegetação onde passaram pelo processo de aclimatização, logo após foram transferidas para tubetes de polietileno e posteriormente microbiolizadas com isolados de bactérias benéficas ao gênero *Ananas*, provenientes de ambientes de ocorrência natural e cultivado, as quais passaram por avaliações periódicas (15, 30, 45, 60, 75, 90 dias após a microbiolização - DAM). O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com 51 repetições em casa de vegetação e 48 repetições em canteiro. Ao final dos 90 DAM, foram retiradas três plantas de cada tratamento e submetidas às seguintes avaliações: comprimento da raiz principal (cm), massa fresca da parte aérea (g), massa fresca das raízes (g), peso seco da parte aérea (g) e peso seco das raízes (g). Logo após, as plantas foram encaminhadas para o canteiro onde passaram por avaliações periódicas (30, 45, 60, 75, 90 dias após o plantio - DAP). Ao final dos 90 dias em casa de vegetação as Bactérias Totais de Solo de Ambiente Natural (BTSAN) apresentaram melhor média para altura da planta, comprimento da folha D, diâmetro da folha D, número de folhas, massa fresca e seca da parte aérea. *Pseudomonas* de Solo de Ambiente Cultivado (PSAC) apresentou melhor média para diâmetro da copa. Em fase de canteiro, ao final dos 90 dias BTSAN também apresentou melhores médias para altura da planta, diâmetro da copa, comprimento da folha D, diâmetro d folha D, numero de folhas e massa fresca e seca da parte aérea.

**Palavras-chave:** Abacaxi; Cultivo; Microbiolização; Promoção de crescimento

**ABSTRACT:** In view of the importance of the pineapple production sector in Brazil, the use of new approaches capable of promoting improvements in cultivation making it more sustainable is of utmost importance. The first stages of production of micropropagated pineapple seedlings involve cultivation in a greenhouse and flower bed, both of which are costly and slow to develop. Previous studies have shown that beneficial microorganisms can contribute to the good development of pineapples in different stages of cultivation, such as the production of seedlings *in vitro*. Therefore, this work aimed to evaluate the potential for promoting the growth of bacteria from the associated microbiome of *Ananas* spp. in micropropagated plants of the Pérola variety during the greenhouse and flower bed stages. For the conduct of the experiment, the plants that had been multiplied at the Vegetable Tissue Culture Laboratory of Embrapa Mandioca and Fruticultura were taken to a greenhouse where they went through the acclimatization process, shortly after they were transferred to polyethylene tubes and later microbiolized with isolates of beneficial bacteria to the genus *Ananas*, from naturally occurring and cultivated environments, which underwent periodic evaluations (15,30, 45, 60, 75, 90 days after microbiolization - DAM). The design used was completely randomized with 51 replications in a greenhouse and 48 replicates in a flower bed. At the end of the 90 DAM, three plants were removed from each treatment and subjected to the following evaluations: length of the main root (cm), fresh weight of the aerial part (g), fresh weight of the roots (g), dry weight of the aerial part (g) and dry weight of the roots (g). Soon after, the plants were sent to the site where they underwent periodic evaluations (30, 45, 60, 75, 90 days after planting - DAP). At the end of 90 days in a greenhouse as Total Soil Bacteria of Natural Environment (BTSAN) average best average for plant height, leaf length D, leaf diameter D, number of leaves, fresh and dry mass of the aerial part. Cultivated Environment Soil *Pseudomonas* (PSAC) showed the best average canopy diameter. In the construction phase, at the end of the 90 days BTSAN also presented the best averages for plant height, crown diameter, leaf length D, leaf diameter D, number of leaves and fresh and dry mass of the aerial part.

**Keywords:** Pineapple; Cultivation; Microbiolization; Growth promotion

## 1.0 INTRODUÇÃO

O abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merr.) é uma planta perene monocotiledônea pertencente à família Bromeliaceae e está entre as frutas tropicais mais populares, ficando atrás apenas da banana em termos de comércio internacional. É considerado economicamente uma das culturas mais valiosas do mundo. (STEINGASS et al. 2015, 2016; FANG et al. 2016; LOBO & PAULL, 2017).

É a única espécie da família Bromeliaceae cultivada comercialmente para seus frutos que além de saborosos, contêm quantidades consideráveis de vitaminas, polifenóis e outros compostos potencialmente promotores da saúde (WANG et al., 2020).

O abacaxizeiro mantém diferentes relações com uma gama ampla de microrganismos, incluindo tanto os fitopatógenos quanto aqueles que compõem o grupo de microrganismos benéficos, os quais podem estar no solo ou ocupando seus tecidos internos (WEBER et al., 2013; SOUZA, 2017).

Microrganismos benéficos associados a plantas estão recentemente atingindo maior atenção, pois desempenham um papel importante no aprimoramento da produtividade das lavouras, como também proporcionam resistência contra as condições de estresse (YADAV & YADAV, 2018), além disso, têm provado ser uma alternativa amigável para a aplicação de pesticidas e fertilizantes químicos (PII et al., 2015; VEJAN et al., 2016).

A atual biodiversidade de microrganismos promotores de crescimento pertence a diferentes grupos, incluindo *Actinobacteria*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Pseudomonas* e *Spirochaetes*. Essas bactérias ocorrem naturalmente no solo e colonizam agressivamente as raízes das plantas e as beneficiam, proporcionando a promoção do crescimento diretamente por solubilização de fósforo, potássio e zinco, produção de ácidos indolacéticos, ácido giberélico, citocinina, fixação biológica de nitrogênio ou indiretamente por produção de amônia, cianeto de hidrogênio, sideróforo e biocontrole contra diferentes patógenos de plantas (YADAV et al., 2017).

Isso quer dizer, que as bactérias promotoras de crescimento de plantas possuem várias habilidades que afetam diretamente o metabolismo das plantas, fornecendo nutrientes que geralmente são escassos e promovendo o crescimento das raízes e a proliferação de pelos radiculares, o que pode melhorar a absorção de

água e nutrientes do solo e, conseqüentemente, melhorar o crescimento e a produtividade da planta (FERREIRA, 2020).

Com isso, a introdução de bactérias na forma de inoculantes biológicos pode ser bastante vantajosa para o setor agrícola, sendo uma das tecnologias mais eficientes em substituir métodos convencionais de adubação com fertilizantes minerais (MELLO, 2019).

Diante disso, esse trabalho teve por objetivo avaliar o potencial de promoção de crescimento de bactérias provenientes do microbioma associado de *Ananas* spp. em plantas micropropagadas da variedade Pérola durante as etapas de casa de vegetação e canteiro.

## **2.0 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Material vegetal**

As plantas da variedade Pérola foram obtidas por micropropagação a partir de matrizes livres de vírus e se encontravam em condição *in vitro* no Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Mandioca e Fruticultura, localizada no município de Cruz das Almas, Bahia.

### **2.2 Isolados bacterianos e Microbiolização**

De acordo com o trabalho anteriormente desenvolvido de Souza (2017), as bactérias utilizadas no experimento foram obtidas de amostras de solo e de plantas do gênero *Ananas* ssp., provenientes de ambientes de ocorrência natural e cultivado, adquiridas em expedições de coleta. Tais amostras, entre fungos e bactérias foram coletadas em três estados, Bahia, Mato Grosso e Rondônia, e foram submetidas à quantificação das populações de bactérias e fungos por meio da contagem de unidades formadoras de colônia em meios de cultura básicos. Foram obtidos um total de 829 isolados, sendo 385 fúngicos e 444 bacterianos.

