

**MARCELO RODRIGUES FIGUEIRA DE MELLO**

**EFEITO DE BACTÉRIAS NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E  
NO BIOCONTROLE DA FUSARIOSE EM MUDAS DE ABACAXI  
MICROPROPAGADAS**

**RECIFE  
PERNAMBUCO-BRASIL  
SETEMBRO - 2001**

**MARCELO RODRIGUES FIGUEIRA DE MELLO**

**EFEITO DE BACTÉRIAS NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E  
NO BIOCONTROLE DA FUSARIOSE EM MUDAS DE ABACAXI  
MICROPROPAGADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fitossanidade, Área de Concentração: Fitopatologia.

**RECIFE  
PERNAMBUCO-BRASIL  
SETEMBRO - 2001**

**EFEITO DE BACTÉRIAS NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E  
NO BIOCONTROLE DA FUSARIOSE EM MUDAS DE ABACAXI  
MICROPROPAGADAS**

**MARCELO RODRIGUES FIGUEIRA DE MELLO**

**COMITÊ DE ORIENTAÇÃO**

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosa de Lima Ramos Mariano (Orientadora)**

**Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Maria Menezes (Co-orientadora)**

**Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Terezinha Rangel Câmara (Co-orientadora)**

**RECIFE  
PERNAMBUCO-BRASIL  
SETEMBRO – 2001**

Catálogo na Fonte  
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFRPE

M527e Mello, Marcelo Rodrigues Figueira de  
Efeito de bactérias na promoção de crescimento  
e no biocontrole da fusariose em mudas de abacaxi  
micropropagadas / Marcelo Rodrigues Figueira de  
Mello; orientadora Rosa de Lima Ramos Mariano.  
- Recife : O Autor , 2001. 94 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade  
Federal Rural de Pernambuco. Fitossanidade  
(Área de Concentração : Fitopatologia).  
Inclui anexo e bibliografia.

CDD 632.3

CDU 632.4

1. FITOPATOLOGIA
2. BACTÉRIA
3. PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO
4. BIOCONTROLE
5. FUSARIOSE
6. ABACAXI
7. MUDAS MICROPROPAGADAS
- I. Mariano, Rosa de Lima Ramos
- II. Título

**MARCELO RODRIGUES FIGUEIRA DE MELLO**

**EFEITO DE BACTÉRIAS NA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E  
NO BIOCONTROLE DA FUSARIOSE EM MUDAS DE ABACAXI  
MICROPROPAGADAS**

**APROVADA:**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Menezes (UFRPE)

---

Prof. Dr. Delson Laranjeira (UFRPE)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Uided Maaze Tiburcio Cavalcante (UFRPE)

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosa de Lima Ramos Mariano  
(Orientadora)

À meus pais, por me ajudarem nos momentos  
mais difíceis da minha vida.

***DEDICO***

A todos que me ajudaram nesta árdua  
jornada com dedicação e companheirismo.

***OFEREÇO***

*"O único homem que nunca comete erros é aquele que nunca faz coisa alguma. Não tenha medo de errar, pois você aprenderá a não cometer duas vezes o mesmo erro."*

***Roosevelt***

*Aquele que toma a realidade  
e dela faz um sonho,  
é um poeta, um artista.  
Artista e poeta será também  
aquele que do sonho fizer uma realidade.*

***Malba Tahan***

## AGRADECIMENTOS

A Deus, a minha perseverança, e aos amigos por terem me dado coragem e determinação para superar as dificuldades e alcançar o meu objetivo;

À Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, pelas oportunidades no decorrer da minha formação profissional;

À professora Rosa de Lima Ramos Mariano, pelo amor, carinho, amizade, paciência, ensinamentos de vida e dedicada orientação em todos os momentos;

À professora Maria Menezes, pela sua amizade, bom humor, tranqüilidade nos momentos mais difíceis e valiosas contribuições acadêmicas;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco;

Aos professores do Curso de Mestrado em Fitossanidade pelos conhecimentos transmitidos, em especial à professora Sônia Maria Alves de Oliveira;

Aos grandes amigos e amigas, Ana Júlia, Valéria, Simone, Sandra, Seelig, Flávio, Adriana, Val, Dário, Gil, Daniela, Elias, Kércya, Iale, Peruch, Domingos, Arlinda, Luciana, Alice, Darcy, Lili, Andréa e Lilian pela amizade e colaboração;

As super poderosas amigas, Andréa, Elineide, Sayonara e Viviane;

A Patrícia pelo apoio nos momentos finais da minha árdua caminhada;

A minha pequena, porém, grande amiga dos olhos azuis, Ivanise, pela amizade, carinho, compreensão e alegria em todos os momentos;

À turma do Mestrado: Roberto, a dengosa Sandra, Daniel, Paulo, Marcos, Suêrda, Maria e Gilson pelo apoio, amizade e agradável convívio em todos os momentos;

Aos amigos conquistados durante o curso, pelos bons momentos de convivência;

E a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização de mais uma etapa da minha vida.

## SUMÁRIO

	Páginas
AGRADECIMENTOS.....	vi
SUMÁRIO.....	viii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
Capítulo I - INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
Capítulo II – SELEÇÃO DE BACTÉRIAS E MÉTODOS DE BACTERIZAÇÃO PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE MUDAS DE ABACAXI MICROPROPAGADAS.....	19
RESUMO .....	20
ABSTRACT.....	22
INTRODUÇÃO.....	23
MATERIAL E MÉTODOS.....	25
RESULTADOS.....	30
DISCUSSÃO.....	32
AGRADECIMENTOS.....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
Capítulo III – EFEITO DE BACTÉRIAS SOBRE A FUSARIOSE EM MUDAS DE ABACAXI MICROPROPAGADAS.....	55
RESUMO .....	56
ABSTRACT.....	58
INTRODUÇÃO.....	59

MATERIAL E MÉTODOS.....	62
RESULTADOS.....	68
DISCUSSÃO.....	70
AGRADECIMENTOS.....	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
CONCLUSÕES GERAIS.....	90
ANEXOS .....	92

## RESUMO

A micropropagação do abacaxizeiro é importante pela qualidade e quantidade das mudas produzidas as quais, após 5 a 10 meses de aclimação, serão levadas ao campo, onde estarão expostas a fatores adversos entre os quais, pragas e doenças. A fusariose causada por *Fusarium subglutinans* pode causar perdas de até 80% nos frutos e 20% nas mudas. Bactérias promotoras de crescimento têm sido utilizadas tanto para acelerar o desenvolvimento de plantas micropropagadas como no controle biológico de doenças. Os objetivos deste estudo foram selecionar um método de bacterização e isolados bacterianos eficientes para promoção de crescimento de mudas de abacaxi micropropagadas, de modo a aumentar a biomassa das plantas e reduzir o período de aclimação; testar misturas dos isolados na promoção de crescimento e determinar os mecanismos de ação envolvidos nessa promoção; bem como, estudar o efeito de bactérias sobre a fusariose em mudas micropropagadas e os mecanismos de ação envolvidos nessa proteção. Dentre os métodos de bacterização testados, imersão de raízes + infestação do substrato e imersão de raízes foram os mais eficientes, sendo escolhido o segundo pela maior praticidade. Dentre os isolados testados, os mais eficientes foram C210 (*Bacillus cereus*), ENF16 (*B. pumilus*), RAB9 (*Bacillus* sp.) e ENF10 (*B. thuringiensis* subvar. *kurstakii*). Aumentos de 163,6%, 107,7% e 87,0% foram obtidos pelo isolado RAB9 aplicado pela imersão de raízes, respectivamente, para matéria seca da parte aérea, matéria seca das raízes e área foliar 30 dias após a bacterização. Todos os isolados selecionados foram compatíveis e as misturas entre os isolados ENF10+RAB9, ENF16+C210 e C210+RAB9 induziram aumentos de, respectivamente 100%, 88,1% e 80,1%, para matéria seca das raízes. Não foi observada a produção de ácido indolacético, ácido cianídrico ou solubilização de fosfatos pelos isolados bacterianos, nas condições experimentais utilizadas. O nitrogênio foi o

único macronutriente cujo teor diferiu significativamente ( $P=0,05$ ) entre as mudas bacterizadas e testemunhas. No estudo do efeito de bactérias sobre a fusariose do abacaxizeiro, utilizando-se a imersão de raízes, os isolados ENF12 (não identificado), C21 (*Bacillus* sp.), C11 (*Bacillus* sp.), ENF14 (*Enterobacter cloacae*), C210 e IN937A (*Pseudomonas chlororaphis*) diferiram significativamente ( $P=0,05$ ) da testemunha com relação às notas atribuídas para cada planta. ENF12, C21 e benomil reduziram a severidade da doença em 85,2; 79,1 e 88,0% respectivamente, em relação a testemunha. No experimento utilizando a pulverização dos biocontroladores em folhas destacadas, EN5 (*Alcaligenes piechaudii*) diferiu significativamente ( $P=0,05$ ) da testemunha quanto ao índice de doença, reduzindo a severidade em 90,2%. No experimento, utilizando a pulverização dos biocontroladores em plantas, apenas ENF14 diferiu significativamente ( $P=0,05$ ) da testemunha, reduzindo a severidade da doença em 55,6; 39,4 e 68,4 considerando, respectivamente, índice de doença para lesões foliares, número de folhas infectadas e índice de doença para sintomas internos. Nenhum isolado bacteriano produziu celulase, pectinase ou HCN. No entanto, C210, R14 (*B. subtilis*), ENF19 (não identificado), ENF14, C11 e C21 inibiram o crescimento do patógeno “in vitro” por antibiose. Na competição por ferro foi demonstrado que o isolado EN5 apresentou reversão da inibição do crescimento micelial do patógeno no nível de 20 ppm de  $FeCl_3$ . Concluiu-se que: (i) misturas dos isolados C210, ENF16, RAB9 e ENF10 aplicadas pela imersão de raízes, podem promover o aumento de biomassa de mudas de abacaxi micropropagadas, reduzindo a fase de aclimação; (ii) o isolado *E. cloacae* ENF14 é um potencial biocontrolador para a fusariose do abacaxizeiro, recomendando-se testes com misturas dos isolados ENF14, EN5, C210 e C21 que agem por mecanismos distintos, utilizando-se a bacterização por pulverização das folhas.

Palavras-chave adicionais: aclimação, *Ananas comosus*, biomassa, bactérias promotoras de crescimento de plantas, BPCP, controle biológico, *Fusarium subglutinans*, mecanismos de ação de bactérias.

### ABSTRACT

Pineapple micropropagation is important due to the quality and quantity of the plantlets produced. After an acclimation period of 5 to 10 months, plantlets are read for planting in field where they will be exposed to several adverse factors including pests and diseases. The fusariosis caused by *Fusarium subglutinans* may cause losses as high as 80 and 20%, respectively in fruits and plantlets. Plant growth-promoting rhizobacteria have been used to increase development of micropropagated plantlets and for disease biological control. This study aimed to select a bacterization method and bacterial isolates that could efficiently promote growth of micropropagated pineapple plantlets cv. Pérola, increasing biomass and reducing the acclimation period; to test mixtures of isolates efficient in the growth-promotion and to determine their mechanisms of action; and to study the effect of bacteria on the fusariosis in micropropagated plantlets and the mechanisms involved in this protection. Overall the best methods were root dipping + soil drenching and root dipping the second being chosen due to its practicability. The most efficient bacterial strains were C210 (*B. cereus*), ENF16 (*B. pumilus*), RAB9 (*Bacillus* sp.) e ENF10 (*B. thuringiensis* subvar. *kurstakii*). Increases as high as 163.6%, 107.7% and 87.0% were obtained by RAB9 applied by root dipping, respectively for shoot dry weight, root dry weigh and leaf area thirty days after bacterization. All strains showed compatibility and combination of ENF10+RAB9, ENF16+C210 and C210+RAB9 induced respectively 100%, 88.1% and 80.1%, for root dry weight. Productions of IAA, HCN or phosphate solubilization were not detected for any of the bacterial isolates under the experimental conditions here utilized.

Only nitrogen amounts in bacterized plantlets significantly differ ( $P=0,05$ ) from the controls. In the study of the influence of bacterial isolates on the pineapple fusariosis by using root dipping the isolates ENF12 (not identified), C21 (*Bacillus* sp.), C11 (*Bacillus* sp.), ENF14 (*Enterobacter cloacae*), C210 and IN937A (*Pseudomonas chlororaphis*) significantly differ ( $P=0,05$ ) from the control in relation to disease grade averages. ENF12, C21 and benomyl showed disease severity reduction of 85.2; 79.0 and 88.0% respectively, in relation to control without treatment. In the experiment using bacteria to spray detached leaves, disease index was significantly reduced ( $P=0,05$ ) by EN5 (*Alcaligenes piechaudii*) which promoted disease severity reduction of 90.2%. In the experiment spraying bacteria onto attached leaves, only ENF14 significantly ( $P=0,05$ ) reduced the disease severity in 55.6; 39.4 and 68.4 % respectively in relation to foliar symptoms, number of infected leaves and internal symptoms. None of the bacterial isolates produced cellulase, pectinase or HCN. However C210, R14 (*B. subtilis*), ENF19 (not identified), ENF14, C11 and C21 inhibited the pathogen growth “in vitro” by antibiosis. In relation to iron competition the isolate EN5 showed reversion of inhibition of the pathogen mycelial growth at 20 ppm of  $FeCl_3$ . The conclusions are: (i) mixtures of the strains C210, ENF16, RAB9 and ENF10 applied by root dipping are able to increase biomass production of micropropagated pineapple plantlets, reducing the acclimation period; (ii) *E. cloacae* ENF14 is a potential biocontroler for pineapple fusariosis. However experiments by leaf spraying with mixtures of isolates ENF14, EN5, C210 e C21 that act by distinct mechanisms are recommended.

