SEÇÃO III - BIOLOGIA DO SOLO

SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO NO ABACAXIZEIRO CULTIVAR VITÓRIA DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO[1]

Lílian Estrela Borges Baldotto[2], Marihus Altoé Baldotto[3], Fábio Lopes Olivares[4], Alexandre Pio Viana[5] & Ricardo Bressan-Smith[5]

RESUMO

A propagação *in vitro* do abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merril) resulta na produção de uma grande quantidade de mudas sadias e homogêneas. Apesar dessas vantagens, a necessidade de um longo período de aclimatização onera essa prática agrícola. A aceleração do crescimento das plantas pela inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas e epifíticas pode ser útil para diminuir esse período. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de 20 estirpes de bactérias diazotróficas em sintetizar indol, solubilizar fosfato de Ca e óxido de Zn e atuar antagonicamente ao fungo fitopatogênico *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas*, bem como, posteriormente, avaliar o desempenho do abacaxizeiro 'Vitória' propagado por cultura de tecidos em resposta à inoculação bacteriana durante o período de aclimatização em casa de vegetação. Foram medidas as características de crescimento da parte aérea e do sistema radicular e o conteúdo de nutrientes de folhas do abacaxizeiro. Os resultados mostraram diferenças na capacidade das bactérias de sintetizar indol, solubilizar fosfato de Ca e óxido de Zn e atuar antagonicamente ao *Fusarium*. Foram também constatadas diferenças na capacidade das bactérias em promover o crescimento da parte aérea e do sistema radicular e o acúmulo de N, P, K, Ca e Mg em folhas do abacaxizeiro. A inoculação das bactérias diazotróficas selecionadas pode promover o crescimento das mudas durante o período de aclimatização, melhorando a adaptação do abacaxizeiro ao ambiente *ex vitro*.

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

---

[1] Parte da Tese de Doutorado da primeira autora. Recebido em junho de 2009 e aprovado em janeiro de 2010.

[2] Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF. Av. Alberto Lamego 2000, CEP 28013-602 Campos dos Goytacazes (RJ). E-mail: liborges@uenf.br

[3] Professor do Laboratório de Solos, UENF. E-mail: marihus@uenf.br

[4] Professor do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, UENF. E-mail: fabioliv@uenf.br

[5] Professor do Laboratório de Genética e Melhoramento de Plantas, UENF. E-mails: pirapora@uenf.br; bressan@uenf.br

SUMMARY: *SELECTION OF GROWTH-PROMOTING BACTERIA FOR PINEAPPLE 'VITÓRIA' DURING ACCLIMATIZATION*

*Pineapple (*Ananas comosus *L. Merrill) in vitro propagation results in the production of a large quantity of healthy and homogeneous plantlets. Despite these advantages, the long time required for acclimatization makes this agricultural practice too costly. Growth acceleration of plantlets by inoculation with endophytic and epiphytic diazotrophic bacteria may be useful to reduce this period. The objectives of this study were to evaluate the potential of 20 diazotrophic bacteria strains in synthesizing indole, solubilizing Ca phosphate and Zn oxide and acting against the fungus* Fusarium subglutinans *f. sp. ananas, and subsequently, evaluate the performance of pineapple 'Vitória' propagated by tissue culture in response to the application of these isolates during the acclimatization period in a greenhouse. Shoot and root growth characteristics and leaf nutrient content of pineapple were evaluated. Results showed differences in the ability of the bacteria strains to synthesize indole, solubilize Ca phosphate and Zn oxide and act against* Fusarium. *Differences in the growth-promoting capacity of the shoot and root system of bacteria and leaf accumulation of N, P, K, Ca and Mg in pineapple were also shown. Inoculation with diazotrophic bacteria can promote the growth of plantlets during the acclimatization period, improving the adaptation of pineapple to the* ex-vitro *environment.*

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

INTRODUÇÃO

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

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

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

Em relação ao uso de inoculantes, ainda são escassos os trabalhos com abacaxizeiros, porém é consenso que bactérias epifíticas, que habitam a superfície vegetal (Baldotto & Olivares, 2008), e as bactérias endofíticas, que habitam o interior dos tecidos vegetais (Halmann et al., 1997), podem promover o crescimento da planta hospedeira, conforme já descrito para diversas culturas, como arroz (Verma et al, 2001), soja (Cattelan et al., 1999; Kuklinsky-Sobral et al., 2004) e milho (Chabot et al., 1998). Os mecanismos de promoção de crescimento pelas bactérias epifíticas e endofíticas incluem diferentes ações, como a fixação biológica de nitrogênio (KuKlinsky-Sobral et al., 2004), solubilização de fosfatos (Chabot et al., 1998; Verma et al., 2001), biossíntese de fito-hormônios (Lucangeli & Bottini, 1997), influência na atividade enzimática da 1-aminociclopropano 1-carboxilato (ACC) deaminase (Rothballer at al., 2008), controle biológico (Byrne et al., 2005), síntese de sideróforos (Lacava et al., 2008) e indução de resistência sistêmica a patógenos na planta hospedeira (Kloepper et al., 1999).

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

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial das bactérias diazotróficas endofíticas e epifíticas isoladas de abacaxizeiro em sintetizar indol, solubilizar fosfato de Ca e óxidos de Zn e atuar antagonicamente ao fungo *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas in vitro*, bem como avaliar o efeito dos isolados bacterianos no crescimento da planta e acúmulo de nutrientes nas folhas do abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização em casa de vegetação.