Os grupos de isolados desses microrganismos foram ranqueados mostrando melhores resultados em relação ao crescimento de abacaxizeiros *in vitro*, casa de vegetação, canteiro e campo em experimentos anteriormente desenvolvidos na Embrapa Mandioca e Fruticultura. Seguindo essas informações, quatro grupos de

isolados de bactérias foram selecionados para o presente estudo: *Pseudomonas* de Solo de Ambiente Cultivado (PSAC) que apresentaram um bom desempenho em condições *in vitro* e em casa de vegetação, *Pseudomonas* de Solo de Ambiente Natural (PSAN) que, assim com PSAC também apresentou um bom resultado em condições de casa de vegetação, e por este motivo, este grupo foi escolhido para compor um tratamento conjunto (PSAC+PSAN). Bactérias Endofíticas de Caule de Planta de Ambiente Cultivado (BECPAC) que exibiram melhor desempenho em condições de canteiro e Bactérias Totais de Solo de Ambiente Natural (BTSAN) que apresentaram um bom desempenho no campo (Dados não publicados).

Essas bactérias totalizaram 40 isolados que passaram pelo processo de reativação, sendo, 8 isolados de PSAC; 12 isolados de PSAN, 10 isolados de BECPAC e 10 isolados de BTSAN. Para isso, os isolados mantidos em preservação (meio nutriente líquido + 15% de glicerol) foram reativados por meio da transferência de 100µL de suspensão de cada isolado, para o meio nutriente líquido (2,5g de peptona, 0,75g de extrato de carne, 2,5g cloreto de sódio, 0,75g extrato de levedura e água destilada), e logo após, transferidos para mesa de agitação por 42 horas. Após o período de incubação, foi produzido um mix para cada grupo descrito, os quais foram reunidos em diferentes recipientes e tiveram as absorbâncias definidas e ajustadas para 0,1 ( $\lambda=550$  nm) que corresponde a  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> (SOUZA, 2011; CUNHA et al., 2006). Posteriormente a este processo, as plantas de abacaxizeiros que se encontravam em casa de vegetação passaram pelo processo de microbiolização via solo.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com 51 repetições em casa de vegetação e 48 repetições em fase de canteiro. Isso porque, para complementar os dados, as plantas da casa de vegetação, antes de serem encaminhadas para canteiro, foram submetidas a avaliações destrutivas, onde foram retiradas ao acaso três plantas de cada tratamento, passando por avaliação de massa seca e fresca da parte aérea e radicular, a mesma coisa foi feita na fase de canteiro. As variáveis avaliadas em cada fase foram: (i) altura da planta (cm); (ii) diâmetro da copa (cm); (iii) comprimento da folha D (cm); (iv) diâmetro da folha D (cm) e (v) número de folhas.

Os dados obtidos durante a fase de casa de vegetação e canteiro foram submetidos à análise de variância e as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott



( $P \leq 0,05$ ). As análises foram efetuadas com o auxílio do programa R (R Development Core Team, 2018).

### 2.3 Fase casa de vegetação

As plantas que se encontravam em condição *in vitro* foram conduzidas à aclimatização em casa de vegetação e após o período de adaptação, essas plantas foram transferidas para tubetes de polietileno com volume de 290 cm<sup>3</sup>. Após 15 dias foram microbiolizadas via solo com auxílio de uma pipeta, adicionando 5mL de cada inóculo com concentração bacteriana de 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup> em seus devidos tratamentos. (Figura 1). As plantas não microbiolizadas receberam apenas uma solução de meio nutriente líquido cada uma. Posteriormente passaram por avaliações periódicas (15, 30, 45, 60, 75, 90 dias após a microbiolização - DAM), adotando-se as variáveis já mencionadas anteriormente.

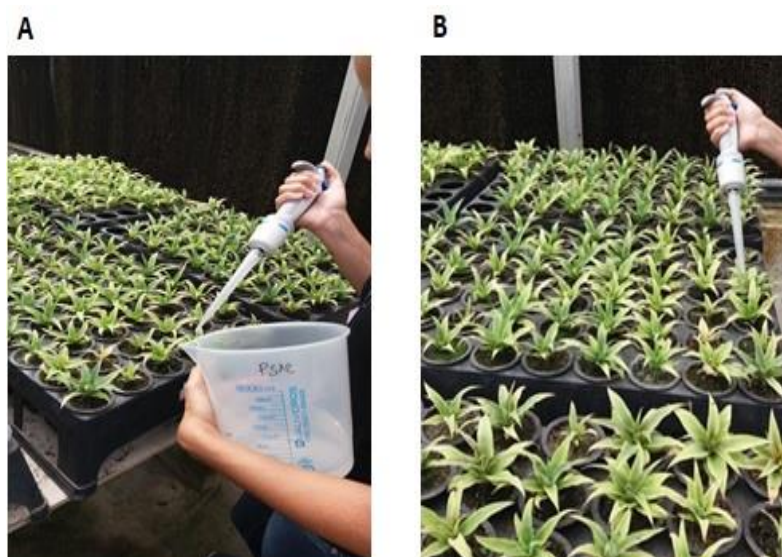


Figura 1. (A-B) Microbiolização de plantas da variedade Pérola em condição de casa de vegetação. Cruz das Almas – BA, out/2020.

Ao final dos 90 dias foram retiradas ao acaso três plantas de cada tratamento, as quais foram submetidas a avaliações destrutivas de massa fresca e seca que foram obtidas após a fragmentação das plantas em sistema radicular e parte aérea, que foram pesadas para determinar primeiramente a massa fresca (g) e logo após, armazenadas em saco de papel Kraft em estufa a 75°C por 72 horas e novamente pesadas para obtenção dos valores de massa seca (g).

## 2.4 Fase de Canteiro

Aos 90 dias as plantas foram encaminhadas ao canteiro e 30 dias após o plantio (DAP) também foram feitas avaliações de (i) altura da planta (cm); (ii) diâmetro da copa (cm); (iii) comprimento da folha D (cm); (iv) diâmetro da folha D (cm) e (v) número de folhas. Além disso, após 90 dias foram coletadas ao acaso três plantas de cada tratamento para avaliação de massa fresca (g) e seca (g) da parte aérea.