Additional keywords: acclimation, *Ananas comosus*, biomass, biological control, *Fusarium subglutinans*, mechanisms of action of bacteria, PGPR, plant growth-promoting rhizobacteria.

## **Capítulo I**

### **INTRODUÇÃO GERAL**

## INTRODUÇÃO GERAL

O abacaxizeiro [*Ananas comosus* (L.), Merr.] é uma fruteira extensivamente cultivada nas zonas tropicais e subtropicais dos hemisférios norte e sul, sendo originário da América tropical e muito provavelmente do Brasil, onde existe grande variabilidade genética dentro da espécie. É uma planta monocotiledônea, herbácea, perene, pertencente à família das Bromeliáceas, com aproximadamente 1,0 m de altura. No caule, pouco desenvolvido, inserem-se folhas lineares, em forma de calha e dispostas em torno de um eixo central. As flores apresentam uma coloração roxo-purpúrea, reunidas em inflorescência terminal de eixo grosso, carnoso e cônico oval. Trata-se de uma infrutescência, conhecida mundialmente como ananás, pineapple, piña e, no Brasil, abacaxi (Ventura *et al.*, 1981). O crescimento e desenvolvimento do abacaxizeiro são bastante influenciados pela temperatura, sendo a faixa ótima para crescimento das folhas e raízes entre 22 e 30°C podendo, entretanto, suportar temperaturas em torno de 40°C. A pluviosidade é outro fator climático de grande importância para a cultura, a qual desenvolve-se bem em regiões onde ocorrem precipitações de 1000 a 1500 mm anuais. A falta de chuva atrasa o desenvolvimento da planta e do fruto (Cunha *et al.*, 1994).

O abacaxi é um dos frutos de maior preferência no mundo, tanto “in natura” como industrializado na forma de compotas, geléias, sorvetes e sucos. Além da produção de fibras para tecidos, produz ainda uma enzima proteolítica, a bromelina, muito utilizada no amaciamento de carnes, produção de cerveja e indústria farmacêutica (Carvalho & Cunha, 1999). O maior produtor mundial é a Tailândia, com uma produção estimada em 2.280.959 toneladas, representando 15,81% da produção mundial em 1998. O Brasil ocupa a segunda posição no ranque mundial e a primeira na América do Sul, com uma produção de 1.353.480

toneladas em 2000 (FAO, 2000). No cenário nacional, os estados da Paraíba, Minas Gerais, Pará, Rio Grande do Norte, Bahia e Espírito Santo, ocupam respectivamente os primeiros lugares, sendo responsáveis por 83% da produção nacional (IBGE, 1999). Em Pernambuco, são comercializados 1.419 t de abacaxi por mês, sendo os maiores produtores, os municípios de Itambé e Pombos (CEAGEPE, 2000).

As cultivares mais plantadas no mundo para consumo ao natural e industrialização pertencem à espécie *A. comosus*, sendo as principais a 'Smooth Cayenne', 'Singapora Spanish', 'Queen', 'Espanhola Roja', 'Pérola' e 'Perolera'. Outras cultivares são plantadas em escala reduzida para mercados locais e regionais, destacando-se a 'Jupi' e 'Primavera' (Cunha & Cabral, 1999). No Brasil, as cultivares mais plantadas 'Pérola' e 'Smooth Cayenne' apresentam alta suscetibilidade à fusariose causada por *Fusarium subglutinans* Wollenw & Reinking. Esta doença é considerada de grande importância econômica, sendo responsável por 30 a 80% de perdas dos frutos e 15 a 20% de mudas (Ventura *et al.*, 1981; Ventura, 1994). Constatada pela primeira vez no Brasil em 1964, no estado de São Paulo e posteriormente, no Rio de Janeiro e Minas Gerais, essa doença também é conhecida como gomose ou resinose fúngica (Kimati & Tokeshi, 1964). A fusariose ocorre em todas as partes da planta e em todos os estádios de desenvolvimento, incluindo todos os tipos de mudas. Em estágio de desenvolvimento vegetativo as plantas infectadas apresentam lesões geralmente no terço inferior do caule, e as folhas aí inseridas apresentam infecção restrita à sua parte basal não-clorofilada. A maturidade dos tecidos na região clorofilada torna-os mais resistentes. Com o desenvolvimento da lesão no caule, observa-se uma redução no fluxo da seiva, resultando em enfezamento, clorose, murcha e morte da planta. Além da lesão do caule, a planta infectada pode expressar também sintomas externos como curvatura e encurtamento do caule, redução no comprimento das folhas, morte do meristema apical, afunilamento da planta e morte. No

material propagativo, os sintomas caracterizam-se por lesão no caule, exsudação de goma e infecção na parte aclorofilada. No fruto observa-se a exsudação da goma na cavidade floral com apodrecimento da polpa na região infectada. Embora estes sintomas possam ser observados com maior intensidade a partir do final da floração, é na fase de maturação que eles tornam-se mais evidentes (Matos, 1999).

O gênero *Fusarium* é bastante heterogêneo, com ampla distribuição geográfica e inclui muitas espécies tradicionalmente identificadas pelas características morfológicas. O critério para diferenciação com base no reconhecimento fisiológico tem sido usado para a diferenciação adicional intraespecífica, dando suporte à caracterização taxonômica. A identificação de *Fusarium* ao nível de espécie, forma especial e raça é difícil, uma vez que muitas variáveis devem ser consideradas (Windels, 1991). *Fusarium subglutinans*, antes denominado de *F. moniliforme* Sheldon var. *subglutinans*, foi estabelecido como uma espécie independente por apresentar características morfológicas estáveis e suficientes para tanto. Em meio de batata-dextrose-ágar, *F. subglutinans* apresenta inicialmente um micélio branco, que passa a róseo alaranjado, alcançando, algumas vezes, a coloração violeta. Dois tipos de esporos são produzidos: os microconídios e os macroconídios. As características principais deste patógeno são a produção de microconídios em polifálides, sempre em falsas cabeças e ausência de clamidósporos (Nelson *et al.*, 1983).

A incidência da fusariose varia de uma região produtora para outra, dependendo do potencial de inóculo; dentro de uma mesma região, sofre forte influência sazonal, variando conforme a época de produção (Matos & Cunha, 1987; Matos, 1987). No Brasil, a incidência e severidade da fusariose talvez estejam associadas à temperatura favorável durante o processo de infecção, o que não existe em outros países produtores de abacaxi, onde a doença não

ocorre (Rohrbach & Taniguchi, 1984; Petty, 1990). A maior incidência da doença ocorre em temperaturas entre 20 e 30 °C no campo. Foi observada uma correlação significativa positiva em condições de campo e através de inoculação artificial, entre a severidade da doença e temperaturas de 21 a 27 °C durante as primeiras cinco semanas após a indução floral (Rohrbach & Taniguchi, 1984). Estudos em folhas destacadas do abacaxizeiro mostraram que o melhor desenvolvimento radial da lesão, ocorreu em torno de 30 °C (Silva-Acuña *et al.*, 1995). A germinação, crescimento micelial e esporulação desse patógeno atingem maiores valores em temperaturas que variam de 25 a 30 °C (Ventura, 1994), porém a existência de variabilidade pode justificar alterações de comportamento em diferentes temperaturas (Aguiar *et al.*, 1982). Temperaturas superiores a 35 °C podem ter efeito na sobrevivência do patógeno e deverão ser consideradas na epidemiologia da doença (Ventura *et al.*, 1981).

A germinação dos conídios de *F. subglutinans* em condições de baixa umidade relativa é desconhecida, bem como o efeito de longos períodos secos, quando a umidade do ar fica abaixo de 70%. Para alguns fungos, a baixa umidade relativa do ar é limitante para a germinação dos esporos, contribuindo para a adoção de medidas de controle. Umidade acima de 92% é importante para a germinação dos conídios de *F. subglutinans*, que se inicia em duas horas, e atinge o máximo em 12 horas. Estas condições favoráveis de umidade são muito comuns nas regiões produtoras de abacaxi, sendo ainda facilitadas pela arquitetura da planta que canaliza as gotas de orvalho e toda precipitação, por menor que seja, para as axilas das folhas e para o ponto de crescimento da inflorescência (Ventura, 1994).

A penetração do fungo na planta ocorre através de ferimentos, resultantes de rachaduras e fendilamentos do processo normal de crescimento da planta ou causados pela ação de agentes bióticos ou abióticos, que também constituem sítios de infecção em mudas (Matos & Cunha, 1987). Nos frutos, a infecção tem início nas flores durante a ântese ou em

ferimentos quando existem, mas a fase de floração representa o período mais crítico no ciclo da doença (Ventura *et al.*, 1993). Desta forma, o manejo da indução floral em épocas com baixa precipitação pluviométrica e temperatura acima de 30 °C ou abaixo de 20 °C, pode ser uma prática importante para reduzir a severidade da doença (Matos & Caldas, 1996).

*Fusarium subglutinans* pode sobreviver em material propagativo infectado ainda aderido à planta mãe, restos culturais e epifiticamente nas folhas do abacaxizeiro. Mudanças infectadas constituem o principal agente de disseminação da fusariose, seja à longa distância, de uma região para outra, seja dentro da mesma região produtora (Matos, 1999).

Através do manejo integrado, várias estratégias de controle têm sido utilizadas para reduzir as perdas causadas por esta doença. Dentre elas destacam-se o plantio de material propagativo sadio e erradicação de plantas doentes no campo, para redução do inóculo inicial; estabelecimento de um programa de escape da doença, baseado na curva de incidência da doença para cada região, praticando-se a indução floral em períodos que possibilitem o desenvolvimento da inflorescência e do fruto, em épocas desfavoráveis à incidência da doença (Matos, 1987); proteção mecânica das inflorescências através de sacos de polietileno e sacos de papel pergaminho, evitando que os conídios sejam disseminados para a inflorescência durante o período de maior susceptibilidade (Matos & Caldas, 1986); utilização de fungicidas como captan e benomil, que apesar de eficientes, podem induzir o aparecimento de populações resistentes (Aguiar *et al.*, 1982); utilização de cultivares resistentes, identificadas desde o final da década de sessenta, destacando-se 'Primavera' e 'Perolera', por apresentarem frutos com maior potencial para comercialização (Ventura, 1994).

Bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP) são bactérias que colonizam os tecidos das plantas, exercendo um efeito benéfico no desenvolvimento e sanidade das mesmas (Kloepper *et al.*, 1980). As BPCP atuam tanto pelo controle biológico de doenças,

como diretamente pela promoção de crescimento aumentando a produtividade e desenvolvimento das plantas (Mariano & Romeiro, 2000).

As BPCP podem ter habitat endofítico ou epifítico. Bactérias epifíticas são encontradas na superfície de órgãos vegetais, onde sobrevivem em locais protegidos utilizando exsudados e nutrientes de fontes externas, sem causar doença e podendo ser isoladas tanto do filoplano quanto do rizoplano. Bactérias endofíticas são aquelas que se encontram nos tecidos internos da planta, colonizando os espaços intercelulares e córtex das raízes ou colonizando sistematicamente toda a planta através dos vasos condutores sem causar nenhum sintoma de doença (Agarwal & Shende, 1987). Geralmente as bactérias endofíticas originam-se de comunidades bacterianas epifíticas, que através de sementes, ferimentos, aberturas naturais e pela ação de enzimas hidrolíticas, como celulasas e pectinases, penetram nos tecidos internos, colonizando a planta. As bactérias endofíticas encontram nesses tecidos, um ambiente favorável a sua sobrevivência, e proporcionam à planta, através de diferentes mecanismos de ação, melhores condições de desenvolvimento. Os principais efeitos observados na promoção de crescimento de plantas são aumento da taxa de germinação, crescimento das raízes, crescimento de colmos ou caules, aumento do número de folhas e área foliar, crescimento de tubérculos, aumento do número de flores e rendimento. As BPCP biocontroladoras atuam no crescimento, infectividade, virulência e agressividade do patógeno, bem como nos processos de infecção, desenvolvimento de sintomas e reprodução (Hallmann *et al.*, 1997).