MATERIAL E MÉTODOS

Tratamentos

Os 21 tratamentos foram constituídos por 20 isolados bacterianos e um controle, sem inoculação (Quadro 1). As estirpes usadas foram provenientes da coleção de bactérias do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, isoladas de plantas de *Ananas comosus* (L.) Merril cultivar Smooth Cayenne oriundas da área do Sistema Integrado de Produção Agroecológica, Embrapa Agrobiologia, município de Seropédica, RJ. Todas as bactérias são fixadoras de nitrogênio atmosférico, conforme verificado por Santos (2008), usando o método de redução de acetileno a etileno em cultura pura para avaliar a atividade da

Quadro 1. Tratamentos controle e de bactérias diazotróficas isoladas de *Ananas comosus* (L.) Merril cultivar Smooth Cayenne usados para estudos de promoção do crescimento de plântulas do abacaxizeiro 'Vitória'

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

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

enzima nitrogenase. Os isolados foram preservados em microtubos de plástico esterilizados contendo água destilada e autoclavada, em temperatura ambiente. As culturas para uso de rotina foram mantidas nos meios sólidos semiespecíficos (Quadro 1), em placas de Petri, a 5 ºC.

Identificação de bactérias produtoras de indol

As bactérias foram crescidas previamente em meio líquido DYGS (Döbereiner et al., 1995) por 24 h, a 30 ºC e 100 rpm. Alíquotas de 25 µL foram transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL dos meios DYGS e dos meios semiespecíficos (Quadro 1) com e sem adição de triptofano (100 mg L^{-1}) e incubadas no escuro por 72 h, a 30 ºC e 150 rpm. Para avaliação da síntese de indol (Sarwar & Kremer, 1995), 150 µL da cultura bacteriana foram transferidos para microplacas de poliestireno, sendo adicionados 100 µL do reagente de Salkowsky (1 mL de tricloreto de ferro hexa-hidratado ($FeCl_3.6H_2O$) – 0,5 mol L^{-1}, em 50 mL de ácido perclórico ($HClO_4$) – 35 % em água), seguido de incubação no escuro por 30 min. Após esse período, foram realizadas leituras em espectrofotômetro a 492 nm. A concentração de indol foi dosada com curva de calibração, relacionando absorbância e concentração de ácido indol acético (AIA) nos diferentes meios de cultivo. Foram realizadas três repetições para cada estirpe bacteriana que foi cultivada independentemente. Como controle, usou-se a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 (Radwan et al., 2005).

Identificação de bactérias solubilizadoras de óxido de Zn

As bactérias foram crescidas em meio líquido DYGS por 24 h, a 30 ºC e 100 rpm. Alíquotas de 2 µL das suspensões bacterianas foram colocadas em placas de Petri com meio de cultura sólido (Saravanan et al., 2003) contendo 10 g L^{-1} de glicose, 1 g L^{-1} de sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$), 0,2 g L^{-1} de cloreto de potássio (KCl), 0,1 g L^{-1} de fosfato de dipotássio (K_2HPO_4), 0,2 g L^{-1} de sulfato de magnésio hepta-hidratado ($MgSO_4.7H_2O$), 1,0 g L^{-1} de óxido de Zn (ZnO), 15 g L^{-1} de ágar, 1 L de água destilada a pH 7,0 e incubadas a 28 ºC por sete dias. A avaliação da solubilização de Zn foi realizada por meio da medição do diâmetro do halo translúcido que se forma em torno das colônias solubilizadoras de Zn. O diâmetro do halo foi medido com auxílio de um paquímetro digital e calculado por meio da fórmula: diâmetro do halo (mm) = diâmetro total – diâmetro da colônia. Foram realizadas três repetições para cada estirpe bacteriana. Como controle positivo, usou-se a bactéria *Pseudomonas* sp. (UENF 4158213).

Identificação de bactérias solubilizadoras de fosfato de cálcio

As bactérias foram crescidas em meio líquido DYGS por 24 h, a 30 ºC e 100 rpm. Alíquotas de 2 µL das soluções bacterianas foram colocadas em placas de Petri com meio de cultura sólido (Verma et al., 2001) contendo 10 g L^{-1} de glicose, 5 g L^{-1} de cloreto de amônio (NH_4Cl), 1 g L^{-1} de cloreto de sódio (NaCl), 1 g L^{-1} de sulfato de magnésio hepta-hidratado ($Mg\ SO_4.7H_2O$), 1,0 g L^{-1} de fosfato de Ca ($Ca_5(PO_4)_3OH$), 15 g L^{-1} de ágar, 1 L de água destilada a pH 7,0 e incubadas a 28 ºC por sete dias. A avaliação da solubilização de fosfato foi realizada por meio da medição do diâmetro do halo translúcido que se forma em torno das colônias bacterianas solubilizadoras. O diâmetro do halo foi medido com auxílio de um paquímetro digital e calculado por meio da fórmula: diâmetro do halo (mm) = diâmetro total – diâmetro da colônia. Foram realizadas três repetições para cada estirpe bacteriana. Como controle positivo, usou-se a bactéria *Pseudomonas* sp. (P07) (Cattelan et al., 1999).

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

O fungo *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* (UENF CF32), proveniente da coleção de fungos da Clínica Fitossanitária do Laboratório de Entomologia e Fitopatologia da UENF, foi isolado de frutos contaminados de abacaxizeiro, identificado por meio de microscopia óptica e armazenado em meio BDA (batata-dextrose-ágar) a 7 ºC (Dhingra & Sinclair, 1995). Para o ensaio *in vitro* de antagonismo, bactérias crescidas previamente em meio líquido DYGS por 24 h, a 30 ºC e 100 rpm foram transferidas para placas de Petri contendo os meios BDA e King B (King et al., 1954), de modo a formar uma circunferência de 5 cm de diâmetro de bactérias. Posteriormente, discos com crescimento fúngico de 3 mm de diâmetro foram colocados no centro da circunferência formada pelo crescimento bacteriano. As placas foram incubadas a 28 ºC por sete dias. A avaliação do antagonismo foi feita por meio da medição do diâmetro da colônia do fungo, com auxílio de um paquímetro digital. Foram realizadas três repetições para cada estirpe bacteriana. Placas contendo apenas o fungo foram usadas como controle.