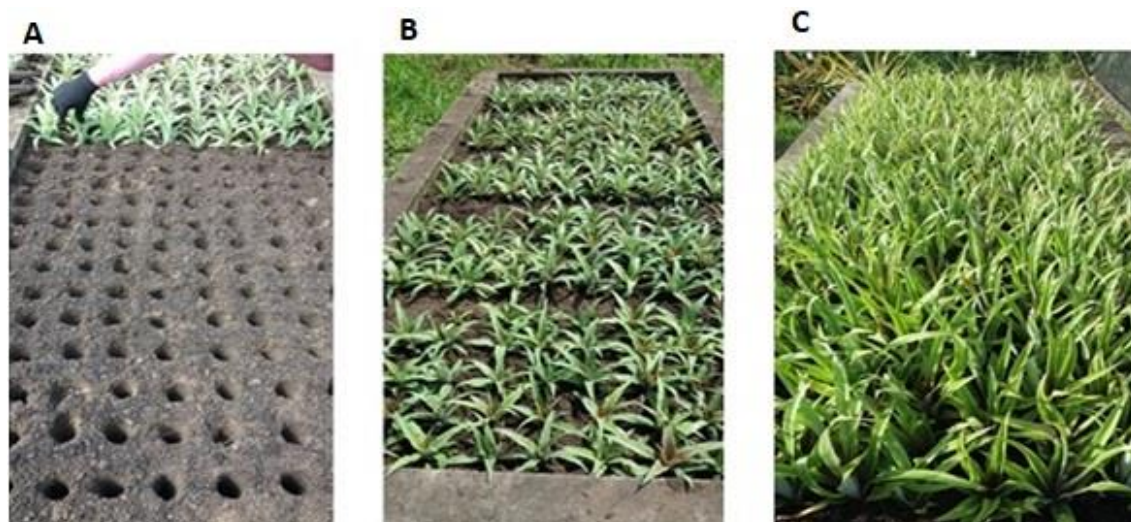


Figura 2. (A) Plantio das plantas microbiolizadas e controle em canteiro. (B) Plantas microbiolizadas em condição de canteiro. (C) Plantas com 90 dias após o plantio. Cruz das Almas – BA, out/2020.

## 3.0 RESULTADO E DISCUSSÃO

### 3.1 Fase Casa de Vegetação

Durante o período de casa de vegetação ficou visualmente evidente a diferença entre os tratamentos quanto ao desenvolvimento das plantas, deixando claro que a microbiolização com as bactérias benéficas associadas ao gênero *Ananas* ssp. apresentaram respostas distintas em cada um dos tratamentos (Figura 1).

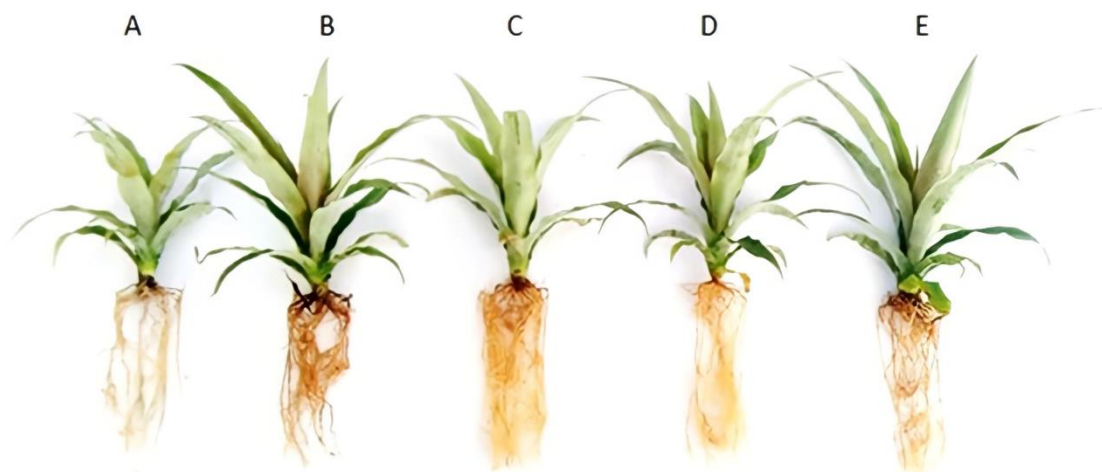


Figura 3. Efeito da microbiolização em plantas da variedade Pérola em condições de casa de vegetação após 90 dias. (A) Controle (não microbiolizado); (B) BECPAC (Bactérias Endofíticas de Caule de Ambiente Cultivado); (C) PSAC+PSAN (*Pseudomonas* de solo de Ambiente Cultivado + *Pseudomonas* de Solo de Ambiente Natural); (D) PSAC (*Pseudomonas* de solo de Ambiente Cultivado); (E) BTSAN (Bactérias Totais de Solo de Ambiente Natural). Cruz das Almas – BA, out/2020.

De acordo com os resultados obtidos, houve diferença significativa entre os tratamentos das variáveis avaliadas aos 90 dias. BTSAN apresentou melhores resultados em altura da planta com 14,3 cm, comprimento da folha D com 15,7 cm, diâmetro da folha D com 1,97 cm e para o número de folhas com 16,39. Para diâmetro da copa PSAC apresentou melhor resultado com 22,96 cm.

Tabela 1. Valores médios de crescimento da variedade Pérola, 90 dias após a inoculação.

90 dias					
Variáveis					
Tratamento	Altura da planta (cm)	Diâm. copa (cm)	Comp. Folha D (cm)	Diâm. Folha D (cm)	Nº de folhas
Controle	12,49 c	20,87 b	13,90 b	1,97 b	13,98 c
BECPAC	14,31 a	21,73 b	15,16 b	2,02 b	15,68 a
BTSAN	14,93 a	22,81 a	15,79 a	2,28 a	16,39 a
PSAC	13,63 b	22,96 a	14,55 a	2,20 a	15,0 b
PSAC+PSAN	13,36 b	21,70 b	14,41 a	2,18 a	14,80 b
CV (%)	12,42	13,13	12,66	11,7	12,82

Controle (não microbiolizado); BECPAC (Bactérias Endofíticas de Caule de Ambiente Cultivado); BTSAN (Bactérias Totais de Solo de Ambiente Natural); PSAC (*Pseudomonas* de solo de Ambiente Cultivado); PSAC+PSAN (*Pseudomonas* de solo de Ambiente Cultivado + *Pseudomonas* de Solo de Ambiente Natural). Na coluna, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott (5%).

Pelos resultados, observa-se que BTSAN apresentou melhor média da massa fresca da parte aérea com 27,23 g diferindo dos demais tratamentos. Quanto à massa seca da parte aérea, houve diferença significativa entre os tratamentos e BTSAN apresentou melhor resultado com 2,74 g, seguido de PSAC com 2,36 g, BECPAC com 2,12 g, PSAC+PSAN com 1,91 g e por último o controle com 1,18 g.

PSAC+PSAN apresentou melhor resultado quanto a massa fresca e secada do sistema radicular com 0,89 e 0,37 respectivamente.

Com relação à raiz principal, BTSAN apresentou maior média com 17,41 cm, seguido de PSAC+PSAN com 16,96 cm, PSAC com 16,46 cm, BECPAC com 15,90 cm e controle com 14,43 cm.

Tabela 2. Valores médios da variedade Pérola, 90 dias após a inoculação.

90 dias					
Variáveis					
Tratamento	Massa fresca parte aérea (g)	Massa seca parte aérea (g)	Massa fresca raízes (g)	Massa seca raízes (g)	Raiz principal (cm)
Controle	11,93 c	1,18 c	0,53 a	0,2 b	14,43 a
BECPAC	20,03 b	2,12 b	0,66 a	0,33 a	15,9 a
BTSAN	27,23 a	2,74 a	0,86 a	0,36 a	17,41 a
PSAC	23,02 b	2,36 a	0,86 a	0,35 a	16,46 a
PSAC+PSAN	19,17 b	1,91 b	0,89 a	0,37 a	16,96 a
CV (%)	9,49	11,8	23,3	19,32	21,21

Controle (não microbiolizado); BECPAC (Bactérias Endofíticas de Caule de Ambiente Cultivado); BTSAN (Bactérias Totais de Solo de Ambiente Natural); PSAC (*Pseudomonas* de solo de Ambiente Cultivado); PSAC+PSAN (*Pseudomonas* de solo de Ambiente Cultivado + *Pseudomonas* de Solo de Ambiente Natural). Na coluna, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott (5%).