Os principais gêneros e espécies de bactérias epifíticas são *Pseudomonas* spp. do grupo fluorescente, *Bacillus* spp. e *Streptomyces* spp. Mais de 129 espécies de bactérias, representando cerca de 54 gêneros já foram encontradas colonizando endofiticamente estruturas vegetais, destacando-se os gêneros *Pseudomonas* Migula, *Bacillus* Cohn, *Enterobacter* Hormaeche & Edwards e *Agrobacterium* Conn (Hallmann *et al.*, 1997).

Bactérias endofíticas têm sido relatadas em plantas sadias de várias espécies (Hallmann *et al.*, 1997). Bactérias endofíticas têm sido associadas à promoção de crescimento de diversas culturas como tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Bashan *et al.*, 1989; Nowak *et al.*, 1995), batata (*Solanum tuberosum* L.) (Frommel *et al.*, 1991), milho (*Zea mays* L.) (Hilton & Bacon, 1995), arroz (*Oryza sativa* L.) (Hurek *et al.*, 1994) e algodão (*Gossypium herbarum* L.) (Bashan *et al.*, 1989). Na China, as YIB têm induzido aumentos significativos de rendimento têm sido obtidos em diversas culturas como tomate e pimentão (*Capsicum annuum* L.) (10%), batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) (23%), hortaliças (15%) e melancia (*Citrulus lanatus* (Thumb.) Matsum.) (16,9%) (Zhang *et al.*, 1996). Essas bactérias também têm a capacidade de colonizar o nicho ecológico de diversos patógenos de plantas, principalmente os vasculares, apresentando efeito significativo no controle de *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr f. sp. *vasinfectum* (Atk.) W.C. Snyder & H.N. Hans. em algodão (Chen *et al.*, 1995), *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthier e *Rhizoctonia solani* Kühn em batata (Nowak *et al.*, 1995), *Sclerotium rolfsii* Sacc. em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (Pleban *et al.*, 1995), além de diversas doenças em pepino como a murcha de *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr f. sp. *cucumerinum* J.H. Owen), mancha angular (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (Smith & Bryan)), antracnose (*Colletotrichum orbiculare* (Berk. & Mont.) Arx) e mosaico (CMV- cucumber mosaic virus) (Wei *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1995; Raupach *et al.*, 1998). Bactérias endofíticas também têm sido associadas à promoção de crescimento de diversas culturas como tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Bashan *et al.*, 1989; Nowak *et al.*, 1995), batata (Frommel *et al.*, 1991), milho (Hilton & Bacon, 1995), arroz (Hurek *et al.*, 1994) e algodão (Bashan *et al.*, 1989). Na China, as BPCP, são chamadas YIB (Yield increasing bacteria) e têm sido aplicadas em larga escala desde 1987 (Wenhua & Hetong, 1997).

As BPCP podem aumentar o crescimento das plantas através de um ou mais mecanismos tais como produção dos fitohormônios auxinas, citocininas, giberelinas e etileno; produção de enzimas; produção de ácido cianídrico (HCN); solubilização de fosfatos e oxidação de sulfatos; eliminação e alteração da microflora deletéria; fixação de nitrogênio e produção de antibióticos extra-celulares (Enebak *et al.*, 1998). Estudos mostraram que isolados de *Pseudomonas* spp., *Bacillus polymixa*, *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida* produzem auxinas, particularmente o ácido indol-3-acético (Boroni *et al.*, 1993). Glick (2000) observou que isolados de *Pseudomonas* produtores da enzima ACC deaminase exerciam várias funções para o crescimento de plantas, como o estímulo ao crescimento vegetal e alongamento das raízes, possibilitando maior exploração do solo, diminuindo o estresse hídrico e a escassez de nutrientes.

As BPCP podem exercer o controle biológico de doenças de plantas através de um ou mais mecanismos tais como antibiose, produção de ácido cianídrico, sideróforos, indução de resistência e enzimas que degradam a parede celular como pectinase, celulase e  $\beta$ -1,3-glucanase (Kloepper *et al.*, 1999), além de parasitismo (Luz, 1996), produção de ácido salicílico (Press *et al.*, 1997) e competição por ácidos graxos (Van Dirk & Nelson, 2000).

O abacaxizeiro é uma planta propagada vegetativamente por meio de mudas, dos tipos: coroa, filhote, rebentão e filhote rebentão (Cunha & Cabral, 1999). A muda é portadora de todo o potencial genético do vegetal e importante veículo na disseminação da fusariose, doença, responsável por elevadas perdas de plantas e frutos. Assim, a qualidade e sanidade do material propagativo assume grande importância no cultivo do abacaxi e sucesso na exploração dessa cultura (Reinhardt & Cunha, 1999). Dependendo do espaçamento usado, são necessárias de 20.000 a 75.000 mudas para o plantio de um hectare (Cunha, 1999),

configurando-se alta demanda por material propagativo. A baixa produtividade desse material que varia de 6 a 10 mudas no final de 18 meses de cultura (Reinhardt & Cunha, 1999), a inexistência de programas de produção de mudas fiscalizadas, bem como a incidência de pragas e doenças, sobretudo a fusariose, são possivelmente, as razões pelas quais a área cultivada no Brasil tem aumentado pouco ao longo dos anos, apesar das condições edafoclimáticas favoráveis e da alta rentabilidade da cultura (Reinhardt *et al.*, 1996).

A técnica de micropropagação a partir do cultivo de explantes obtidos de meristemas e de gemas axilares é uma alternativa viável para a produção massal de material propagativo sadio, de alta qualidade e uniforme. Essa técnica é utilizada para a multiplicação de mudas sadias das cultivares comerciais ‘Pérola’ e ‘Smooth Cayenne’, e ainda para obtenção de variedades e híbridos resistentes à fusariose, permitindo a multiplicação rápida dos clones selecionados (Eloy *et al.*, 1993). Estima-se que cerca de 30.000 plântulas podem ser produzidas entre 6 e 8 meses a partir de 30 a 40 gemas axilares viáveis de uma única coroa, após três subculturas (Fitchet, 1990). As plântulas obtidas pela técnica de micropropagação têm que passar pela fase de aclimação, até atingirem o tamanho adequado para o plantio definitivo no campo. A duração deste período varia, entre outros fatores, de acordo com o substrato e nutrição das plântulas (Folliot & Marchal, 1990) sendo, em geral, para o abacaxizeiro de 5 a 10 meses (Reinhardt & Cunha, 1999).

Mudas tratadas com BPCP podem ter melhor adaptação em condições de estresse, como o que ocorre no período de aclimação. Estudos com tomate, batata, melancia e pepino têm evidenciado a influência de BPCP na micropropagação destas culturas. Esses microorganismos podem agir tanto na cultura “*in vitro*” como na fase de aclimação, proporcionando maior vigor e adaptação das mudas após o transplante (Nowak, 1998).

A interação entre BPCP e mudas de abacaxi tem sido pouco estudada. Entretanto, foi relatado que o isolado C240 aplicado através do método de imersão de raízes na fase de pós-aclimatação, aumentou a biomassa de mudas desta bromeliácea induzindo aumentos de 156,7% na matéria seca da parte aérea, 56,4% na matéria seca das raízes e 30,9% na área foliar (Siqueira *et al.*, 1997).

A aplicação da mistura de diferentes isolados representa uma importante estratégia de controle de doenças, porém o sucesso desta prática depende da combinação e compatibilidade dos microrganismos envolvidos na mistura (De Boer *et al.*, 1999). O aumento da diversidade genética no controle biológico através da mistura de microrganismos, proporciona um aumento dos mecanismos de ação envolvidos no biocontrole como indução de resistência, competição por nutrientes e produção de antibióticos (Pierson & Weller, 1994). As interações entre os microrganismos introduzidos podem influenciar a microflora existente e sua performance na rizosfera, assim como vários fatores bióticos e abióticos podem comprometer a performance dos microrganismos biocontroladores através de competição por nutrientes, nicho ecológico e produção de metabólitos (Pierson & Weller, 1994; Duffy *et al.*, 1996).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivos: selecionar o método de bacterização mais eficiente e prático para mudas de abacaxi micropropagadas durante o período de aclimatação; selecionar os melhores isolados bacterianos para promoção de crescimento de mudas de abacaxi micropropagadas, de modo à aumentar a biomassa das plantas e reduzir o período de aclimatação; testar os efeitos das misturas dos isolados na promoção de crescimento e determinar os mecanismos de ação envolvidos na promoção de crescimento (Capítulo 2) e, ainda, estudar o efeito de bactérias sobre a fusariose em mudas micropropagadas e os mecanismos de ação envolvidos neste controle (Capítulo 3).

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- AGARWAL, S.; SHENDE, S.T. Tetrazolium reducing microorganisms inside the roots of *Brassica* species. **Current Sciences**, Bangalore, v.56, p.187-188, 1987.
- AGUIAR, N.T.O.; BOLKAN, H.A.; DIANESE, J.C. Efeito de fungicidas sobre a germinação de conídios de *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* in vitro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.3, n.7, p.507, 1982.
- BASHAN, Y.; REAM, Y.; LAVANONY, H.; SADE, A. Nonspecific responses in plant growth, yield, and root colonization of noncereal crop plants to inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.67, p. 317-1324, 1989.
- BORONI, A.M.; KOCHETKOV, V.V.; DUBEIKOVSKY, A.N.; MORDUKHOVA, E. A. Biological control of soilborne plant pathogens. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 6., 1993, Montreal. **Proceedings...** Canadá: ISPP, 1993, p.276.
- CARVALHO, V.D.; CUNHA, G.A.P. Produtos e usos. In: CUNHA, G.A.P.; CABRAL, J.R.S.; SOUZA, L.F.S. (Eds.). **O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia**. Cruz das Almas: EMBRAPA, 1999. p.389-402.
- CEAGEPE. **Procedência e quantidade dos produtos comercializados na CEASA-PE. 2000**. [on line]. Recife: Companhia de Abastecimento e Armazéns de Pernambuco, 2000. Disponível em: <<http://www.ceagepe.com.br>>. Acesso em: 28 jun. 2001.

- CHEN, C.; BAUSKE, E. M.; MUSSON, G.; RODRÍGUES-KÀBANA, R.; KLOEPFER, J. W. Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. **Biological Control**, London, v.5, p.83-91, 1995.
- CUNHA, G.A.P. Implantação da cultura. In: CUNHA, G.A.P.; CABRAL, J.R.S.; SOUZA, L.F.S. (Eds.). **O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia**. Cruz das Almas: EMBRAPA, 1999. p.139-167.
- CUNHA, G.A.P.; CABRAL, J.R.S. Taxonomia, Espécies, Cultivares e Morfologia. In: CUNHA, G.A.P.; CABRAL, J.R.S.; SOUZA, L.F.S. (Eds.). **O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia**. Cruz das Almas: EMBRAPA, 1999. p.17-51.
- 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. 1994; 41 p. (Série Publicações Técnicas Frupex; 11)
- DE BOER, M.; SLUIS, I.V.D.; LOON, V.; BAKKER, P.A.H.M. Combining fluorescent *Pseudomonas* spp. strains to enhance suppression of fusarium wilt of radish. **Journal of Plant Pathology**, London, v.105, p.201-210, 1999.
- DUFFY, B.K.; SIMON, A.; WELLER, D.M. Combination of *Trichoderma koningii* with fluorescent pseudomonads for control of take-all on wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v.86, p.188-194, 1996.
- ELOY, A.M.M.; CABRAL, J.R.S.; SOUZA, A. da S.; MATOS A.P. de; ALMEIDA, W.A.B. Propagação *in vitro* do abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merr.). In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL 1., 1993, Brasília. **Programas e resumos**. Brasília, 1993.p.

- ENEBAK, S.A.; WEI, G.; KLOPPER, J.W. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedlings. **Forest Science**, Bethesda, v. 44, n.1, p.139-144, 1998.
- FAO. FAOSTAT - **Agricultural statistics database**. [on line]. Rome: World Agricultural Information Centre, 2000. Disponível em: <<http://apps.fao.org/lim500/nph-wrap.pl>>. Acesso em: 28 jun. 2001.
- FITCHET, M. Clonal propagation of Queen and Smooth Cayenne pineapples. **Acta Horticultural**, The Hague, v.275, p.261-266, 1990.
- FOLLIOT, M.; MARCHALL, J. Influence du support de culture sur la vitesse de croissance des vitroplants d'ananas em phase d'climatation. **Fruits**, Paris, v. 5, p.367-376, 1990.
- FROMMEL, M.I.; NOWAK, J.; LAZAROVITS, G. Growth enhancement and developmental modifications of *in vitro* grown potato (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. **Plant Physiology**, v.96, p.926-936, 1991.
- GLICK, B.R. Protecting plants from the effects of ethylene using ACC deaminase - containing plant growth-promoting bacteria. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON PLANT GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA. 5., 2000, Cordoba. **Proceedings...** Auburn: OECD, 2000, p.42.
- HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytic in agricultural crops. **Journal of Microbiology**, London, v.43, p.895-914, 1997.
- HILTON, D.M.; BACON, C.W. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. **Mycopathologia**, Dordrecht, v.129, p.117-125, 1995.

HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B.; VANMONTAGU, M.; KELLEN-BERGER, E.

Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses.

**Journal of Bacteriology**, London, v.176, p.1913-1923, 1994.

IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **SIDRA 97:**

**sistema IBGE de recuperação automática.** [online]. Rio de Janeiro: Instituto

Brasileiro de Geografia e Estatística, 1999. Disponível em: <

<http://www.ibge.gov/pam>>. Acesso em: 22 dez. 2000.

KIMATI, H.; TOKESHI, H. Nota sobre a ocorrência de *Fusarium* sp. causando resinose

fúngica em abacaxi. **Revista de Agricultura**, v.39, n.3, p.131-133, 1964.

KLOEPPER, J.W.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, 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.

**Australasian Plant Pathology**, Toowoomba, v.28, n.1, p.21, 1999.

KLOEPPER, J.W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCHROTH, M. Enhanced plant growth

by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. **Nature**, London,

v.286, n.14, p.885-886, 1980.

LIU, L.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber

against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria.

**Phytopathology**, St. Paul, v.85, p.843-84, 1995.

LUZ, W.C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção.

**Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 4, p. 1-49, 1996.

MARIANO, R.L.M.; ROMEIRO, R.S. Indução de resistência sistêmica mediada por

rizobactérias promotoras de crescimento de plantas. In: MELLO, I.S.; AZEVEDO,

J.L. (Eds.). **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, 2000. v.2, p.305.

- MATOS, A.P. de. Doenças e seu controle. In: CUNHA, G.A.P.; CABRAL, J.R.S.; SOUZA, L.F.S. (Eds.). **O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia**. Cruz das Almas: EMBRAPA, 1999. p.269-305.
- MATOS, A.P.; CALDAS, R.C. Indução da fusariose em mudas tipo filhote de abacaxi Pérola em condições de campo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, n.2, v.18, p.261-268, 1996.
- MATOS, A.P. de.; CUNHA, G.A.P. da. Incidência da fusariose em mudas de abacaxi 'Pérola', tipos coroa, filhote e rebentão. **Magistra**, Cruz das Almas, v.5, n.4, p.75-84, 1987.
- MATOS, A.P. Pineapple fusariosis in Brasil, an overview. **Fruits**, Paris, v.42, n.10, p. 417-421, 1987.
- NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; MARASAS, W.F. **Fusarium species: an illustrated manual for identification**. Pennsylvania: State University Press, 1983, 44 p.
- NOWAK, J. Benefits of *in vitro* "biotization" of plant tissue cultures with microbial inoculants. **In Vitro Cell and Development Biology Plant**, Largo, v.34, p. 122-130, 1998.
- NOWAK, J.; ASIEDU, S. K.; LAZAROVITIS, G.; PILLAY, V.; STEWART, A.; SMITH, C.; LIU, Z. Enhancement of *in vitro* growth and transplant stress tolerance of potato and vegetable plantlets co-cultured with a plant growth-promoting pseudomonad bacterium. **Ecophysiology and photosynthetic *in vitro* cultures**, Aix-en-Provence, p.173-180, 1995.
- PETTY, G.J. **Black spot in pineapples**. Petrolina: CSFRI, 1990. 2 p.

- PIERSON, E.A.; WELLER, D.M. Use of mixtures of fluorescent pseudomonads to suppress take-all and improve growth of wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v.84, p.940-947, 1994.
- PLEBAN, S.; INGEL, F.; CHET, I. Control of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse using endophytic *Bacillus* spp. **Plant Pathology**, London, v.101, p.665-672, 1995.
- PRESS, C.M.; WILSON, M.; TUZUN, S.; KLOEPPER, J. W. Salicylic acid produced by *Serratia marcescens* 90-166 is not the primary determinant of induced systemic resistance in cucumber or tobacco. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.10, n.6, p.761-768, 1997.
- RAUPACH, G.S.; LIU, L.; MURPHY, J.F.; TUZUN, S.; KLOEPPER, J.W. Induced systemic resistance in cucumber and tomato against cucumber mosaic cucumovirus using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). **Plant Disease**, St. Paul, v.80, p.891-894. 1997.
- REINHARDT, D.H.R.C.; CUNHA, G.A.P. Métodos de propagação. In: CUNHA, G.A.P.; CABRAL, J.R.S.; SOUZA, L.F.S. (Eds.). **O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia**. Cruz das Almas: EMBRAPA, 1999. p.105-139.
- REINHARDT, D.H.R.C.; SOUZA, L.F. da. S.; CUNHA, G.A.P. da. Manejo do abacaxi 'Pérola' para produção de rebentões. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.18, n.3, p.319-327, 1996.
- ROHRBACH, K.; TANIGUCHI, G. Effects of temperature, moisture and stage of inflorescence development on infection of pineapple by *Penicillium funiculosum* and *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. **Phytopathology**, St. Paul, v.74, n. 8, p.995-1000, 1984.

- SILVA-ACUÑA, R.; COSTA, A.F.; BARRETO, M.; ZAMBOLIM, L. Efeito da temperatura e do tipo de folha no desenvolvimento de lesões de *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* no abacaxizeiro Pérola. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, n.3, p.498-500, 1995.
- SIQUEIRA, K.M.S.; OLIVEIRA, G.M.; VASCONCELOS, A.G.; PINHO, P.A. L.; GOMES, A.M.A.; MARIANO, R.L.M.; WILLADINO, L. Promoção de crescimento de mudas de abacaxi através da utilização de bactérias. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 9., 1997, Recife. **Resumos...** Recife: Imprensa Universitária, 1997, p.92.
- VAN DIRK, K.; NELSON, E.B. Fatty-acids competition as a mechanism by which *Enterobacter cloacae* suppresses *Pythium ultimum* sporangium germination and damping-off. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.66, p.5340-5347, 2000.
- VENTURA, J.A. **Fusariose do abacaxizeiro: caracterização do patógeno, epidemiologia da doença, resistência e micropropagação do hospedeiro *in vitro***. 1994. 111f. Tese (Doutorado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG.
- VENTURA, J.A.; MAFFIA, L.A.; CHAVES, G.M. Field induction of fusariosis in pineapple fruits with *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* Wr. & Reg. **Fruits**, Paris, v.36, n.11, p.707-710, 1981.
- VENTURA, J.A.; ZAMBOLIM, L.; CHAVES, G.M. Integrated management system for pineapple *Fusarium* disease control. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 334, p.439-453, 1993.

- WEI, G.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by selected strains of plant growth-promoting rhizobacteria. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, p.1508-1512, 1991.
- WENHUA, T.; HETONG, Y. Research and application of biocontrol of plant diseases and PGPR in China. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON PLANT GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA, 4., 1997, Sapporo, **Proceedings...** Sapporo: OECD-OECD, 1997. p.2-9.
- WINDELS, C.E. Current status of *Fusarium* taxonomy. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, p.1048-1051, 1991.
- ZHANG, S.A.; XU, W.M.; YAN, Z.N.; MEI, R.H. Research and commercialization of yield increasing bacteria (YIB) in China. In: WENHUA, T.; COOK, R. J.; ROVIRA, A. (Eds). **Advances in biological control of plant diseases**. Beijing: China Agricultural University Press, 1996, p.47-53.

## **Capítulo II**

# **SELEÇÃO DE BACTÉRIAS E MÉTODOS DE BACTERIZAÇÃO PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO EM MUDAS DE ABACAXI MICROPROPAGADAS**

**Seleção de bactérias e métodos de bacterização para promoção de crescimento em mudas de abacaxi micropropagadas\***

Marcelo R. F. de Mello<sup>1\*\*</sup>, Rosa L. R. Mariano<sup>1\*\*\*</sup>, Maria Menezes<sup>1\*\*\*</sup>, Terezinha R. Câmara<sup>2\*\*\*</sup>, Sayonara M. P. Assis<sup>3\*\*\*</sup>

<sup>1</sup>UFRPE. Departamento de Agronomia - Fitossanidade, CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil, E-mail: rmariano@truenet.com.br

<sup>2</sup>UFRPE. Departamento de Química - Química Vegetal, CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil

<sup>3</sup>UFRPE. Departamento de Biologia - Botânica, CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil

\*Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Universidade Federal Rural de Pernambuco

\*\*Bolsista da CAPES, \*\*\*Bolsista do CNPq

Aceito para publicação em:

---

**RESUMO**

Mello, M.R.F.; Mariano, R.L.R.; Menezes, M.; Câmara, T.R.; Assis, S.M.P. Seleção de bactérias e métodos de bacterização para promoção de crescimento em mudas de abacaxi micropropagadas. *Summa Phytopathologica*

Mudas micropropagadas de abacaxi cv. Pérola, não aclimatadas, foram bacterizadas com 19 isolados bacterianos. Após esta seleção preliminar de isolados, cinco métodos de bacterização foram testados: infestação do substrato (IS), imersão de raízes (IR), pulverização das folhas (PF), imersão de raízes + infestação do substrato (IRS) e pulverização das folhas + infestação do substrato (PFS). O melhor método de

bacterização (IR) e a mistura dos isolados mais eficientes compatíveis (RAB9, ENF10, ENF16, C210) foram novamente testados. A produção de ácido indol acético (AIA), ácido cianídrico (HCN) e solubilização de fosfatos foram analisados como mecanismos de promoção de crescimento, sendo também quantificados os macronutrientes N, P e K. As mudas foram avaliadas através das variáveis: altura da planta (AL), número de folhas (NF), área foliar (AF), matéria seca da parte aérea (MSA) e matéria seca das raízes (MSR), trinta dias após o transplante. Dentre os métodos de bacterização testados, IRS e IR foram os mais eficientes, sendo escolhido o método IR pela maior praticidade. Dentre os isolados testados, os mais eficientes foram C210, ENF16, RAB9 e ENF10. Aumentos de 163,6%, 107,7% e 87,0% foram obtidos pelo isolado RAB9 aplicado pelo método de IR, para as variáveis MSA, MSR e AF. Todos os isolados selecionados foram compatíveis e as misturas entre os isolados ENF10 + RAB9, ENF16 + C210 e C210 + RAB9 induziram aumentos de 100%, 88,1% e 80,1%, respectivamente para a variável PSR. Não foi observada a produção do AIA, HCN ou solubilização de fosfatos, nas condições experimentais utilizadas. O nitrogênio foi o único macronutriente cujo teor diferiu significativamente entre as mudas bacterizadas e testemunhas. Este trabalho demonstrou que misturas dos isolados C210, ENF16, RAB9 e ENF10 aplicadas pela imersão de raízes, podem promover o aumento de biomassa de mudas de abacaxi micropropagadas, reduzindo a fase de aclimação.

Palavras-chave adicionais: *Ananas comosus*, aclimação, biomassa, bactérias promotoras de crescimento de plantas, BPCP.

---

**ABSTRACT**

Mello, M.R.F.; Mariano, R.L.R.; Menezes, M.; Câmara, T.R.; Assis, S.M.P. Screening of bacteria and bacterization methods for growth-promotion of micropropagated pineapple plantlets. **Summa Phytopathologica**

*Micropropagated pineapple plantlets cv. Pérola, not acclimated were bacterized with 19 strains of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). After this initial screening five bacterization methods were tested: root dipping (IR), soil drenching (IS), foliage atomization (PF), root dipping + soil drenching (IRS) and root dipping + foliage atomization (PFS). The best bacterization method (IR) and the mixture of the most efficient and compatible strains (RAB9, ENF10, ENF16, C210) were again tested. The production of indol acetic acid (AIA), hydrocyanic acid (HCN) and the phosphate solubilization were assayed as mechanisms for growth-promotion and macronutrients N, P and K were quantified. Plantlets were evaluated for shoot length (AL), leaf number (NF), leaf area (AF), shoot dry weight (MSA) and root dry weight (MSR) at 30 days after transplanting. Overall the best methods were IRS and IR the second being chosen due to its practicability. The most efficient bacterial strains were C210, ENF16, RAB9 e ENF10. Increases as high as 163.6%, 107.7% and 87.0% were obtained by RAB9 applied by IR, respectively for MSA, MSR and AF. All strains showed compatibility and combination of ENF10 + RAB9, ENF16 + C210 and C210 + RAB9 induced 100%, 88.1% and 80.1%, respectively for PSR. Productions of IAA, HCN or phosphate solubilization were not detected under the experimental conditions utilized here. Only nitrogen amounts in bacterized plantlets significantly differ from the controls. This work showed that mixtures of the strains C210, ENF16, RAB9 and ENF10 applied by root*

*dipping are able to increase biomass production of micropropagated pineapple plantlets, reducing the acclimation period.*

**Additional key-words:** *Ananas comosus, acclimation, biomass, plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR.*

---

O abacaxi [*Ananas comosus* (L.), Merr.] é um dos frutos mais cultivados, apreciados e consumidos em todo o mundo, destacando-se pela rentabilidade, grande demanda e importância econômica. Com uma produção estimada em 1.353.480 t em 56.031 ha, o Brasil é o segundo maior produtor mundial, superado pela Tailândia, e primeiro na América do Sul (13). No Brasil, destacam-se os Estados da Paraíba, Minas Gerais, Pará, Rio Grande do Norte, Bahia e Espírito Santo, que contribuem com 83% da produção (19). Em Pernambuco, cerca de 1.419 t de frutos são comercializadas mensalmente na CEAGEPE, sendo Itambé e Pombos os principais municípios produtores (7).