Material vegetal

Plântulas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merril) cultivar Vitória (INCAPER, 2006) propagadas *in vitro*, em potes de vidro tipo *baby food*, foram fornecidas pelo Laboratório de Biotecnologia Biomudas e mantidas em meio MS descrito por Murashige & Skoog (1962), sem adição de reguladores de crescimento e vitaminas. As plântulas *in vitro* foram mantidas em sala de crescimento, com fluxo de fótons fotossintéticos de 25 µmol m^{-2} s^{-1}, temperatura de 25 ± 2 ºC e fotoperíodo de 16 h. Depois de três meses, as plântulas foram transferidas para novo meio, em tubos de ensaio. Para realização das etapas experimentais posteriores, foram selecionadas mudas com aproximadamente 1,5 g de matéria fresca, para receberem os diferentes tratamentos e serem aclimatizadas em casa de vegetação por um período de 150 dias.

Crescimento bacteriano e inoculação

As bactérias foram cultivadas em meio líquido DYGS por 24 h, 30 °C e 120 rpm, e a inoculação foi realizada pela imersão das plântulas de abacaxizeiro em 10 mL do meio bacteriano por 30 min, com posterior infestação do substrato com 10 mL do meio bacteriano (Mello et al., 2002). O controle foi imerso em meio líquido DYGS autoclavado. Posteriormente, as plântulas foram transferidas para vasos de 0,5 dm^3 contendo substrato Plantmax Hortaliças®, para serem aclimatizadas. Após o plantio, a cada 15 dias, todas as plantas receberam 5 mL de solução nutritiva (Hoagland & Arnon, 1950).

Análises de crescimento

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

Análises foliares

Após a secagem, as folhas de abacaxizeiro foram moídas em moinho do tipo Wiley acoplado a peneiras de 0,25 mm (60 mesh). Em seguida, o pó obtido foi submetido à digestão sulfúrica combinada com peróxido de hidrogênio e foram determinados os teores totais de N, P, K, Ca e Mg. Para N, foi utilizado o método de Nessler. O teor de P foi obtido por espectrofotometria de absorção molecular (colorimetria, no comprimento de onda de 725 nm), após reação com molibdato de amônio e ácido ascórbico. A determinação de K foi feita por fotometria de chama, e os teores de Ca e de Mg foram obtidos por espectrofotometria de absorção atômica. Todas as análises foram realizadas conforme os métodos usuais para a cultura do abacaxizeiro (Ramos et al., 2006). Os conteúdos de N, P, K, Ca e Mg foram calculados considerando a massa da matéria seca da parte aérea e o teor do nutriente correspondente.

Contagem bacteriana

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

Análises estatísticas

O experimento foi realizado no delineamento em blocos ao acaso, com 21 tratamentos (20 isolados bacterianos, um controle), três blocos, totalizando 189 unidades experimentais. Os dados foram submetidos à análise de variância e à análise multivariada por meio do programa GENES (Cruz, 2006), realizando-se a comparação entre os tratamentos via três métodos de agrupamento: o da ligação média entre grupos (UPGMA), o de Tocher e o das Variáveis Canônicas, com base na distância generalizada de Mahalanobis. Posteriormente, as médias dos grupos obtidos pelo método de Tocher foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 %. A contribuição relativa de cada característica para discriminação da variabilidade entre os tratamentos foi avaliada pelo método de Singh (1981).

RESULTADOS

As bactérias diferiram na capacidade de sintetizar indol, solubilizar óxido de Zn e fosfato de Ca e atuar antagonicamente ao fungo *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* (Quadro 2). Os maiores valores para a síntese de indol foram obtidos com o acréscimo de triptofano nos meios de cultivo DYGS e semiespecíficos. Quanto à solubilização de óxido de Zn, seis isolados formaram halo de solubilização, sendo a estirpe UENF 118501b a que apresentou os maiores valores. Dos 20 isolados bacterianos, 11 apresentaram a capacidade de solubilizar fosfato de Ca, sendo o maior halo formado pela estirpe UENF 114111. Para a atividade antagônica ao *Fusarium,* houve diferenças com relação não apenas aos isolados avaliados, mas também quanto aos meios de cultivo usados, sendo a estirpe UENF 114131 a que mostrou os maiores valores de inibição no meio BDA, com redução de 78 % no diâmetro da colônia fúngica em relação ao controle. No meio B de King, houve também inibição (51,29 %) por esse mesmo isolado. Por outro lado, na presença da estirpe UENF 114121, houve incrementos no diâmetro do fungo de aproximadamente 23 % em relação ao controle no meio BDA.