A figura 4 mostra o crescimento das plantas durante todo período de avaliação, e nela pode-se perceber que entre os tratamentos descritos, na maioria das variáveis avaliadas, altura da planta (Figura 4. A), comprimento da folha D (Figura 4. C), diâmetro da folha D (Figura 4. D) e número de folhas (Figura 4. E), BTSAN evoluiu melhor ao longo dos 90 dias após a microbiolização.

Por outro lado, também se notou que, de acordo com os resultados de altura da planta, diâmetro da copa (Figura 4. B), comprimento da folha D e número de folhas, o tratamento com BECPAC apresentou melhor desempenho no crescimento das plantas aos 60 dias após a microbiolização com 12,08 cm, 19,81 cm, 14,80 e 13,08 cm respectivamente, exceto para o diâmetro da folha D (Figura 4. D) em que manteve abaixo de PSAC e PSAC+PSAN que apresentaram melhor desempenho neste período ambos com 1,98 cm.

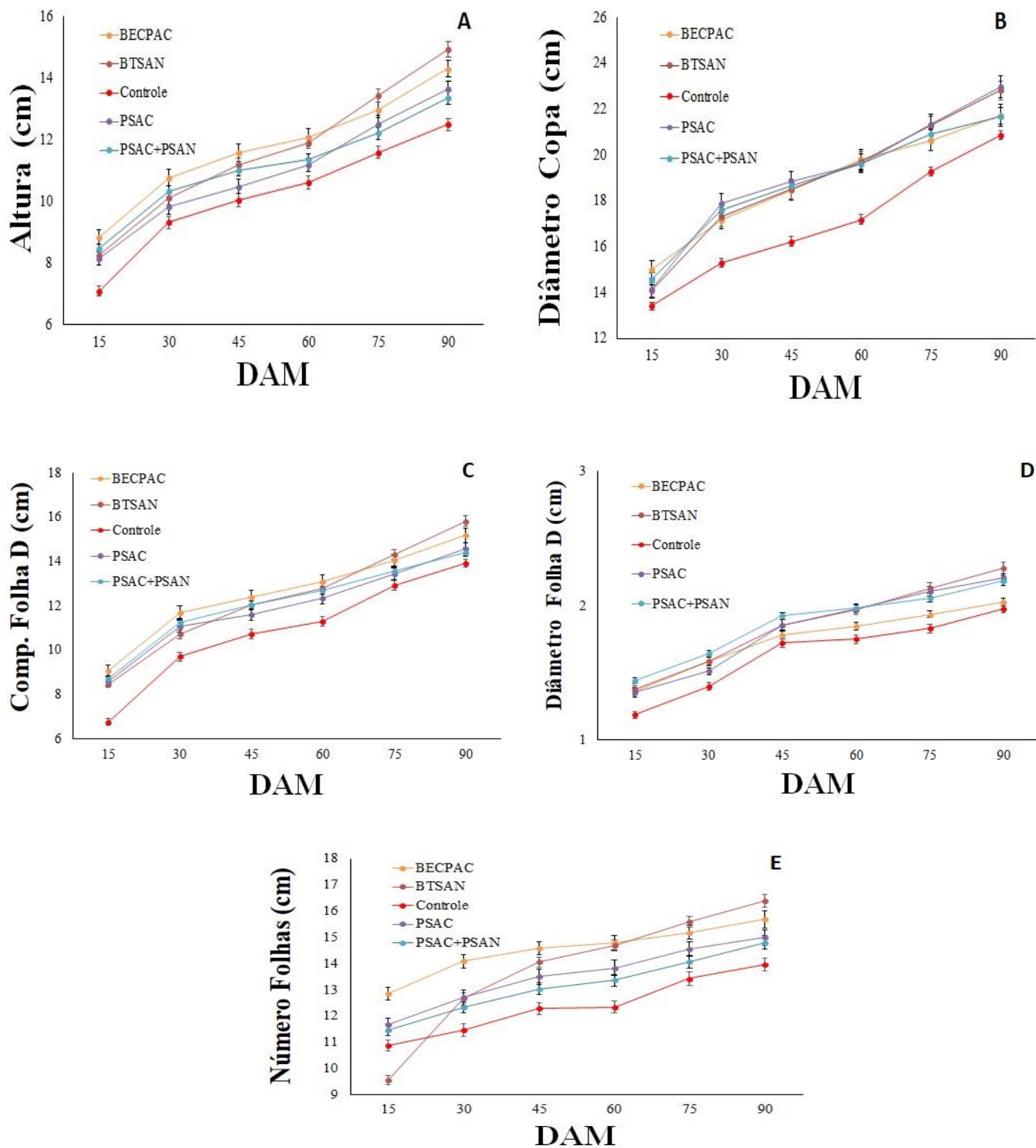


Figura 4. (A-E) Gráfico representativo dos 5 tratamentos (Controle, BECPAC, BTSAN, PSAC, PSAC+PSAN) e cinco variáveis (altura da planta; diâmetro da copa, comprimento da folha D, diâmetro da folha D e número de folhas).

### 3.2 Fase de Canteiro

Durante a fase de canteiro as plantas continuaram demonstrando visualmente crescimento distinto de acordo com cada tratamento (Figura 7).

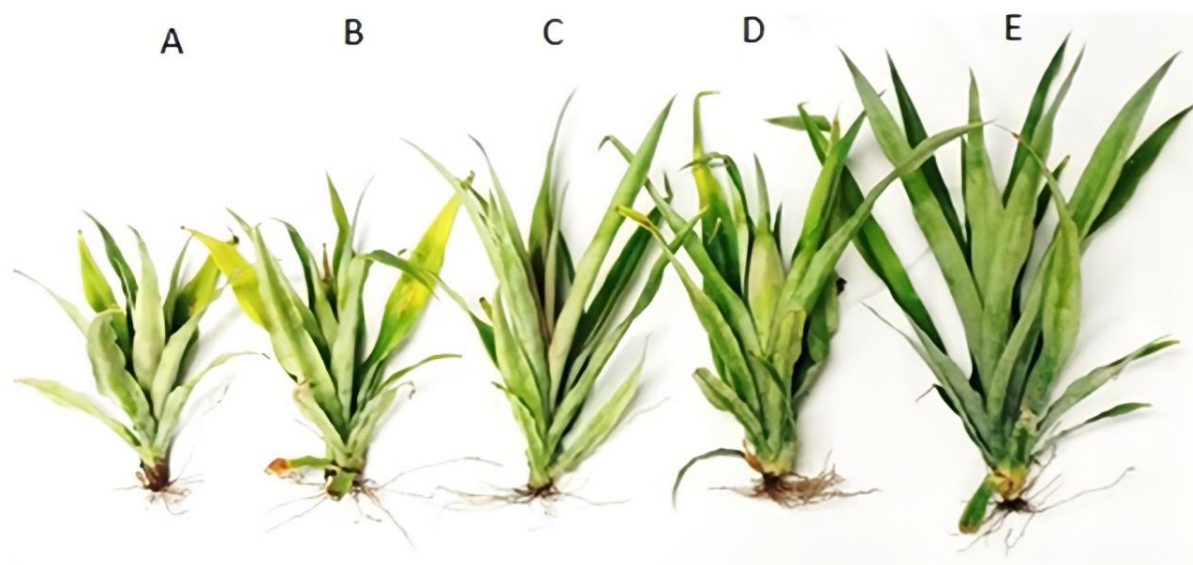


Figura 5. Efeito da microbiolização em plantas da variedade Pérola em condições de canteiro após 90 dias. (A) Controle (não microbiolizado); (B) BECPAC (Bactérias Endofíticas de Caule de Ambiente Cultivado); (C) PSAC+PSAN (*Pseudomonas* de solo de Ambiente Cultivado + *Pseudomonas* de Solo de Ambiente Natural); (D) PSAC (*Pseudomonas* de solo de Ambiente Cultivado); (E) BTSAN (Bactérias Totais de Solo de Ambiente Natural). Cruz das Almas – BA, out/2020.