O abacaxizeiro é uma planta propagada vegetativamente por meio de mudas dos tipos coroa, filhote, rebentão e filhote rebentão (21). A muda é portadora de todo o potencial genético e importante veículo na disseminação da fusariose, causada pelo fungo *Fusarium subglutinans* Wollenw & Reinking (= *F. moniliforme* Sheldon var. *subglutinans*) (25). Esta doença é responsável por perdas de 30% a 40% de plantas e frutos e 15% a 20% de mudas (42, 41). Portanto, a qualidade e sanidade do material de propagação assumem grande importância no cultivo e sucesso da exploração do abacaxi (34). Este cultivo requer alta demanda de material propagativo pois, dependendo do espaçamento usado, são necessárias de 35.000 a 70.000 mudas para o plantio de um

hectare. Por outro lado, a taxa média de produção de mudas no sistema comercial é relativamente pequena, variando de 6 a 10 mudas por planta no final de 18 meses de cultura (21). A técnica de micropropagação, a partir do cultivo de explantes obtidos de meristemas e de gemas axilares, é uma alternativa viável para a produção massal de material propagativo sadio de alta qualidade e uniformidade. Técnicas de micropropagação desenvolvidas para o abacaxizeiro, resultam em uma taxa de multiplicação superior a 30 plântulas por explante, em meio suplementado com citocininas. Estima-se que cerca de 1,2 milhão de plântulas poderiam ser produzidas entre 6 e 8 meses a partir de 30 a 40 explantes viáveis, com uma taxa reprodutiva de 50 plântulas por explante (14).

A aclimatação é a fase onde as mudas são transferidas das condições “in vitro” para casa de vegetação. Esta fase, em geral, tem duração de 30 dias e permite a adaptação das plantas ao novo ambiente, pois a umidade baixa, alta luminosidade e ambiente sem assepsia favorecem o estresse (26). Passada esta fase, as plantas permanecem em casa de vegetação por um período variável, que depende, entre outros fatores, do substrato e da nutrição das mudas, sendo em geral para o abacaxizeiro de 5 a 10 meses ou quando estas atingirem uma altura próxima dos 30 cm (15, 34).

Bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) podem agir tanto na cultura “in vitro” quanto na fase de aclimatação proporcionando maior vigor e adaptação das mudas após o transplante. As BPCP consistem de um grupo de bactérias que beneficiam as plantas, tanto pela promoção direta do crescimento quanto pelo controle biológico de doenças ou pragas (22). O efeito benéfico de BPCP tem sido demonstrado na micropropagação de tomate, batata, melancia e pepino (27). As BPCP podem aumentar o crescimento das plantas através de um ou mais mecanismos como produção de fitohormônios, enzimas e ácido cianídrico (HCN), solubilização de fosfatos

e oxidação de sulfatos, eliminação e alteração da microflora deletéria, fixação de nitrogênio e produção de antibióticos extracelulares (12).

Plantas provenientes de cultura de tecido têm maior sensibilidade a patógenos e estresses, problemas que podem ser minimizados pela reintrodução de microrganismos endofíticos e epifíticos ainda na fase de micropropagação (26, 27). Biotização é a resposta metabólica da planta cultivada “in vitro” ao inoculante microbiano, o que determina um maior desenvolvimento fisiológico da planta, aumentando a resistência a agentes bióticos e abióticos (26).

A interação entre BPCP e mudas de abacaxi tem sido pouco estudada. *Bacillus cereus* isolado C240 aplicado através do método de imersão de raízes na fase de pós-aclimação, aumentou a biomassa de mudas de abacaxizeiro induzindo aumentos de matéria seca da parte aérea (156,7%), matéria seca das raízes (56,4%) e área foliar (30,9%) (38).

Os objetivos deste trabalho foram: selecionar o método de bacterização mais eficiente e prático para mudas de abacaxi micropropagadas não aclimatadas; selecionar isolados bacterianos, separadamente ou em misturas, para promoção de crescimento de mudas de abacaxi micropropagadas, de modo a aumentar a biomassa das plantas e reduzir o período de aclimação e estudar os mecanismos de ação dos isolados bacterianos envolvidos na promoção de crescimento.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Obtenção das mudas de abacaxi micropropagadas e isolados bacterianos**

Mudas de abacaxi micropropagadas da cv. Pérola, com aproximadamente 5 cm de altura, não aclimatadas, foram obtidas do Laboratório de Cultura de Tecidos do

Departamento de Química da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Os 19 isolados bacterianos utilizados, endofíticos e epifíticos (Quadro 1), foram provenientes da coleção do Laboratório de Fitobacteriologia do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, estando estes preservados em água de torneira esterilizada. Os isolados foram cultivados a 27 °C por 48 h em meio NYDA (Ágar nutritivo-extrato de levedura-dextrose-ágar) (31) e mantidos no decorrer dos experimentos por repicagens periódicas em tubos com NYDA. As suspensões bacterianas foram preparadas em água destilada esterilizada (ADE) contendo uma gota de Tween 80 a 0,05%, sendo ajustadas para  $A_{590} = 0,7$ .

### **Seleção de bactérias para promoção de crescimento de mudas de abacaxi micropropagadas**

No primeiro experimento em casa de vegetação, foram testados os 19 isolados bacterianos e utilizando-se dois métodos de bacterização: infestação do substrato + imersão de raízes (ISR) e infestação do substrato + pulverização das folhas (ISF). Na ISR as raízes foram imersas em 10 mL de suspensão bacteriana durante 30 minutos e plantadas em substrato tratado com 10 mL da mesma suspensão, e no ISF o substrato foi tratado com 10 mL da suspensão bacteriana antes do plantio e as folhas pulverizadas com 10 mL da suspensão bacteriana após o transplante. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 20x2, constituído por 19 isolados bacterianos + uma testemunha, e dois métodos de bacterização com seis repetições por tratamento.

### **Seleção de métodos de bacterização de mudas de abacaxi micropropagadas visando promoção de crescimento e influência nos teores de N, P e K**

No segundo experimento em casa de vegetação, os nove isolados bacterianos selecionados como mais eficientes foram utilizados para testar cinco métodos de bacterização de mudas de abacaxi micropropagadas. Na infestação do substrato (IS) este foi tratado com 10 mL da suspensão bacteriana antes do plantio; na imersão de raízes (IR), estas foram imersas em 10 mL da suspensão bacteriana durante 30 minutos sendo imediatamente plantadas enquanto na pulverização das folhas (PF), estas foram pulverizadas com 10 mL da suspensão bacteriana após o plantio. Os outros dois métodos foram infestação do substrato + imersão de raízes (ISR) e infestação do substrato + pulverização das folhas (ISF), já utilizados previamente. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 10x5, com nove isolados bacterianos + uma testemunha, cinco métodos e seis repetições por tratamento.

Um terceiro experimento foi realizado com os dois melhores métodos de bacterização (IR e ISR) e os cinco isolados mais eficientes do experimento anterior, visando observar o efeito da bacterização nos teores de N, P e K em  $\text{g.Kg}^{-1}$ . Nas determinações foram utilizados o método de Kjeldahl para N, o método colorimétrico do molibdo-vanadato de amônio para P e a fotometria de chamas para K (4, 35).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 6x2, com cinco isolados bacterianos + uma testemunha e dois métodos de bacterização com dez repetições por tratamento.

### **Efeito de misturas de isolados bacterianos compatíveis na promoção de crescimento de mudas de abacaxi micropropagadas**

A compatibilidade entre os isolados bacterianos mais eficientes foi analisada, utilizando-se o método de antibiose bactéria x bactéria (23). Os isolados foram

cultivados a 27 °C por 48 h em meio NYDA e as suspensões bacterianas foram preparadas em ADE, sendo ajustadas para  $A_{590} = 0,7$ . Transferiu-se 0,1 mL da bactéria alvo para 100 mL de NYDA fundente, homogeneizando-se e vertendo-se em placas. Quatro discos de papel de filtro esterilizados foram imersos nas suspensões das bactérias antagonistas e após secagem, colocados de forma equidistante sobre a placa contendo a bactéria alvo. A avaliação foi realizada através da medição do halo de inibição.

Após a verificação da compatibilidade, foi realizado o quarto experimento, utilizando-se quatro isolados bacterianos separadamente e em misturas (dois a dois e todos juntos) pelo método de imersão de raízes. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 12 tratamentos representados pelos isolados (separadamente e em misturas) + testemunha e oito repetições por tratamento.

### **Condução e avaliação dos experimentos**

Em todos os experimentos, as testemunhas foram tratadas com ADE. As mudas bacterizadas foram mantidas em copos plásticos (500 mL) contendo o substrato constituído de solo esterilizado: húmus (2:1) e irrigadas por sub-irrigação de modo a manter a capacidade de campo. Em intervalos de 10 dias, 5 mL da solução de Hoagland foram aplicados em cada experimento. As avaliações nos três primeiros experimentos foram realizadas 30 dias após bacterização e no último, após 60 dias, visando observar um efeito prolongado da promoção obtida foram mensuradas as variáveis altura da planta (AL), número de folhas (NF) e área foliar (AF). Após secagem a 60 °C por 48 h, a matéria seca da parte aérea (MSA) e matéria seca das raízes (MSR) foram obtidas e utilizadas para a determinação dos nutrientes.

### **Análise estatística**

Para análise estatística foi utilizado o programa SANEST. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (P=0,05). Os aumentos de biomassa das plantas, representados por MSA, MSR e AF, foram calculados através da fórmula de Edginton *et al.* (11) modificada:  $I(\%) = [(Tr - T)/T]100$ , onde  $I(\%)$  = aumento da variável,  $Tr$  = valor médio do tratamento e  $T$  = valor médio da testemunha.

### **Mecanismos de ação das BPCP**

Para os isolados C210, ENF10, ENF16 e RAB9 foram avaliados os mecanismos de produção do ácido indol acético (AIA) (6), solubilização de fosfatos (6) e produção de HCN (23).

Para avaliação da produção do AIA foi utilizado um método colorimétrico adaptado por Cattelan (6) no qual as bactérias foram transferidas para placas contendo meio TSA (Tryptic soy agar) 1/10 enriquecido com 1,021 g de L-triptofano e cobertas com uma membrana de nitrocelulose por 24 h a 28-30 °C. Após este período, removeu-se a membrana para outra placa saturando-se com solução de Salkowski e incubou-se a temperatura ambiente. O resultado positivo é caracterizado pela formação de halo avermelhado na membrana correspondente a colônia, no período entre 30 min e 2 horas. Para avaliação da solubilização de fosfatos foi utilizado o método adaptado por Cattelan (6), no qual as bactérias foram transferidas para placas contendo o meio TSA 1/10 acrescido de  $\text{CaHPO}_4$  e incubadas por sete dias a 28-30 °C. O resultado positivo é caracterizado pela formação de halo claro ao redor da colônia. Para detecção da produção de HCN, as bactérias foram cultivadas em placas de Petri com meio TSA contendo 4,4 g/L de glicina, sendo colocadas tiras de papel impregnadas com solução

de ácido pícrico na tampa das placas. A mudança de cor nas tiras de papel de amarelo cítrico para laranja ou marrom evidencia a produção do HCN. Como padrões positivos foram utilizados para produção de AIA, solubilização de fosfatos e produção de HCN, respectivamente *Chryseobacterium (Flavobacterium) indologenes* (Yabuchi & Vandamme) isolado GW2103, *Pseudomonas chlororaphis* (Guignard & Sauvageam) isolado GN1212 e *Burkholderia cepacia* (Palleroni & Halmes) isolado GN1201, cedidos pelo Dr. Catellan da EMBRAPA-Centro Nacional de Pesquisa de Soja.

## RESULTADOS

### **Seleção de bactérias para promoção de crescimento de mudas de abacaxi micropropagadas**

Dentre os 19 isolados bacterianos testados na seleção preliminar, nove (C210, ENF5, ENF19, E2, ENF12, ENF4, ENF16, RAB9 e ENF10) diferiram significativamente dos demais ( $P=0,05$ ) em relação a todas as variáveis mensuradas (Quadro 2). Não houve diferença significativa entre os métodos de bacterização utilizados.

Seleção de métodos de bacterização para promoção de crescimento de mudas de abacaxi micropropagadas e influência no teor de N, P e K

Entre os cinco diferentes métodos de bacterização testados destacaram-se a IR e IRS, os quais diferiram significativamente dos demais em relação a variável MSA (Quadro 3).