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

Tratamentos	Síntese de indol				Solubilização		Antagonismo ao *Fusarium* (diâmetro da colônia)	
	DYGS		Meios semiespecíficos [1]					
	Sem Triptofano	Com Triptofano	Sem Triptofano	Com Triptofano	Zinco (diâmetro do halo)	Fosfato	BDA	B de King
	μmol L^{-1}				mm			
1 Controle [2]	32,90 ± 3,60	153,76 ± 1,99	17,36 ± 2,81	24,63 ± 1,82	10,06 ± 1,02	6,90 ± 0,32	62,53 ± 0,67	67,78 ± 2,38
2 UENF 111111	3,66 ± 1,03	20,65 ± 4,36	3,50 ± 1,72	42,91 ± 6,82	-	6,31 ± 0,39	42,69 ± 3,47	47,56 ± 1,71
3 UENF 111221a	10,22 ± 0,70	36,61 ± 1,69	19,54 ± 0,84	54,98 ± 4,91	-	5,41 ± 0,51	15,93 ± 3,04	39,61 ± 0,99
4 UENF 111221b	13,12 ± 2,19	30,86 ± 3,03	18,90 ± 0,48	58,53 ± 11,42	-	-	39,88 ± 3,82	35,32 ± 0,42
5 UENF 111222	22,04 ± 1,08	28,60 ± 1,03	16,21 ± 1,04	66,76 ± 5,57	-	-	33,99 ± 2,82	48,26 ± 4,25
6 UENF 112531	3,21 ± 1,98	15,01 ± 1,45	4,26 ± 4,57	138,59 ± 10,24	-	-	48,51 ± 1,86	32,33 ± 1,17
7 UENF 114111	9,89 ± 1,63	12,26 ± 1,52	5,47 ±1,24	26,24 ± 2,23	-	7,63 ± 0,81	63,17 ± 5,47	50,03 ± 2,73
8 UENF 114112	3,76 ± 1,13	10,65 ± 0,32	9,26 ± 1,18	51,64 ± 7,24	-	7,28 ± 1,40	75,85 ± 1,60	52,07 ± 3,39
9 UENF 114121	14,19 ± 2,61	11,5 1 ± 0,43	7,29 ± 0,80	13,67 ± 4,07	-	6,94 ± 1,46	81,68 ± 1,60	63,90 ± 2,07
10 UENF 114131	5,38 ± 0,62	11,51 ± 0,28	7,89 ± 1,58	3,36 ± 4,55	-	5,87 ± 0,31	13,52 ± 0,90	33,01 ± 2,72
11 UENF 114132	3,12 ± 1,36	13,26 ± 0,16	7,44 ± 0,66	0,00 ± 0,66	-	6,48 ± 1,50	29,90 ± 2,70	56,82 ± 2,41
12 UENF 114511	34,46 ± 2,77	50,22 ± 1,90	1,36 ± 1,45	272,87 ± 17,41	10,08 ± 0,80	2,68 ± 0,11	35,62 ± 2,80	28,66 ± 0,31
13 UENF 117111	6,24 ± 1,65	12,26 ± 2,89	6,83 ± 1,79	0,03 ± 0,55	-	5,17 ± 0,45	27,35 ± 0,64	54,28 ± 1,76
14 UENF 117221	7,20 ± 1,75	20,75 ± 1,61	17,79 ± 1,83	25,16 ± 1,52	10,19 ± 1,21	-	61,58 ± 3,12	51,91 ± 3,78
15 UENF 117222a	8,60 ± 0,65	22,58 ± 1,48	14,14 ± 1,45	21,12 ± 3,10	10,68 ± 1,92	-	68,17 ± 2,87	66,58 ± 1,76
16 UENF 117222b	13,55 ± 4,03	36,88 ± 5,25	8,59 ± 0,88	20,25 ± 1,40	10,44 ± 1,43	-	63,25 ± 5,76	67,69 ± 2,77
17 UENF 118501a	2,58 ± 0,37	16,45 ± 1,34	7,74 ± 2,39	202,87 ± 17,54	-	-	60,54 ± 5,18	38,27 ± 1,90
18 UENF 118501b	3,66 ± 0,39	22,26 ± 0,37	0,49 ± 0,72	51,29 ± 18,65	11,22 ± 0,32	-	58,17 ± 0,68	46,56 ± 6,07
19 UENF 118502	3,44 ± 0,57	19,78 ± 5,74	0,00 ± 0,52	12,87 ± 1,41	-	-	48,74 ± 2,04	31,91 ± 1,03
20 UENF 118503a	3,98 ± 0,84	20,54 ± 1,63	0,00 ± 1,09	125,41 ± 41,16	-	-	64,42 ± 2,38	46,48 ± 1,84
21 UENF 118503b	9,25 ± 3,12	19,25 ± 2,97	0,00 ± 1,24	39,19 ± 1,82		5,41 ± 0,51	79,84 ± 1,00	68,91 ± 2,77

[1] Meios semiespecíficos: identificados no quadro 1. [2] Controle: para síntese de indol, *Herbaspirillum seropedicae* HRC54; para solubilização de Zn, *Pseudomonas* sp. (UENF 4158213); para solubilização de fosfato, *Pseudomonas* sp. (P07); para atividade antagônica ao *Fusarium,* placas com crescimento apenas do fungo.

Os isolados bacterianos também diferiram na capacidade de promover o crescimento e o acúmulo de nutrientes nas folhas do abacaxizeiro 'Vitória' durante o período de aclimatização. Na análise de agrupamento pelo método de otimização de Tocher, com base na dissimilaridade expressa pela distância generalizada de Mahalanobis (Quadro 3), houve a formação de sete grupos, cujas médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5 % (Quadro 4). O grupo I, formado pelo controle (1) e outros 10 tratamentos (3, 4, 2, 8, 17, 10, 18, 9, 6 e 5), apresentou, em média, os menores valores para as características de crescimento e nutricionais avaliadas (Quadro 4). Os outros seis grupos (II: 11, 15, 12, 13; III: 16, 19; IV: 20; V: 21; VI: 14; VII: 7) apresentaram estirpes que diferiram do controle e promoveram, em diferentes proporções, incrementos nas características de crescimento e nutricionais do abacaxizeiro. Para a produção de matéria seca da parte aérea, por exemplo, os grupos IV, V e VI apresentaram incrementos significativos de 48, 51 e 41 %, respectivamente, sobre o grupo I. O grupo V mostrou os maiores valores para as características nutricionais do abacaxizeiro 'Vitória', com incrementos de 193, 47, 58, 50 e 54 %, para os conteúdos foliares de N, P, K, Ca e Mg, respectivamente, sobre o grupo I. O grupo VII apresentou, também, incremento significativo para o conteúdo de P: 41 % sobre o grupo I. Quanto aos conteúdos de K, Ca e Mg, os grupos IV e VI também proporcionaram incrementos significativos sobre o grupo I.