Tabela 3. Valores médios de crescimento da variedade 'BRS Pérola' 90 dias após o plantio em condições de canteiro.

90 dias							
Variáveis							
Tratamento	Altura da planta (cm)	Diâm. Copa (cm)	Comp. Folha D (cm)	Diâm. Folha D (cm)	Nº de folhas	Massa fresca da parte aérea (g)	Massa seca da parte aérea (g)
Controle	21,0 c	33,18 b	25,51 b	2,46 c	16,25 b	64,55 b	7,42 b
BECPAC	21,85 c	37,20 a	25,65 b	2,83 b	16,27 b	70,78 b	8,37 b
BTSAN	27,41 a	38,61 a	29,85 a	3,10 a	18,95 a	123,52 a	13,60 a
PSAC	25,64 a	38,11 a	29,60 a	2,86 b	18,68 a	114,33 a	12,51 a
PSAC+PSAN	23, 88 b	36,50 a	26,65 b	3,06 a	17,1 a	79,37 b	8,92 b
CV (%)	12,42	13,13	12,66	11,70	12,82	20,72	21,4

Controle (não microbiolizado); BECPAC (Bactérias Endofíticas de Caule de Ambiente Cultivado); BTSAN (Bactérias Totais de Solo de Ambiente Natural); PSAC (*Pseudomonas* de solo de Ambiente Cultivado); PSAC+PSAN (*Pseudomonas* de solo de Ambiente Cultivado + *Pseudomonas* de Solo de Ambiente Natural). Na coluna, médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott Knott (5%).

A figura 6 mostra o crescimento das plantas durante o período de avaliação no canteiro ao longo dos 90 dias e pode-se perceber que todos os tratamentos apresentaram desempenhos satisfatórios em relação ao controle.

Nota-se que nesta fase, PSAC também se mostrou bastante eficiente quanto ao desenvolvimento de crescimento das plantas nas variáveis de altura (Figura 6. A), diâmetro da copa (Figura 6. B), comprimento da folha D (Figura 6. C), número de folhas (Figura 6. E) exceto para diâmetro da folha D (Figura 6. D), em que PSAC+PSAN sobressaíram ao longo dos 90 dias.

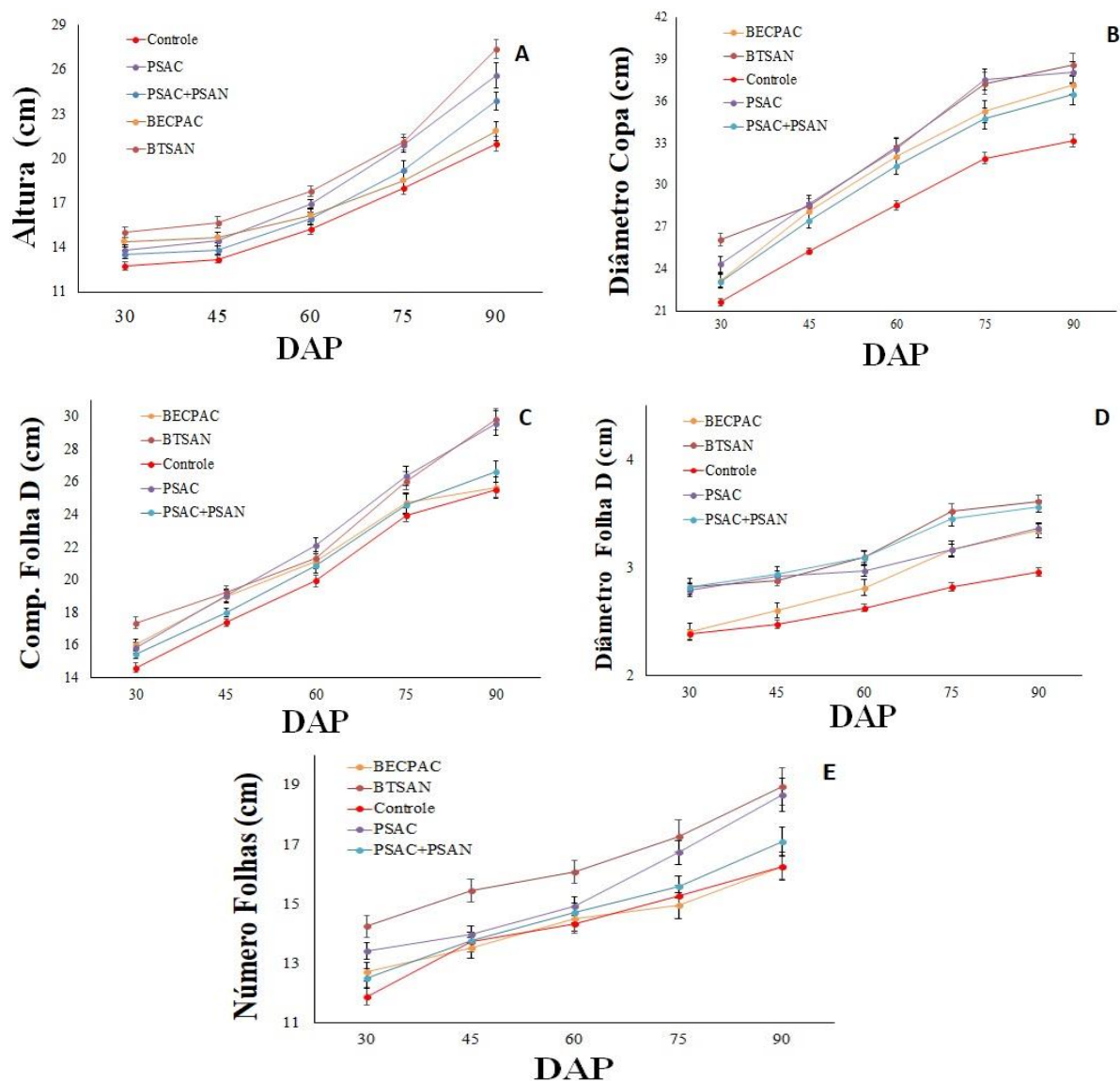


Figura 6. (A-E) Gráfico representativo dos 5 tratamentos (Controle, BECPAC, BTSAN, PSAC, PSAC+PSAN) e cinco variáveis (altura da planta; diâmetro da copa, número de folhas, diâmetro da folha D e comprimento da folha D).