Neste experimento levando-se em consideração, principalmente as variáveis correlacionadas com a biomassa (MAS, MSR e AF) ficou evidenciado que os isolados mais eficientes aplicados pelo método de IR foram ENF5, ENF10, RAB9 e ENF16, enquanto os isolados C210, ENF5 e RAB9 foram os melhores quando aplicados pelo método de ISR (Quadro 4). O isolado RAB 9 induziu aumentos na MSA de 183,1% e 75,4% respectivamente nos dois métodos IR e ISR (Quadro 5). Foram observados aumentos na matéria seca da raiz tão altos quanto 200,0% para o isolado RAB9 e 155,8% para o isolado ENF5, respectivamente nos dois métodos. A promoção de crescimento também foi observada em relação a AF, com aumentos de 110,3% para o isolado ENF5 e 121,6% para o isolado E2, respectivamente nos dois métodos.

No terceiro experimento não houve diferença significativa entre os dois métodos de bacterização, sendo selecionado o método de IR pela maior praticidade e viabilidade em condições de produção de mudas em larga escala. Neste método, os isolados ENF10 (3,4 cm) e ENF16 (3,3 cm) diferiram da testemunha (2,9 cm) com relação à altura (Quadro 6). Todos os cinco isolados testados C210, ENF5, ENF16, RAB9 e ENF10 diferiram da testemunha em relação a variável MSA caracterizando aumento de biomassa, embora não houvesse diferença significativa para as variáveis NF, MSR e AF. Aumentos de 163,6, 107,7 e 87,0 % foram obtidos para o isolado RAB9, aplicado através do método de IR, respectivamente para as variáveis MSA, MSR e AF (Figura 1).

Houve influência da bacterização das mudas na quantidade de N total na planta, embora para P e K não tenha ocorrido diferença significativa ( $P=0,05$ ) (Quadro 7). Aumentos nos teores de Nitrogênio chegaram até 500,0 e 258,3% induzidos por C210 aplicado, respectivamente, pela imersão de raízes e pela infestação do substrato + imersão de raízes.

Os isolados C210, ENF16, RAB9 e ENF10 foram então selecionados para utilização em misturas, através do método de bacterização por imersão de raízes.

### **Efeito de misturas de isolados bacterianos compatíveis na promoção de crescimento de mudas de abacaxi micropropagadas**

Todos os isolados foram compatíveis entre si quando testados em placas de Petri em condições de laboratório.

As misturas entre os isolados C210+RAB9+ENF10+ENF16, ENF10+C210, ENF10+ENF16 e ENF16+RAB9 diferiram significativamente da testemunha com relação à MSA (Quadro 8), com aumentos de 74,8, 47,1, 45,5 e 40,6%, respectivamente (Figura 2). Já as misturas entre os isolados ENF10 + RAB9, ENF16 + C210 e C210 + RAB9 diferiram significativamente dos demais tratamentos para a variável MSR (Quadro 8), com aumentos de 100, 88,1 e 80,1 %, respectivamente (Figura 2). Com relação a AF somente a mistura ENF10+C210 diferiu estatisticamente da testemunha (Quadro 8).

### **Mecanismos de ação das BPCP**

Nas condições dos ensaios realizados, nenhum dos isolados apresentou produção de AIA, HCN ou solubilização de fosfatos. Os isolados utilizados como padrões positivos apresentaram as reações esperadas.

## **DISCUSSÃO**

A maioria das pesquisas com BPCP utiliza um grande número de isolados nas seleções preliminares, principalmente porque menos de 1% das rizobactérias são capazes de promover crescimento em plantas (8). No entanto, apesar do número

reduzido de isolados testados neste trabalho, alguns deles induziram aumentos significativos em todos os experimentos. Isto pode estar relacionado a identidade dos isolados testados, aos métodos de bacterização que favoreceram uma maior capacidade de colonização ou aos mecanismos de promoção de crescimento atuantes.

A melhor performance dos métodos imersão de raízes e imersão de raízes + infestação do substrato indica que os isolados bacterianos utilizados neste trabalho são capazes de colonizar epifiticamente as raízes de mudas de abacaxi e posteriormente promover o crescimento. Peixoto et al. (29) compararam os métodos de bacterização de plântulas e de sementes de tomateiro, sendo o primeiro mais eficiente para promoção de crescimento de plântulas. Quando raízes de plântulas de tomate micropropagadas foram imersas em uma suspensão de *Pseudomonas* sp, isolado PsJN, houve promoção de crescimento de raízes e folhas (27).

Dentre os isolados mais eficientes, RAB9 e C210 já haviam demonstrado capacidade de promover crescimento em tomate (1) e rabanete (39). Estes isolados foram obtidos originalmente como epifíticos em folhas de rabanete e couve, respectivamente, enquanto ENF16 e ENF10 são isolados endofíticos de sementes de feijão. O isolado RAB9, apresenta boas propriedades para o controle biológico de patógenos foliares como *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em couve (2) e o C210 em repolho (3). Estes isolados são respectivamente *B. cereus* e *Bacillus* sp. capazes de formar endosporos, o que permite a sobrevivência sob condições adversas. Por outro lado, bactérias endofíticas, como ENF10 e ENF16, têm a vantagem de serem protegidas da influência de fatores abióticos, por habitarem o interior da planta (18). A colonização endofítica em mudas de abacaxi não foi analisada, mas pode ter ocorrido, principalmente em relação aos isolados ENF10 e ENF16, devido a sua origem (Quadro 1).

No presente trabalho, observou-se ausência de especificidade dos isolados C210, ENF10, ENF16 e RAB9, com relação a mudas de abacaxi micropropagadas. Os benefícios da bacterização dependem das espécies, das cultivares e das condições de crescimento (26). No entanto, há controvérsia sobre o assunto, pois alguns autores não consideram a especificidade isolado-hospedeiro essencial para promoção de crescimento (17, 37) enquanto outros enfatizam esta característica como necessária para obtenção de bons resultados (12).

A aplicação da mistura de diferentes isolados representa uma importante estratégia na promoção de crescimento, dependendo da combinação e compatibilidade dos microrganismos envolvidos tanto na promoção de crescimento quanto no biocontrole. O antagonismo entre microrganismos aplicados em mistura pode influenciar o desempenho das BPCP na rizosfera, devido principalmente a competição por nutrientes e ocupação do mesmo nicho ecológico (10). O aumento da diversidade genética obtida pela mistura de microrganismos proporciona diferentes padrões de colonização, maior gama e interação dos mecanismos de ação, resultando em tratamentos contra múltiplos patógenos, que atuam sob uma faixa mais ampla de condições ambientais tais como pH, umidade e temperatura (30, 32). A compatibilidade *in vitro* e o incremento dos resultados obtidos com a mistura dos quatro isolados mais eficientes (C210, ENF16, RAB9 e ENF10) demonstram os benefícios desta interação e recomendando-se o uso de formulações mistas. Combinações compatíveis entre quatro isolados de *Pseudomonas fluorescens* aumentaram a supressividade à murcha de fusarium do rabanete (10). Em casa de vegetação e campo, a utilização da mistura de isolados bacterianos foi mais eficiente que os isolados individualmente para o controle de *Colletotrichum orbiculare*, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* e *Erwinia tracheiphila* em pepino (33)

Na natureza, os microorganismos são importantes para o crescimento, adaptação e desenvolvimento de plantas, colonizando tecidos internos e externos. O cultivo “in vitro”, priva a planta de aliados naturais como fungos, bactérias e micorrizas enquanto as condições de alta umidade, alto teor de açúcar e ausência de microorganismos que elicitam rotas metabólicas, tornam as mudas micropropagadas mais suscetíveis a patógenos e estresses ambientais. Além disto, estas mudas apresentam redução da atividade fotossintética, mau funcionamento de estômatos, menor número de pelos no sistema radicular, menor desenvolvimento da cutícula, redução do número de tricomas e de depósitos de cera (27). Estes problemas podem ser superados pela reintrodução de microorganismos isolados ou em misturas, de modo a proteger contra doenças e melhorar o desempenho global da muda. (26). Estudos com diferentes culturas como batata, cebola, tomate, melancia, pepino e pimenta, mostraram evidências da interação entre micropropagação e bactérias promotoras de crescimento em plantas – BPCP. Estes microorganismos podem oferecer durante as condições "in vitro" da cultura e também na fase de aclimação, um eficiente método para aumentar o vigor e adaptação das mudas por ocasião do transplante e ainda aumentar a produtividade (26, 27).

O aumento na biomassa das mudas micropropagadas foi determinado através do aumento de matéria seca da parte aérea e raízes e área foliar. A determinação da área foliar é de grande importância, já que as folhas são as principais responsáveis pela produção de matéria orgânica através da fotossíntese. Os processos de fotossíntese, absorção e síntese de nutrientes, respiração e transpiração são relevantes na produção de mudas micropropagadas, podendo reduzir o tempo de aclimação e aumentar o vigor das plantas, proporcionando uma menor suscetibilidade a doenças (26).

O nitrogênio, o fósforo e o potássio são importantes macronutrientes para o crescimento e metabolismo das plantas. No presente trabalho, o aumento dos teores de

nitrogênio nas plantas tratadas com BPCP pode ter duas explicações. Primeiramente, poderia ter havido fixação assimbiótica do nitrogênio, o que não é provável, uma vez que dois dos isolados pertencem a gênero *Bacillus*, não reconhecida como possuindo esta capacidade. Em segundo lugar, e mais provavelmente, houve um aumento de vigor das plantas que passaram a absorver maior quantidade deste nutriente. Dashati *et al.* (9) sugeriram que o efeito de *Serratia liquefaciens* e *S. proteamaculans* na nodulação e na fixação do nitrogênio em soja foi indiretamente devido ao aumento de vigor da planta, talvez pela produção de reguladores de crescimento. Pal *et al.* (28) utilizando isolados de *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas* spp. aumentaram significativamente a biomassa e a concentração de N e P em amendoim, com aumentos de nitrogênio de 5-9% e 6-12%, respectivamente em plantas e amêndoas.

BPCP podem aumentar o crescimento das plantas através de um ou mais dos seguintes mecanismos: produção dos fitohormônios auxinas, citocininas, giberelinas, etileno; produção das enzimas ACC deaminase, quitinase, glucanase; produção de HCN; solubilização de fosfatos e oxidação de sulfatos; eliminação e alteração da microflora deletéria; fixação de nitrogênio e produção de antibióticos extra-celulares (12). Espécies de *Pseudomonas* e *Bacillus* têm sido relatadas como produtoras de hormônios de crescimento de plantas tais como auxinas, giberelinas, citocininas (26). Isolados de *Pseudomonas* que produzem a enzima ACC deaminase, promovem o alongamento e o desenvolvimento precoce de raízes de várias culturas, possibilitando uma melhor absorção de água e nutrientes (16). No presente trabalho não foi detectada a produção de AIA, HCN e solubilização de fosfatos pelos isolados testados, nas condições em que os testes foram desenvolvidos. Isto pode ter ocorrido devido ao nível de detecção dos métodos utilizados ou indica que a promoção de crescimento observada decorreu de outros mecanismos (6).

Poucos são os trabalhos com BPCP na área de fruticultura, particularmente sob o aspecto da interação entre estas bactérias e micropropagação de plantas. Shamsuddin et al. (36) observaram que a aplicação de *Azospirillum* sp. em plantas de banana micropropagadas cultivadas em solo na capacidade de campo, induziu aumentos na concentração de fósforo e potássio no solo e na planta comparado a solos com alta umidade. Os outros trabalhos existentes apenas enfocam o aspecto de controle biológico de doenças pós-colheita como o mofo azul da maçã (40) e podridões em citrus (5) entre outros. Existem produtos biológicos registrados exclusivamente para promoção de crescimento (24). O Bio-Yield<sup>®</sup> contendo a mistura *Paenibacillus macerans* e *Bacillus amyloliquefaciens* é recomendado para uso em sementeiras de tomate e pimentão (20). Já o Messenger<sup>®</sup>, produto contendo a proteína harpina similar àquela codificada por *Erwinia amylovora* é capaz de induzir resistência a diversas doenças em citros e morango entre outras culturas e, também, promover o crescimento pelo aumento da qualidade das colheitas e produtividade (16).

Este estudo vem confirmar outros exemplos de eficiência de isolados de BPCP, sugerindo que os efeitos benéficos deste grupo de bactérias não se limitam ao tratamento de sementes de culturas agrícolas e florestais, mas podem ser expandidos para a produção de plantas micropropagadas, setor economicamente promissor. Para a utilização dos isolados C210, RAB9, ENF10 e ENF16 separados e em misturas na produção de mudas de abacaxi, devem ser considerados a praticidade do método de bacterização e o preparo de formulação adequada. A elucidação dos mecanismos ativos de promoção de crescimento pode ajudar a explicar as interações bactéria-hospedeiro, melhorando a eficiência de aplicação.