O agrupamento realizado pelo método da ligação média entre grupos (UPGMA), com base nas distâncias generalizadas de Mahalanobis, pode ser observado no dendrograma da similaridade entre os tratamentos (Figura 1), onde as distâncias foram

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

Grupo	Tratamento [1]
I	3, 4, 2, 8, 17, 10, 18, 9, 6 ,5,1
II	11, 15, 12, 13
III	16, 19
IV	20
V	21
VI	14
VII	7

[1] Tratamentos: tratamentos identificados no quadro 1.

Quadro 4. Características de crescimento da parte aérea, do sistema radicular e do conteúdo de nutrientes do abacaxizeiro 'Vitória' em resposta à inoculação de bactérias diazotróficas epifíticas e endofíticas dos grupos formados pelo método de Tocher

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

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

convertidas em percentagens e a maior distância (57,13) foi considerada como 100 %. Com base em uma linha de corte a 50 % de distância, foram formados cinco grupos. O grupo I incluiu o controle (1) e 11 tratamentos (3, 4, 2, 8, 17, 10, 18, 9, 5, 6, 12), contendo estirpes que apresentaram os menores desempenhos na promoção de crescimento das plantas. Os outros quatro grupos (II: 16, 19, 20; III: 21; IV: 11, 15, 13, 14; V: 7) foram formados por estirpes que diferiram do controle e promoveram incrementos no crescimento e no conteúdo de nutrientes foliares do abacaxizeiro 'Vitória' durante a aclimatização.

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

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

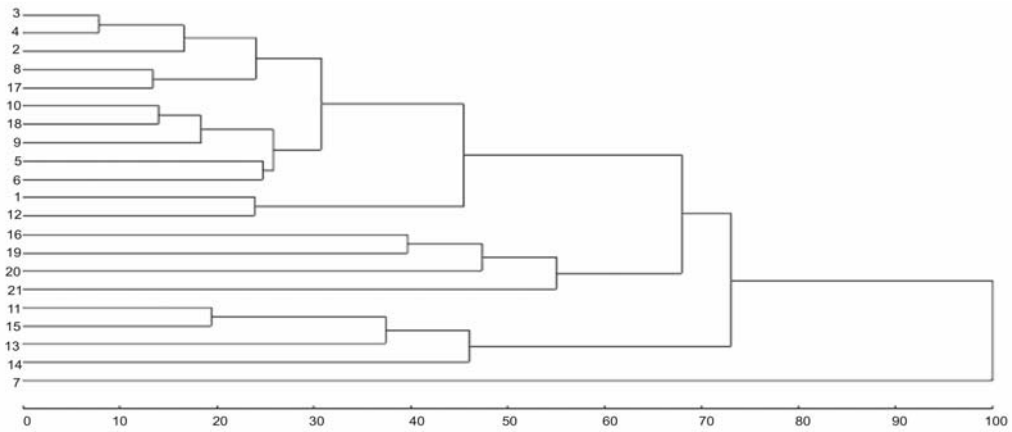

Figura 1. Dendrograma da similaridade entre os 21 tratamentos (Quadro 1), obtidos pelo método da ligação média entre grupos (UPGMA), com base na distância generalizada de Mahalanobis.

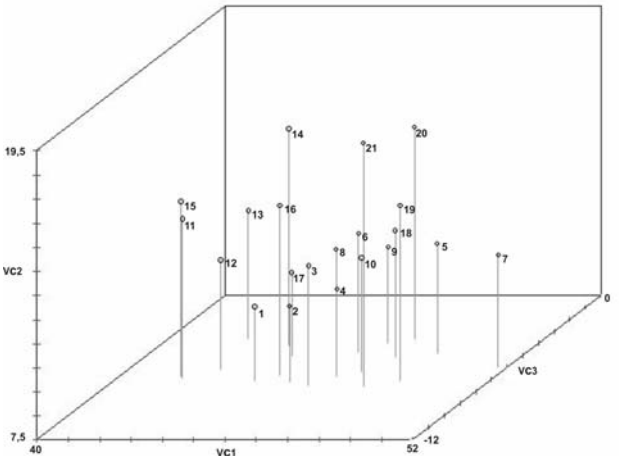

Figura 2. Gráfico de dispersão em relação às três primeiras variáveis canônicas (VC1, VC2 e VC3).

Com relação ao nível populacional de bactérias diazotróficas inoculadas nas plântulas de abacaxizeiro, verificou-se aumento entre uma a três unidades logarítmicas na população de bactérias, principalmente no tecido radicular (Figura 3). Ao final do experimento, plantas não inoculadas abrigavam uma população natural de bactérias diazotróficas na matéria fresca vegetal entre 10^3 e 10^4 células g^{-1}.

DISCUSSÃO

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

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

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

[1] Parte aérea: NF: número de folhas; ALT: altura; DR: diâmetro da roseta; DC: diâmetro do caule; MFPA: matéria fresca da parte aérea; MSPA: matéria seca da parte aérea; AF: área foliar. [2] Sistema radicular: MFR: matéria fresca da raiz; MSR: matéria seca da raiz; RPA: razão entre raiz e parte aérea; AR: área radicular. [3] Conteúdo de nutrientes: N, P, K, Ca e Mg.