De acordo com os resultados obtidos, houve diferença significativa entre os tratamentos para as variáveis avaliadas aos 90 dias. BTSAN apresentou melhor média com relação a todas as variáveis. Como pode ser observado na tabela 3 para a variável altura das pantas, Os valores melhores resultados foram de 27,41 cm (BTSAN), para o diâmetro da copa, o melhor tratamento foi BTSAM com 38,61 cm , para comprimento da folha D também houve superioridade do tratamento (BTSAN) em relação aos demais. Para as variáveis diâmetro da folha D e numero de folhas o tratamento BTSAN também foi superior aos demais com valores de de 3,10 cm e de 18,95, respectivamente.

Quanto à massa fresca da parte aérea houve diferença significativa entre os tratamentos os quais PSAC+PSAN (79,37 g) que por sua vez diferiram de BTSAN (123,52 g) e PSAC (114,33 g). Esta mesma diferença significativa também ocorreu em relação à massa seca da parte aérea, PSAC com 12,51 g e BTSAN com 13,60 g (Tabela 3). Não foi possível realizar análises de raízes pelo fato das plantas estarem próximas, e como o sistema radicular é fasciculado e superficial não suportariam a ação para a retirada completa das mesmas.

A análise de componentes principais (PCA) para casa de vegetação e para canteiro mostrou que as variáveis mensuradas foram eficientes para avaliar o desenvolvimento das plantas de cada um dos tratamentos, Percebe-se que os resultados para ambas as fases estão correlacionadas positivamente (Figura 7).

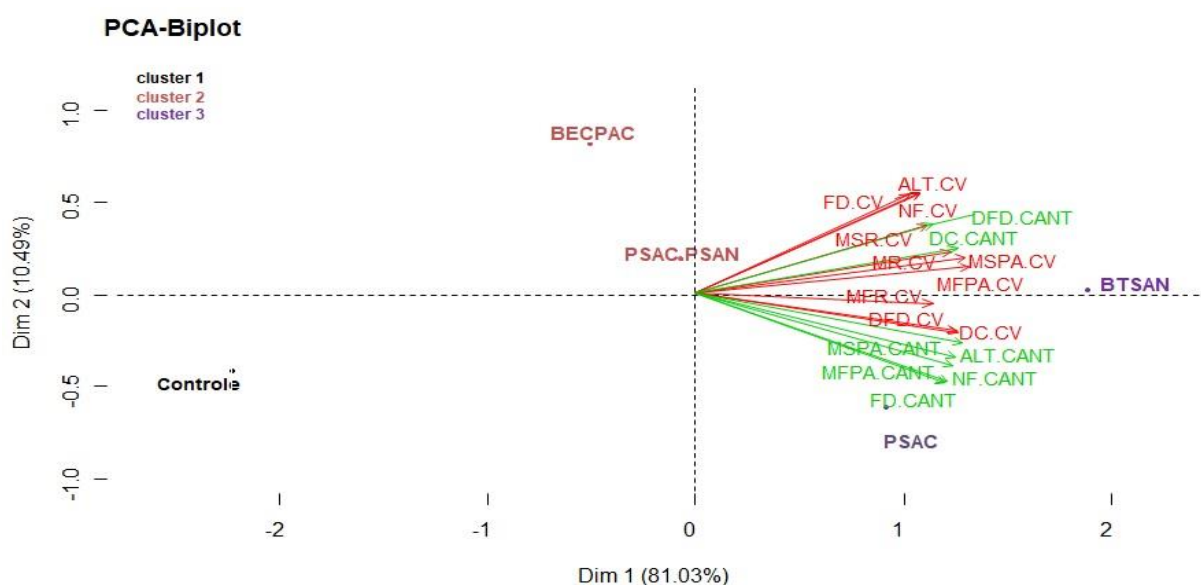


Figura 7. Análise de Componente Principal (PCA) dos tratamentos com base nas variáveis avaliadas após 90 dias em casa de vegetação (setas vermelhas) e em canteiro (setas verdes).



A PCA explicou 91,52% da variação dos dados. De acordo com Rencher (2002), pelo menos 70% da variância total devem ser explicadas pelos primeiros e o segundo componentes principais. Esse resultado comprova os resultados anteriores, mostrando que o controle formou um grupo separadamente que se distancia e se distingue de todos os outros tratamentos. Os resultados ainda mostraram que BTSAN apresentou maiores valores para a grande maioria das variáveis avaliadas.

Ficou evidente que todos os tratamentos que receberam mix de bactérias foram capazes de promover crescimento das plantas ao longo do tempo, sobressaindo-se em relação àquele que não recebeu nenhum tipo de inoculação bacteriana, tanto em condições de casa de vegetação quanto em canteiro. Sabe-se que bactérias auxiliam no crescimento e desenvolvimento das plantas sendo fundamentais para agricultura sustentável e para a estabilidade ambiental. Esses microrganismos são um caminho possível para lidar com diferentes estresses bióticos e abióticos (KUMAR et al., 2018). Assim, a temperatura no interior das casas de vegetação e diferentes tratamentos culturais podem interferir no crescimento da planta (BERILLI et al., 2011). Por isso, não se exclui a possibilidade das plantas microbiolizadas neste estudo terem resistido melhor a esses estresses.

Observou-se que durante o período de casa de vegetação, BECPAC apresentou melhor desempenho aos 60 dias após a microbiolização na maioria das variáveis avaliadas (exceto para diâmetro da folha D). De acordo com Oliveira et. al (2019), às bactérias endofíticas vivem de maneira assintomática e simbiótica no interior das plantas, a relação endófito-hospedeiro é regulada por várias etapas fisiológicas bem evoluídas e caracteriza-se por um equilíbrio entre a do microrganismo e os mecanismos de defesa da planta. Além disso, isso mostra que apesar de práticas agrícolas com inúmeras e constantes intervenções, as bactérias de ambiente cultivado podem apresentar relações bem estabelecidas com a cultura.

No entanto, as plantas tratadas com BECPAC não continuaram apresentando em fase de canteiro o mesmo desempenho que apresentaram na fase de casa de vegetação. A interação entre planta e microrganismo é uma etapa essencial para a maioria dos fatores relacionados ao crescimento das plantas, esta associação depende de diversos elementos, como genótipo, idade da planta, tipos de exsudatos liberados, fatores edáficos, clima, interação da microbiota do solo, tudo isso facilita ou dificulta esta associação (SANTOS et. al, 2019). Isso pode sugerir que o grupo

das bactérias que compõem o tratamento, não se adaptou bem a mudança de ambiente, mas ainda assim se manteve a cima do controle.

Em contrapartida, Jayakumar et al. (2020) perceberam que bactérias endofíticas isoladas em folhas de *Ananas comosus*, mostraram parâmetros de crescimento aprimorados em mudas de *Vigna radiata* com relação ao comprimento do caule, comprimento da raiz e números de raízes quando comparados ao controle, observando que essas bactérias são uma boa alternativa para aplicação em campo sob condições agro-climáticas variáveis, pois além de promoverem o crescimento das mudas, apresentaram propriedades de tolerância à seca.