## AGRADECIMENTOS

Os autores expressam seus agradecimentos à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro. Os autores agradecem ainda ao Laboratório de Química Vegetal da UFRPE pela disponibilidade para a realização das determinações de macronutrientes.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ARAÚJO, D.V.; MELLO, M.R.F.; MOURA, F.F.; MARIANO, R.L.R.; ASSIS, S.M.P. Ação de bactérias endofíticas e epifíticas no crescimento de plântulas de tomateiro. In: I SIMPÓSIO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO DA UFRPE. Recife. **Resumos...** Recife: Imprensa Universitária. 1997, p.73.
02. ASSIS, S.M.P.; MARIANO, R.L.R.; MICHEREFF, S.J.; COELHO, R.S.B. Biocontrol of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on kale with *Bacillus* spp. and endophytic bacteria. In: WENHUA, T.; COOK, R. J.; ROVIRA. (Eds.). **Advances in biological control of plant diseases**. Beijing: China Agricultural University Press. 1996. p.347-355.
03. ASSIS, S.M.P.; MARIANO, R.L.R.; MICHEREFF, S.J.; SILVA, G.; MARANHÃO, E.A.A. Antagonism of *Bacillus* spp. to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on cabbage phylloplane in the field. In: OGOSHI, A.; KOBAYASHI, K.; HOMMA, Y.; KODAMA, F.; KONDO, N.; AKINO, S. (Eds.). **Plant growth-promoting rhizobacteria – present status and future prospects**. Sapporo: Nakanishi Printing. 1997. p.345-348.
04. BEZERRA NETO, E; ANDRADE, A. G.; BARRETO, L. P. **Análise química de**

**tecidos e produtos vegetais.** Recife: UFRPE, 1994. 99p.

05. BULL, C.T.; WADSWORTH, M.L.; SORENSEN, K. N.; TAKEMOTO, J. Y. AUSTIN, R.K.; SMILANICK, J.L. Syringomycin E produced by biological control agents controls green mold on lemons. **Biological Control**. Califórnia. v.12, p.89-95, 1998.
06. CATTELAN, A.J. **Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal.** Londrina: EMBRAPA-CNPS, 1999. 36p.
07. CEAGEPE. Procedência e quantidade dos produtos comercializados na CEASA-PE. 2000. Recife: Companhia de Abastecimento e Armazéns de Pernambuco. 2000. Disponível em: <<http://www.ceagepe.com.Br>>. Acesso em: 28 jun. 2001.
08. CHEN, Y.; MEI, R.; LIU, L.; KLOEPPER, J. W. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in chinese agriculture. In: UTKHEDE, R.S.; GUPTA, V.K. (Eds.). **Management of soil born diseases.** Ludhiana: Kalyani Publishers, 1996. p.165-184.
09. DASHTI, N.; ZHANG, F.; HYNES, R.; SMITH, D.L. Application of plant growth-promoting rhizobacteria to soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) increases protein and dry matter yield under short-season conditions. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.188, p.33-41, 1997.
10. DE BOER, M.; VAN DER SLUIS, I.; VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M. Combining fluorescent *Pseudomonas* spp. strains to enhance suppression of fusarium wilt of radish. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.105, p. 201-210, 1999.
11. EDGINGTON, L.V.; KHEW, K.L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, St. Paul, v. 61, n.1, p.42-44, 1971.

12. ENEBAK, S.A; WEI, G.; KLOPPER, J.W. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedling. **Forest Science**, Bethesda, v.44, n.1, p. 139-144, 1998.
13. FAO. FAOSTAT - **Agricultural statistics database**. Rome: World Agricultural Information Centre. 2000. Disponível em: <<http://apps.fao.org/lim500/nph-wrap.pl>>. Acesso em: 28 jun. 2001.
14. FITCHET, M. Clonal propagation of Queen and Smooth Cayenne pineapples. **Acta Horticulture**, The Hague, v. 275, p. 261-266, 1990.
15. FOLLIOT, M.; MARCHAL, J. Influence du support de culture sur la croissance in vitro des plantes d' ananas en phase d' acclimatation. **Fruits**, Paris, v.45, n.4, p.367-376, 1990.
16. FRIEDLANDER JR., B.P. Agricultural benefits of harpin protein seem unlimited. [on line]. Cornell: Daily university science news, 2000. Disponível em: <<http://www.unisci.com/stories/20002/0502003.htm>>. Acesso em: 16 abr. 2001.
17. GLICK, B.R. Protecting plants from the effects of ethylene using ACC deaminase - containing plant growth-promoting bacteria. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON PLANT GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA. 2000. Cordoba. **Proceedings...** Auburn: OECD. 2000, p.42.
18. HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFEE, W.F.; KLOPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.43, p. 895-914, 1998.
19. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **SIDRA 97**: sistema IBGE de recuperação automática. [online]. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1999. Disponível em: <<http://www.ibge.gov/pam>>. Acesso em: 22 dez. 2000.

20. KENNEY, D.S.; O'BRIEN, J.B. Delivering PGPR-containing product and application to soiless growing mixes. In: 5<sup>TH</sup> INTERNATIONAL WORKSHOP ON PGPR. 2000. Cordoba. **Proceedings...** Auburn: OECD. 2000, p.39.
21. MATOS, A.P. Pineapple fusariosis in Brasil: an overview. **Fruits**, Paris, v.42, n.10, p.417-421, 1987.
22. MARIANO, R.L.R.; KLOEPPER, J.W. Método alternativo de biocontrole: resistência sistêmica induzida por rizobactérias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.8, p.121-127, 2000.
23. MARIANO, R.L.R.; ASSIS, S.M.P.; SILVEIRA, E.B.; GOMES, A.M.A. Mecanismos de ação bactérias promotoras de crescimento. In: MARIANO, R.L.R. (Coord.). **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: Editora Universitária, 2000. p.139-151.
24. MARIANO, R.L.R.; ASSIS, S.M.P.; SILVEIRA, E.B.; GOMES, A.M.A.; RODRIGUES, V.J.L.B. Biocontrole de doenças de plantas. In: TORRES, B.T.; MICHEREFF, S.J. (Eds.). **Desafios do manejo integrado de doenças e pragas**. Recife: Editora Universitária. 2000, p. 77-109.
25. NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; MARASAS, W.F. **Fusarium species: an illustrated manual for identification**. State University Press, Pennsylvania: 1983, 44p.
26. NOWAK, J. Benefits of *in vitro* "biotization" of plant tissue cultures with microbial inoculants. **In Vitro Cell and Development Biology Plant**, Largo, v.34, p.122-130, 1998.
27. NOWAK, J.; ASIEDU, S.K.; BENSALIM, S.; RICHARDS, J.; STEWART, A.; SMITH, C.; STEVENS, D.; STURZ, A. V. From laboratory to applications:

- challenges and progress with *in vitro* dual cultures of potato and beneficial bacteria. **Plant Cell**, Drentwood, v.50, p.97-103, 1998.
28. PAL, K.K.; BHAFF, D.M.; CHAUHAN, S.M. Plant growth promoting fluorescent pseudomonads enhanced peanut growth, yield and nutrient uptake. In: 5<sup>TH</sup> INTERNATIONAL WORKSHOP ON PGPR. 2000. Cordoba. **Proceedings...** Auburn: OECD. 2000, p.90.
29. PEIXOTO, R.A.; MARIANO, R.L.R.; MICHEREFF, S.J. Ação antagônica de *Pseudomonas aeruginosa* a *Pseudomonas solanacearum* e efeito no desenvolvimento de plântulas de tomate. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v.21, n.3/4, p.219-224, 1995.
30. PIERSON, E.A.; WELLER, D.M. Use of mixtures of fluorescent pseudomonads to suppress Take-all and improve the growth of wheat. **Phytopathology**, St. Paul, v. 84, p.940-947, 1994.
31. PUSEY, P.L.; WILSON, C.L. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 68, n.9, p.753-756, 1984.
32. QUADT-HALLMANN, A.; KLOEPPER, J.W. Immunological detection and localization of the cotton endophyte *Enterobacter asburiae* JM22 in different plant species. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.42, p.1144-1154, 1996.
33. RAUPACH, G.S.; KLOEPPER, J.W. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. **Phytopathology**, St. Paul, v.88, p.1158-1163, 1998.
34. REINHARDT, D.H.R.C.; CUNHA, G.A.P. Métodos de propagação. In: CUNHA, G.A.P.; CABRAL, J.R.S.; SOUZA, L.F.S. (Eds.). **O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia**. Cruz das Almas: EMBRAPA, 1999. p.105-139.

35. SARRUGE, J.R.S.; HAAG, H.P. **Análise químicas em plantas**. Piracicaba: USP – ESALQ, 1974. 56p.
36. SHAMSUDDIN, Z.H.; MARZIAH, M.; ISMAIL, M.R.; YUSOFF, M.K. Beneficial effects of *Azospirillum* inoculation on growth of banana seedlings under different moisture regimes In: OGOSHI, A.; KOBAYASHI, K.; HOMMA, Y.; KODAMA, F.; KONDO, N.; AKINO, S. (Eds.). **Plant growth-promoting rhizobacteria – present status and future prospects**. Sapporo: Nakanishi Printing. 1997. p.194-197.
37. SHISHIDO, M.; CHANWAY, C.P. Spruce growth response specificity after treatment with plant growth-promoting pseudomonads. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 77, p. 22-31, 1998.
38. SIQUEIRA, K.M.S.; OLIVEIRA, G.M.; VASCONCELOS, A.G.; PINHO, P.A.L.; GOMES, A.M.A.; MARIANO, R.L.M.; WILLADINO, L. Promoção de crescimento de mudas de abacaxi através da utilização de bactérias. In: IX CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA. Recife. **Resumos...** Recife: Imprensa Universitária. 1997, p.92.
39. SILVA, G.; SILVA, F.V.; MARIANO, R.L.R.; ASSIS, S.M.P. *Bacillus* spp. no controle da podridão negra e promoção de crescimento de plântulas de rabanete. In: VII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA. 1997. Recife. **Resumos...** Recife: Imprensa Universitária. 1997, p.131.
40. VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; KRETZSCHMAR, A.A.; BORSÓI, M. Avaliação de organismos antagônicos a *Penicillium expansum* em maçã cv. Fuji em pós-colheita. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.17, n.1, p.423-429, 1992.
41. VENTURA, J.A. **Fusariose do abacaxizeiro: caracterização do patógeno, epidemiologia da doença, resistência e micropropagação do hospedeiro *in vitro***.

1994. 111f. (Doutorado em Fitopatologia)- Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa. MG.

42. VENTURA, J.A.; MAFFIA, L.A.; CHAVES, G.M. Field induction of fusariosis in pineapple fruits with *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* Wr. & Reg. **Fruits**, Paris, v.36, n.11, p.707-710, 1981.

Quadro 1 - Isolados bacterianos utilizados na promoção de crescimento de mudas de abacaxi micropropagadas cv. Pérola.

Isolados	Hospedeiro/Origem	Identificação
C11	Couve/Epifítica	<i>Bacillus</i> sp. (Cohn)
C21	Couve/Epifítica	<i>Bacillus</i> sp. (Cohn)
C210	Couve/Epifítica	<i>Bacillus cereus</i> (Cohn)
E2	Couve flor/Endofítica	N. I. <sup>1</sup>
EN5	Feijão/Endofítica	<i>Alcaligenes piechaudii</i> (Kiredjian)
ENF2	Feijão/Endofítica	N. I.
ENF4	Feijão/Endofítica	N. I.
ENF5	Feijão/Endofítica	N. I.
ENF10	Feijão/Endofítica	<i>B. thuringiensis</i> subvar. <i>Kurstakii</i> (Berlinev)
ENF12	Feijão/Endofítica	N. I.
ENF14	Feijão/Endofítica	<i>Enterobacter cloacae</i> (Hormaeche & Edwards)
ENF16	Feijão/Endofítica	<i>B. pumilus</i> (Meyer & Gotheir)
ENF17	Feijão/Endofítica	N. I.
ENF19	Feijão/Endofítica	N. I.
IN937A	.....	<i>B. amyloliquefaciens</i> (Priest)
JM339	.....	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> (Guignard & Sauvagean)
R14	Repolho/Epifítica	<i>B. subtilis</i> (Cohn)
RAB7	Rabanete/Epifítica	<i>B. megaterium</i> pv. <i>Cerealis</i> (Hosford)
RAB9	Rabanete/Epifítica	<i>Bacillus</i> sp. (Cohn)

<sup>1</sup>N. I. = Não identificado

Quadro 2 – Seleção de bactérias para promoção de crescimento de mudas de abacaxi micropropagadas cv.

Pérola.