A promoção de crescimento do abacaxizeiro pela inoculação das bactérias endofíticas e epifíticas pode ser, em parte, atribuída à fixação biológica de nitrogênio, como observado para a estirpe UENF 118503b (grupo V), que incrementou em 193 % o conteúdo foliar de N quando comparado ao grupo I, que continha o controle (Quadro 4). Contudo, outros mecanismos podem estar envolvidos, como a

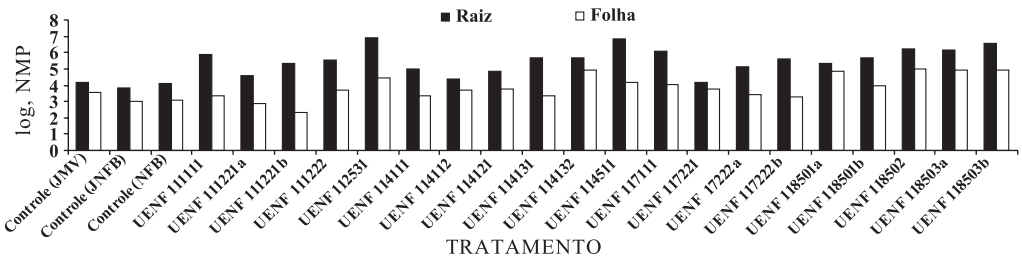

Figura 3. Log do Número Mais Provável (NMP) de bactérias por grama de raiz e de folha D do abacaxizeiro 'Vitória' em resposta à inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas e epifíticas.

biossíntese de fito-hormônios da classe das auxinas, a exemplo do ácido indol acético (AIA), uma vez que as estirpes diferiram na capacidade de sintetizar indol. As auxinas são substâncias que em baixas concentrações, variando de μmol L^{-1} a nmol L^{-1}, promovem o crescimento das plantas, estimulando a atividade da bomba eletrogênica H^+-ATPase de membrana plasmática (Hager et al., 1991), resultando nos eventos de expansão celular e de ativação de transportadores secundários em membranas celulares (Sondergaard et al., 2004).

A biossíntese de auxinas por bactérias acontece por diferentes rotas metabólicas (Spaepen et al., 2007), sendo o triptofano o principal precursor para a síntese de AIA – fato que explica os mais altos valores de indol detectados nos meios de cultivo que tiveram acréscimo de triptofano em relação aos que não o continham (Quadro 2). A biossíntese de fito-hormônios parece ser uma habilidade comum às bactérias diazotróficas, tem sido relatada em estirpes pertencentes aos gêneros *Azotobacter* (Martínez-Toledo et al., 1988), *Rhizobium* (Badenoch-Jones et al., 1982), *Azospirillum* (Martínez-Morales et al., 2003), *Gluconacetobacter* e *Herbaspirillum* (Bastián et al., 1998). No entanto, as respostas fenotípicas da planta hospedeira aos fito-hormônios sintetizados por bactérias ainda permanecem ambíguas (Spaepen et al., 2007). Uma das respostas da planta ao AIA sintetizado por bactérias é o crescimento das raízes, como constatado em estudos realizados com *Azospirillum* (Dobbelaere et al., 1999). Entretanto, segundo Bashan & Holguin (1997), somente esse mecanismo não explicaria os incrementos no crescimento da planta hospedeira inoculada com *Azospirillum*, sendo esse o resultado da atuação concomitante de múltiplos mecanismos, como a fixação biológica de N_2 e a biossíntese de fito-hormônios.

As bactérias isoladas de abacaxizeiro possuem não apenas a capacidade de fixação biológica de N_2, mas também diferem na habilidade de sintetizar indol, solubilizar óxido de Zn e fosfato de Ca e atuar antagonicamente ao fungo fitopatogênico *Fusarium* (Quadro 2), podendo, potencialmente, ser usadas na formulação de inoculantes, biofertilizantes e biopesticidas. Observou-se que as bactérias diazotróficas interagiram com o *Fusarium*: algumas promovendo a inibição e outras estimulando o crescimento fúngico. Esse fato aponta para a necessidade prévia de estudos de seleção de bactérias e o entendimento dos mecanismos da interação e não o uso empírico da microbiota nos sistemas de cultivo. A intensificação do uso dessas bactérias promotoras de crescimento e proteção de plantas dependerá, em parte, de sua ecologia, da interação solo-planta-microbiota e de programas de isolamento e seleção microbiana (Okon & Labandera-Gonzales, 1994).

Das 20 estirpes avaliadas quanto ao potencial de promover o crescimento e o acúmulo de nutrientes foliares nas plântulas de abacaxizeiro 'Vitória', quatro – UENF 118503b, UENF 118503a, UENF 117221 e UENF 114111 destacaram-se (Quadro 4) e foram selecionadas para estudos subseqüentes, envolvendo a formulação de um insumo biológico. A dissimilaridade entre os tratamentos foi calculada por meio da distância generalizada de Mahalanobis, apresentando como vantagem o fato de considerar a correlação entre os caracteres avaliados (Cruz et al., 2004). Posteriormente, foram usados métodos de agrupamento, como o hierárquico (UPGMA), para estudar as ramificações entre os tratamentos (Figura 1), e também o de otimização de Tocher (Quadro 3), que parte da premissa de que a média das medidas de dissimilaridade dentro de cada grupo deve ser menor que as distâncias médias entre grupos (Cruz et al., 2004). Usou-se também a análise de variáveis canônicas (Quadro 5), que leva em consideração a matriz de covariâncias residuais e fenotípicas dos caracteres avaliados (Cruz et al., 2004), para avaliar a similaridade entre os tratamentos (Figura 2). Essas análises multivariadas foram concordantes entre si e possibilitaram concluir que as bactérias inoculadas mostraram divergências na promoção do crescimento e do acúmulo de nutrientes nas plântulas de abacaxizeiro durante a aclimatização.