BTSAN por sua vez, apresentou melhor resultado na maioria das variáveis avaliadas em casa de vegetação (altura da planta, diâmetro da folha D, número de folhas, massa fresca e seca da parte aérea e raiz principal) e em todas as variáveis avaliadas em fase de canteiro (altura da planta, diâmetro da copa, diâmetro da folha D, número de folhas, massa fresca e seca da parte aérea) aos 90 dias após a microbiolização e após o plantio respectivamente. As bactérias do solo são muito importantes nos ciclos biogeoquímicos e têm sido usadas na produção de culturas há décadas. As interações planta-bactéria na rizosfera são os determinantes da saúde das plantas e da fertilidade do solo. Bactérias do solo de vida livre benéficas para o crescimento das plantas são capazes de promover o crescimento colonizando as raízes da planta (HAYAT et al. 2010). Desta forma, a capacidade que esses microrganismos têm de promover o crescimento da planta pode ser usada para obter uma rápida produção da cultura, pois, bactérias promotoras de crescimento em geral ao se associarem as plantas podem agir como, biofertilizantes (aumentando a disponibilidade de nutrientes para a planta), fitoestimulantes (devido a promoção de crescimento de plantas, geralmente através de hormônios), rizoremediadores (devido a degradação de poluentes orgânicos) e biopesticidas pelo controle de doenças (SANTOS et. al, 2019).

Importante lembrar que microrganismos presentes no solo são responsáveis pela decomposição da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes e energia, liberação de nutrientes em formas disponíveis às plantas e degradação de substâncias tóxicas; eles promovem ainda, associações simbióticas com raízes de plantas, atuam no controle biológico de patógenos, e influenciam na solubilização de minerais e contribuem para a estruturação e agregação do solo (DUBEY et. al, 2006; FERREIRA et. al, 2017).

Observou-se também que os grupos de *Pseudomonas* apresentaram bons resultados quanto ao incremento de massa fresca e seca da raiz em casa de vegetação, notando-se que a combinação das *Pseudomonas* de solo de ambiente cultivado e natural (PSAC+PSAN) apresentou o melhor resultado quanto às essas variáveis, já BTSAN apresentou melhor média quanto ao comprimento da raiz principal. *Pseudomonas* são rizobactérias que abrangem uma gama de organismos muito versáteis, com diversas características, e para o interesse agrônômico, são capazes de atuar na promoção do crescimento de plantas, devido à sua capacidade de induzir a produção de ácido indolacético (AIA), que promove o crescimento radicular, faz com que a planta seja mais eficiente na absorção de água e nutrientes e, conseqüentemente, melhora seu desenvolvimento e produtividade (FREITAS, et al, 2003).

Vários grupos de pesquisa já relataram que a inoculação com rizobactérias promotoras de crescimento de plantas aumenta significativamente o crescimento da raiz da cultura (NGO et al. 2019). Pečenková et al. (2017), relataram que *Pseudomonas* spp. benéficas têm a capacidade de influenciar a arquitetura da raiz em *Arabidopsis thaliana*, inibindo o alongamento da raiz primária e promovendo a raiz lateral e a formação de pelos radiculares, demonstrando um papel crucial para a auxina nesta interação planta-microrrorganismo. Rizobactérias promotoras de crescimento afetam a divisão e a diferenciação celular, levando a mudanças na arquitetura do sistema radicular, o que contribui para o aumento do crescimento do rebento. Essas modificações são estabelecidas alterando as vias de sinalização endógena da planta (VERBON & LIBERMAN, 2016).

Games et al. (2019) avaliaram os efeitos de rizobactérias em mudas de bananeiras produzidas em cultura de tecidos e aclimatizadas em casa de vegetação e observaram ainda que, as raízes das plantas de bananeiras inoculadas com *Pseudomonas* apresentaram maior espessura, maior comprimento e volume de raízes secundárias abundantes com boa arquitetura geral. Em particular, as plantas tratadas com *Pseudomonas fluorescens* Ps006 mostraram um complexo radicular maior do que as plantas não inoculadas, com mais ramos e raízes secundárias, e um crescimento abundante da área pelífera, também. Essas bactérias também apresentaram bons resultados para massa fresca e seca da parte aérea, com 12,86 e 1,17g, respectivamente.

Muitos estudos estão sendo realizados com bactérias para promoção de crescimento e resultados satisfatórios estão sendo obtidos. Qessaoui et al. (2019) por exemplo, inocularam cinco novos isolados de *Pseudomonas* em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) em condições de casa de vegetação, as quais foram submetidas a avaliação de altura da planta, diâmetro do colar e número de folhas, observaram que todos os cinco isolados promoveram o comprimento da planta e aumentaram o diâmetro do colar, assim como aumentou o número de folhas.

Borah et al. (2019), isolaram bactérias endofíticas associadas ao chá (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze), que é um produto economicamente importante na safra de bebidas e constataram que essas bactérias foram capazes de aumentar os parâmetros vegetativos, como peso seco e fresco da raiz e do caule das plantas em condições de viveiro, além de demonstrarem múltiplas característica para a promoção de crescimento tanto em testes *in vivo* quanto *in vitro*.

Já Emami et al. (2019), caracterizaram bactérias rizosféricas e endofíticas promotoras do crescimento de plantas e avaliaram seu impacto no crescimento de cultivares de trigo em condições *in vitro* e em casa de vegetação. Verificou-se que os parâmetros de crescimento da planta foram aumentados pela inoculação combinada de dois grupos de bactérias rizosféricas e endofíticas em comparação com inoculações individuais (respectivamente 33,7 e 37,8% de aumento na raiz e peso seco da parte aérea), sugerindo que rizobactérias promotoras de crescimento agiram sinergicamente como endófitos promotores de crescimento em solubilização de fosfato.

Diante dos resultados, pode-se perceber a importância de estudos da microbiota associada ao gênero *Ananas*, pois, claramente o crescimento dos abacaxizeiros foi influenciado pela microbiolização, que resultou em crescimento da parte aérea como também no incremento da biomassa. Os resultados indicam que microrganismos podem acelerar o crescimento das plantas tanto em fase de casa de vegetação quanto em fase de canteiro, diminuindo assim o tempo de produção e os custos.

#### 4.0 CONCLUSÕES

Os tratamentos com microrganismos associados ao gênero *Ananas* mostraram-se eficientes quanto à promoção de crescimento das plantas tanto em condição de casa de vegetação, quanto em condição de canteiro. Para a aclimatização de mudas de abacaxizeiro Pérola a aplicação de 5ml de suspensão bacteriana é capaz de promover o crescimento da parte aérea e aumentar o incremento das raízes.