As contribuições relativas das características de crescimento da parte aérea, do sistema radicular e do conteúdo de nutrientes nas folhas do abacaxizeiro 'Vitória' inoculado com bactérias diazotróficas para discriminação da variabilidade entre os tratamentos (Quadro 5) foram estimadas pelo método de Singh (1981). As variáveis que mais contribuíram para discriminar a variabilidade entre os tratamentos foram a produção de matéria seca da parte aérea, a produção de matéria seca da raiz e o conteúdo foliar de K. Já as que menos contribuíram foram a área radicular e a altura das plantas. Descartando essas duas variáveis e fazendo uma nova análise pelo método de Tocher, não houve alteração dos grupos formados, sugerindo que o não uso dessas variáveis neste trabalho com plântulas de abacaxizeiro não levaria à perda de informação.

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

No presente trabalho foi avaliado o potencial dos isolados bacterianos em sintetizar indol, solubilizar fosfatos de Ca e óxidos de Zn e atuar antagonicamente ao *Fusarium*. Posteriormente, usou-se a análise multivariada para agrupar os 21 tratamentos, gerando critérios para selecionar as estirpes promissoras com base na média dos grupos formados para as características de crescimento e do estado nutricional do abacaxizeiro. Os resultados apontam

para a possibilidade de uso de bactérias diazotróficas na promoção do crescimento das plântulas propagadas *in vitro* de abacaxizeiro durante a fase de aclimatização, o que pode representar uma alternativa importante para a redução de custos de produção com base na maior eficiência nutricional e de crescimento.

CONCLUSÕES

1. As bactérias diazotróficas diferem na capacidade de sintetizar indol, solubilizar óxido de Zn e fosfato de Ca e atuar antagonicamente ao fungo *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas, in vitro*.

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

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

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

AGRADECIMENTOS

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

LITERATURA CITADA

BADENOCH-JONES, J.; SUMMONS, R.E. & DJORDJEVIC, M.A. Mass spectrometric quantification of indole-3-acetc acid in *Rhizobium* culture supernatants: Relation to root hair curling and nodule initiation. Appl. Environ. Microbiol., 44:275-280, 1982.

BALDOTTO, L.E.B.; BALDOTTO, M.A.; GIRO, V.B.; CANELLAS, L.P.; OLIVARES, F.L. & BRESSAN-SMITH, R. Desempenho do abacaxizeiro 'Vitória' em resposta à aplicação de ácidos húmicos durante a aclimatação. R. Bras. Ci. Solo, 33:979-990, 2009.

BALDOTTO, L.E.B. & OLIVARES, F.L. Phylloepiphytic interaction between bacteria and different plant species in a tropical agricultural system. Can. J. Microbiol., 54:918-31, 2008.

BARBOZA, S.B.S.C.; GRACIANO RIBEIRO, D.; TEIXEIRA, J.B.; PORTES, T.A. & SOUZA, L.A.C. Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. Pesq. Agropec. Bras., 41:185-194, 2006.

BASHAN, Y. & HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: Environmental and physiological advances (1990-1996). Can. J. Microbiol., 43:103-121,1997.

BASTIAN, F.; COHEN, A.; PICCOLI, P.; LUNA, V.; BARALDI, R. & BOTTINI, R. Production of indole-3-butyric acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. Plant Growth Regul., 24:7-11, 1998.

BYRNE, J.M.; DIANESE, A.C.; JI, P.; CAMPBELL, H.L.; CUPPELS, D.A.; LOUWS, F.J.; MILLER, S.A.; JONES, J.B. & WILSON, M. Biological control of bacterial spot of tomato under field conditions at several locations in North America. Biol. Control, 32:408-418, 2005.

CATTELAN, A.J.; HARTEL, P.G. & FUHRMANN, J.J. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. Soil Sci. Soc. Am. J., 63:1670-1680, 1999.

CATUNDA, P.E.A.; MARINHO, C.S.; GOMES, M.M.A. & CARVALHO, A.J.C. Brassinosteróide e substratos na aclimatização do abacaxizeiro 'Imperial'. Acta Sci. Agron., 30:345-352, 2008.

CHABOT, R.; BEAUCHAMP, C.J.; KLOEPPER, J.W. & ANTOUN, H. Effect of phosphorous on root colonization and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. Soil Biol. Biochem., 30:1615-1618, 1998.

CRUZ, C.D.; REGAZZI, A.J. & CARNEIRO, P.C.S. Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético, Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 2004. 480p.

CRUZ, C.D. Programa GENES: Simulação e análise multivariada. Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 2006. 389p.

DHINGRA, O.D. & SINCLAIR, J.B. Basic plant pathology methods. 2.ed. Boca Raton, CRC Press, 1995. 434p.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGHS, A.; THYS, A.; BROEK, A.V. & VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasiliense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. Plant Soil, 212:155-164, 1999.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D. & BALDANI, J.I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Seropédica, Embrapa Agrobiologia, 1995. 66p.

FAO. (2007). Disponível em: <http://www.faostat.fao.org> - Acesso em 8 de junho de 2009.

HAGER, A.; DEBUS, G.; EDEL, H.G.; STRANSKY, H. & SERRANO, R. Auxin induces exocytosis and rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane H^+-ATPase. Planta, 185:527-537, 1991.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F. & KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. Can. J. Microbiol., 43:895-914, 1997.

HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. The water culture method of growing plants without soil. Berkeley, University of California, 1950. 32p.