## REFERÊNCIAS

- BERILLI, S. S. CARVALHO, A. J. C.; FREITAS, S. J.; FARIA, D. C.; MARINHO, C. S. Avaliação do desenvolvimento de diferentes tamanhos de mudas micropropagadas de abacaxizeiro, após aclimatação. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 1, p. 208-214, 2011.
- BORAH, A., DAS, R., MAZUMDAR, R., THAKUR, D. Culturable endophytic bacteria of *Camellia* species endowed with plant growth promoting characteristics. **Journal of Applied Microbiology**, 2019. doi:10.1111/jam.14356
- CUNHA, J. de F. et al. Efeito “in vitro” de antibióticos e rizobactérias no controle de bactérias fitopatogênicas ao *Eucalyptus* spp. **R. Árvore**, v.30, n.6, p.871-876, 2006.
- DA SILVA, J. R., NETTO, A. T., DE MEDEIROS, B. P., de Deus, B. C. da S., Silva, M. V. S., Ferraz, T. M., Olivares, F. L. Endophytic diazotrophic bacteria mitigate water deprivation effects in pineapple explants during acclimatization. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v.32, p. 63-77, 2020.
- DUBEY, S. K.; TRIPATHI, A. K.; UPADHYAY, S. N. Exploration of soil bacterial communities for their potential as bioresource. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 97, p. 2217-2224, 2006.
- EMAMI, S., ALIKHANI, H. A., POURBABAEI, A. A., ETESAMI, H., SARMADIAN, F., MOTESSHAREZADEH, B. Effect of rhizospheric and endophytic bacteria with multiple plant growth promoting traits on wheat growth. **Environmental Science and Pollution Research**, 2019. doi:10.1007/s11356-019-05284-x
- FANG, J., Miao, C., CHEN, R. & MING, R. Genome-wide comparative analysis of microsatellites in pineapple. **Trop. Plant Biol.** V. 9, p. 117–135, 2016.
- FERREIRA, E. P. B., STONE, L. F., MARTIN-DIDONET, C. C. G. Population and microbial activity of the soil under an agro-ecological production system. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 48, n. 1, p. 22-31, 2017
- FERREIRA, S. C. Identificação de bactérias endofíticas isoladas de raízes de mandioca (*manihot esculenta crantz*) com potencial aplicação na agricultura. **Dissertação**, UFPA, Belém, 2020.
- FREITAS, S.S.; MELO, A.M.T.; DONZELI, V.P. Promoção do crescimento de alface por rizobactérias. **Revista brasileira de Ciência do Solo**. Viçosa, vol.27, n.1, p.10, 2003.
- GAMEZ, R., CARDINALE, M., MONTES, M., RAMIREZ, S., SCHNELL, F. Screening, plant growth promotion and root colonization pattern of two rhizobacteria (*Pseudomonas fluorescens* Ps006 and *Bacillus amyloliquefaciens* Bs006) on banana cv. Williams (*Musaa cuminata Colla*). **Microbiological Research**, v. 220, p. 12–20, 2019.
- HAYAT, R., ALI S., AMARA, U. KHALID, R., AHMED, I. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review, *Ann Microbiol*, v. 60, p. 579–598, 2010.
- JAYAKUMAR, A., & PADMAKUMAR, P., NAIR, I. C., RADHAKRISHNAN, E. K. Drought tolerant bacterial endophytes with potential plant probiotic effects from *Ananas comosus*. **Biologia**, v. 75, 1769–1778, 2020.

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

LOBO, M. G., & PAULL, R. E. (Eds.). Handbook of pineapple technology: Production, postharvest science, processing and nutrition. **Chichester: John Wiley & Sons**, 2017.

MELLO, L. P. S. Bactérias probióticas do rúmen na promoção do crescimento de milho e soja. UNESP, câmpus de Jaboticabal. **Dissertação**, 2019.

NGO, N. P., YAMADA, T., HIGUMA, S., UENO, N., SAITO, K., KOJIMA, K., MAEDA, M., YAMAYA-ITO, H., OHKAMA-OHTSU, N., KANEKATSU M., YOKOYAMA, T. Spore inoculation of *Bacillus pumilus* TUAT1 strain, a biofertilizer microorganism, enhances seedling growth by promoting root system development in rice. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 65, p. 598–604, 2019.

OLIVEIRA, J. A. S., OLIVEIRA JUNIOR, V. A. de., CÓTICA, L. F., CONTE, H., PAMPHILE, J. A. Síntese biológica de nanopartículas mediada por microorganismos endofíticos. **Saber Científico**, v. 8, n. 1, p. 146–155, 2019.

PEČENKOVÁ, T.; JANDA, M., ORTMANNOVÁ J., HAJNÁ V. STEHLÍKOVÁ Z. 3,5 ŽÁRSKÝ V. Early Arabidopsis root hair growth stimulation by pathogenic strains of *Pseudomonas syringae*. **Annals of Botany**, v. 120, p. 43-446, 2017.

PII, Y., MIMMO T., TOMASI, N., TERZANO, CESCO, R. S., CRECCHIO, C. Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. **Biol. Fert. Soils.**, v. 51, p. 403-415, 2015.

QESSAOUI, R., BOUHARROUD, R., FURZE, J.N. *et al.* Applications of New Rhizobacteria *Pseudomonas* Isolates in Agroecology via Fundamental Processes Complementing Plant Growth. **Sci Rep**, v. 9, 12832, 2019.

R version 3.5.2 "Eggshell Igloo" Copyright (C) 2018 **The R Foundation for Statistical Computing**, 2018.

RENCHER, A.C. Methods of Multivariate Analysis. A JOHN WILEY & SONS, INC. PUBLICATION. p.727. 2ed. 2002.

SANTOS, R. K. A., SCIPIONI, C. A., MACEDO, T. H. J., NASCIMENTO, C. C., SANTOS, J. S., FERREIRA, J. S. Seleção de bactérias promotoras de crescimento em eucalipto em condições de casa de vegetação. **ACSA**, Patos-PB, v.15, n.3, p. 224-227, Edição Especial VI CONEFLO, 2019.

SOUZA, C. R. S. Comparação da microbiota funcional cultivável associada à *Ananas* spp. em diferentes ambientes. **Dissertação**. UFRB, 2017.

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

STEINGASS, C. B., DELL, C., LIEB, V. M., MAYER-ULLMANN, B., CZERNY, M., & CARLE, R. Assignment of distinctive volatiles, descriptive sensory analysis and consumer preference of differently ripened and post-harvest handled pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.) fruits. **European Food Research and Technology**, v. 242(1), p. 33–43, 2016.

STEINGASS, C. B., Glock, M. P., SCHWEIGGERT, R. M., & CARLE, R. Studies into the phenolic patterns of different tissues of pineapple (*Ananas comosus* [L.] Merr.) infructescence by HPLC-DAD-ESIMS<sub>n</sub> and GC-MS analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407(21), p. 6463–6479, 2015.

VEJAN, P., ABDULLAH, R., KHADIRAN, T., ISMAIL, S., Boyce, N. A. Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability—A Review. **Molecules**, v. 21, p. 573, 2016

VERBON, E. H., LIBERMAN, L. M. Beneficial Microbes Affect Endogenous Mechanisms Controlling Root Development. **Trends in plant Science**, v. 21, p. 218-229, 2016.

WANG, L., Li, Y., JIN, X. *et al.* Floral transcriptomes reveal gene networks in pineapple floral growth and fruit development. **Commun Biol**, v. 3, l. 500, 2020.

WEBER, O. B.; VIDEIRA, S. S.; ARAÚJO, J. L. S. de. Identification of culturable endophytes in „Champaka“ pineapple grown in an organic system. **African Journal of Agricultural Research**. Vol. 8(26), p. 3422-3430, 2013.

YADAV, A. N.; YADAV, N. Stress-Adaptive Microbes for Plant Growth Promotion and Alleviation of Drought Stress in Plants. **Acta Scientific Agriculture**, v. 2 l. 6, 2018.

YADAV, A. N., VERMA, P., SINGH, B., CHAUAHAN, V. S, SUMAN, A SAXENA, A. K. Plant Growth Promoting Bacteria: Biodiversity and Multifunctional Attributes for Sustainable Agriculture. **Advances in Biotechnology & Microbiology**, v. 5 l. 5, 2017.