INSTITUTO CAPIXABA DE PESQUISA, ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL. INCAPER. 'Vitória' nova cultivar de abacaxi resistente a fusariose. Vitória, 2006. (Documento, 148, DCM-Incaper)

KING, E.O.; WARD, M.K. & RANEY, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. J. Lab. Clin. Med., 44:301-304, 1954.

KLOPPER, J.W.; RODRIGUEZ-UBANA, R.; ZEHNDER, G.W.; MURPHY, J.F.; SIKORA, E. & FERNÁNDEZ, C. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. Austr. Plant Pathol., 28:21-26, 1999.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W.L.; MENDES, R.; GERALDI, I.O.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. & AZEVEDO, J.L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. Environ. Microbiol., 6:1244-1251, 2004.

LACAVA, P.T.; SILVA-STENICO, M.E.; ARAÚJO, W.L.; SIMIONATO, A.V.C.; CARRILHO, E.; TSAI, S.M. & AZEVEDO, J.L. Detection of siderophores in endophytic bacteria *Methylobacterium spp.* associated with *Xylella fastidiosa* subsp. pauca. Pesq. Agropec. Bras., 43:521-528, 2008.

LUCANGELI, C. & BOTTINI, R. Effects of *Azospirillum spp.* on endogenous gibberellin content and growth of maize (*Zea mays* L.) treated with uniconazole. Symbiosis, 23:63-72, 1997.

MARTÍNEZ-MORALES, L.J.; SOTO-URZÚA, L.; BACA, B.E. & SÁNCHEZ-AHÉDO, J.A. Indole-3-butyric acid (IBA) production in culture medium by wild strain *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol. Lett., 228:167-173, 2003.

MARTÍNEZ-TOLEDO, M.V.; SALMERON, V. & GONZALEZ, J. Root exudates of *Zea mays* and production of auxins, gibberellins and cytokinins by *Azotobacter chroococum*. Plant Soil, 110:149-152, 1988.

MELLO, M.R.F.; MARIANO, R.L.R.; MENEZES, M.; CÂMARA, T.R. & ASSIS, S.M.P. Seleção de bactérias e métodos de bacterização de crescimento em mudas de abacaxizeiro micropropagadas. Summa Phytopathol., 28:222-228, 2002.

MURASHIGUE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plantarum, 15:473-497, 1962.

OKON, Y. & LABANDERA-GONZALEZ, C.A. Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biol. Biochem., 26:1591-1601, 1994.

RADWAN, T.E.E.; MOHANMED, Z.K. & REIS, V.M. Aeração e adição de sais na produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas. Pesq. Agropec. Bras., 40:997-1004, 2005.

RAMOS, M.J.M.; MONNERAT, P.H.; CARVALHO, A.J.C.; PINTO, J.L.A. & SILVA, J.A. Nutritional deficiency in 'Imperial' pineapple in the vegetative growth phase and leaf nutrient concentration. Acta Hortic., 702:133-139, 2006.

ROTHBALLER, M.; ECKERT, B.; SCHMID, M.; FEKETE, A.; SCHLOTER, M.; LEHNER, A.; POLLMANN, S. & HARTMANN, A. endophytic root colonization of gramineous plants by *Herbaspirillum frisingense*. FEMS Microbiol. Ecol., 65:85-95, 2008.

SANTOS, S.T. Biogeografia de bactérias culturáveis associadas às fruteiras tropicais. Campos dos Goytacazes, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2008. 105p. (Tese de Doutorado)

SARAVANAN, V.S.; SUBRAMONIAM, S.R. & RAJ, S.A. Assessing in vitro solubilization potential of different zinc solubilizing bacterial (zsb) isolates. Braz. J. Microbiol., 34:121-125, 2003.

SARWAR, M. & KREMER, R.J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. Plant Soil, 172:261-269, 1995.

SINGH, D. The relative importance of characters affecting genetic divergence. Indian J. Genet. Plant Breed., 41:237-245, 1981.

SONDEGAARD, T.E.; SCHULZA, A. & PALMGREN, M.G. Energization of transport processes in plants. Roles of plasma membrane H^+-ATPase. Plant Physiol., 136:2475-2482, 2004.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. & REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. FEMS Microbiol. Rev., 31:425-448, 2007.

TAPIA-HERNÁNDEZ, A.; BUSTILLOS-CRISTALES, M.R.; JIMÉNEZ-SALGADO, T.; CABALLERO-MELLADO, J. & FUENTES-RAMÍREZ, L.E. Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. Microbial. Ecol., 39:49-55, 2000.

TEIXEIRA, J.B.; CRUZ, A.R.R.; FERREIRA, F.R. & CABRAL, J.R. Biotecnologia aplicada à produção de mudas: Produção de mudas micropropagadas de abacaxi. Biotecnol. Ci. Desenv., 3:42-47, 2001.

VERMA, S.C.; LADHA, J.K. & TRIPATHI, A.K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. J. Biotechnol., 91:127-141, 2001.

VIANA, A.P.; PEREIRA, T.N.; PEREIRA, M.G.; SOUZA, M.M.; MALDONADO, J.F.M. & AMARAL JÚNIOR, A.T. Genetic diversity in yellow passion fruit populations. Crop Breed. Appl. Biotechnol., 6:87-94, 2006.

WEBER, O.B.; TEIXEIRA, K.R.S.; KIRCHHOF, G.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. Plant Soil, 210:103-113, 1999.

WEBER, O.B.; CORREIA, D.; SILVEIRA, M.R.S.; CRISÓSTOMO, L.A.; OLIVEIRA, E. M. & SÁ, E.G. Efeito da bactéria diazotrófica em mudas micropropagadas de abacaxizeiros Cayenne Champac em diferentes substratos. Pesq. Agropec. Bras., 38:689-696, 2003.