Tratamentos	Métodos de bacterização							
	Infestação do substrato + Pulverização das folhas				Infestação do substrato + Imersão de raízes			
	AL <sup>1</sup> (cm)	NF	MSA(g)	MSR(g)	AL(cm)	NF	MSA(g)	MSR(g)
C210 <sup>2</sup>	6,1 <sup>3</sup> ab		9,3a	1,5a	4,8bcd	7,2abcd	2,9abc	0,7ab
ENF5	4,2bcdef	8,5a	2,4bc	0,3bcd	7,7fg	8,0abc	2,8ab	0,7ab
ENF19	7,7a	8,2ab	3,4b	2,5bcd	5,5bc	8,2ab		0,4abcd
E2	4,8bcde	7,7abc	2,5bc	0,5bcd	5,7b	10,0a	3,6ab	
ENF10	5,4bcd	7,5abc	3,2bc	0,6bc	9,6a	7,7abcd	2,9abc	
ENF16	3,3defgh	7,0abcd	1,0bc	0,3bcd	3,9a		1,4abc	0,1abcd
ENF4	5,6abc	7,0abcd	3,3bc	0,4bcd	5,6bcdef	6,0bcde	3,4bc	0,7d
ENF2	1,8ghi	6,5abcd	1,4bc	0,2cd	1,9bc	8,2bcde	2,3ab	0,4ab
ENF12	3,8cdefgh	6,2abcd	3,1bc	0,7b	3,5fg	5,0ab	2,6abc	0,7abcd
EN5	3,9abcd	6,2e	2,4defgh	0,5bc	fg	6,2e	2,8abc	0,6ab
RAB9	1,5hi	6,0bcd	1,6bc	0,3bcd	3,5bcde	8,0ab		0,2abc
ENF14	2,2fghi	6,0bcd	0,9c	0,2cd	4,3bcde	6,0abcde	2,9abc	0,7abc
RAB7	1,5hi	5,7bcd	1,1bc	0,1d	1,9efg	5,5cde	1,1bc	0,1d
JM339	2,4efgh	5,7bcd	1,1bc	0,1d	3,6bcdefg	7,0bcde	3,6abc	0,3bcd
IN937A	2,4fghi	5,7bcd	1,7bc	0,5bcd	2,2efg	6,0bcde	2,2abc	0,3bcd
ENF17	3,8cdefgh	5,2cd	1,4bc	0,2cd	3,1defg	5,7cd	3,1abc	0,2cd
R14	3,6cdefg	4,7b	1,5bc	0,2cd	2,8defg	4,7d	2,8abc	0,5abcd
Testemunha	0,9i	5,5cd	0,9c	0,3bcd	1,6g	5,2de	1,6c	0,1d

<sup>1</sup>AL = altura da planta, NF = número de folhas, MSA = matéria seca da parte aérea, MSR = matéria seca das raízes.

<sup>2</sup>C210 = *B. cereus*; EN5 = *Alcaligenes piechaudii*; E2, ENF2, ENF4, ENF5, ENF10, ENF12, ENF14, ENF16, ENF17 e ENF19 = não identificados; IN937A = *B. amyloliquefaciens*; JM339 = *Pseudomonas chlororaphis*; R14 = *B. subtilis*; RAB9 = *Bacillus* sp.

<sup>3</sup>Média de seis repetições, representadas por uma planta. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P=0,05).

Quadro 3 – Seleção de métodos de bacterização para promoção de crescimento de mudas de abacaxi micropropagadas cv. Pérola.

Métodos	MSA <sup>1</sup> (g)	MSR(g)	AF(cm <sup>2</sup> )
Infestação do substrato	133,7 <sup>2</sup> b	46,1b	45,0bc
Imersão de raízes	166,3a	52,3	52,1a
Pulverização das folhas	136,1b	52,0ab	39,2cd
Infestação do substrato + Imersão de raízes	164,7a	58,1a	45,9ab
Infestação do substrato + Pulverização das folhas	137,1b	54,4ab	38,1d
C.V. (%)	20,9	34,2	30,1

<sup>1</sup> MSA = matéria seca da parte aérea, MSR = matéria seca das raízes, AF = área foliar.

<sup>2</sup> Média de seis repetições, representadas por uma planta. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P=0,05).

Quadro 4 – Promoção de crescimento de mudas de abacaxi micropropagadas cv. Pérola, utilizando-se dois métodos de bacterização.

Tratamentos	Métodos de bacterização									
	Imersão de raízes					Infestação do substrato + Imersão de raízes				
	AL <sup>1</sup> (cm)	NF	MSA (g)	MSR (g)	AF (cm <sup>2</sup> )	AL (cm)	NF	MSA (g)	MSR (g)	AF (cm <sup>2</sup> )
C210 <sup>2</sup>	3,2 <sup>3</sup> abc	8,3ab	146,7b	43,3a	57,6ab	3,7a	8,0ab	181,7a	65,0a	53,6ab
ENF5	3,7a	8,5ab	201,7ab	61,7a	63,5a	3,5ab	9,0 <sup>a</sup>	170,0a	68,3a	43,9abc
ENF19	3,2abc	9,0ab	171,7ab	51,7a	50,2abc	3,1bc	7,5ab	138,3ab	55,0a	36,3abc
E2	3,1bc	7,7b	158,3b	43,3a	44,9abc	3,2ab	8,5ab	168,3a	68,3a	59,6a
ENF12	3,3abc	8,3ab	146,7b	53,3a	39,1bc	3,3ab	9,3a	168,3a	63,3a	45,4abc
ENF4	3,4ab	9,0ab	156,7b	40,0a	49,8abc	3,4ab	8,7a	178,3a	60,0a	50,0abc
ENF16	3,4ab	9,7a	180,0ab	56,7a	59,8ab	3,2ab	8,5ab	163,3ab	58,3a	49,0abc
RAB9	3,4ab	9,5ab	221,7a	75,0a	56,5ab	3,4ab	8,8a	190,0a	56,7a	52,1ab
ENF10	3,4ab	8,8ab	173,3ab	65,0a	60,2ab	3,0bc	6,7bc	153,3ab	50,0a	34,2bc
Testemunha	2,8c	5,3c	78,3c	25,0a	30,2c	2,7c	5,5c	108,3b	26,7a	26,9c
C.V. (%)	9,0	12,9	20,9	34,2	30,1	9,0	12,9	20,9	34,2	30,1

<sup>1</sup>AL = altura da planta, NF = número de folhas, MSA = matéria seca da parte aérea,

MSR = matéria seca das raízes, AF = área foliar

<sup>2</sup>C210 = *B. cereus*; E2, ENF4, ENF5, ENF10, ENF12, ENF16 e ENF19 = não identificados; RAB9 = *Bacillus* sp.

<sup>3</sup>Média de seis repetições, representadas por uma planta. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P=0,05).

Quadro 5 – Aumento da biomassa de mudas de abacaxi micropropagadas cv. Pérola, bacterizadas pelos métodos de imersão de raízes e imersão de raízes + infestação do substrato, calculado em relação à testemunha não bacterizada.

Bactérias	Imersão de raízes			Infestação do substrato + Imersão de raízes		
	AMSA <sup>1</sup> (%)	AMSR(%)	AAF (%)	AMSA(%)	AMSR(%)	AAF (%)
C210 <sup>2</sup>	87,3 <sup>3</sup>	73,2	90,7	67,1	144,4	99,2
ENF5	157,6	146,8	110,3	57,0	155,8	63,2
ENF19	119,3	106,8	66,2	27,7	106,0	34,9
E2	102,2	73,2	48,7	55,4	155,8	121,6
ENF12	87,3	113,2	29,4	55,4	137,1	68,8
ENF4	100,1	60,0	64,9	64,6	124,7	85,9
ENF16	129,9	126,8	96,0	50,8	118,3	82,1
RAB9	183,1	200,0	87,1	75,4	112,3	93,7
ENF10	121,3	160,0	99,3	41,5	87,3	27,1

<sup>1</sup>AMSA = aumento de matéria seca da parte aérea, AMSR = aumento de matéria seca das raízes, AAF = aumento de área foliar

<sup>2</sup>C210 = *B. cereus*; E2, ENF4, ENF5, ENF10, ENF12, ENF16 e ENF19 = não identificados; RAB9 = *Bacillus* sp.

<sup>3</sup>Valores calculados de acordo com a fórmula de Edginton (11), adaptada.

Quadro 6 - Promoção de crescimento de mudas de abacaxi micropropagadas cv. Pérola, bacterizadas através do método de imersão de raízes.

Tratamentos	Imersão de raízes				
	AL <sup>1</sup> (cm)	NF	MSA(g)	MSR(g)	AF (cm <sup>2</sup> )
C210 <sup>2</sup>	3,2 <sup>3</sup> abc	7,4a	152,0a	49,0a	40,3a
ENF5	3,0bc	7,1a	151,0a	41,0a	38,9a
ENF16	3,3ab	19,2a	159,0a	44,0a	42,0a
RAB9	3,3ab	8,5a	174,0a	54,0a	44,5a
ENF10	3,4a	7,6a	171,0a	47,0a	43,1a
Testemunha	2,9c	6,0a	66,0b	26,0a	23,8a
C.V. (%)	8,3	19,8	15,5	25,3	24,8

<sup>1</sup>AL = altura da planta, NF = número de folhas, MSA = matéria seca da parte aérea, MSR = matéria seca das raízes, AF = área foliar

<sup>2</sup>C210 = *B. cereus*; ENF5, ENF10 e ENF16 = não identificados; RAB9 = *Bacillus* sp.

<sup>3</sup>Média de seis repetições, representadas por uma planta. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey (P=0,05).

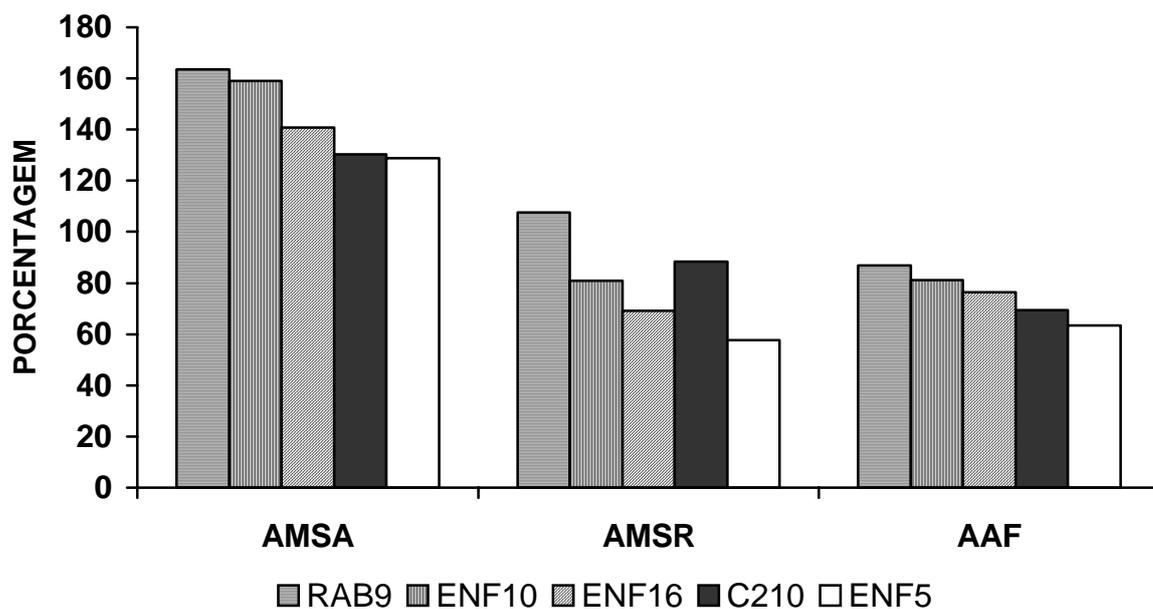


Figura 1 – Aumento da biomassa de mudas de abacaxi micropropagadas cv. Pérola, bacterizadas pelo método de imersão de raízes, calculado em relação à testemunha não bacterizada, de acordo com a fórmula de Edginton (11), adaptada. AMSA = aumento de matéria seca da parte aérea, AMSR = aumento de matéria seca das raízes, AAF = aumento de área foliar. C210 = *B. cereus*; ENF5, ENF10 e ENF16 = não identificados; RAB9 = *Bacillus* sp.

Quadro 7 - Quantidades dos macronutrientes N, P e K ( $\text{g.kg}^{-1}$ ) em mudas de abacaxi micropropagadas cv. Pérola, bacterizadas com diferentes isolados através dos métodos de imersão de raízes e infestação do substrato + imersão de raízes.

Tratamentos	Imersão de raízes			Infestação do substrato + Imersão de raízes		
	N <sup>1</sup>	P	K	N	P	K
C210 <sup>2</sup>	3,0 <sup>3</sup> a	1,6a	31,7a	3,1a	1,7a	43,6a
ENF5	2,9a	1,0a	35,0a	3,1a	1,7a	43,6a
ENF16	2,5a	1,7a	36,5a	2,2b	1,3a	32,8a
RAB9	2,6a	1,6a	35,8a	2,9ab	1,8a	35,9a
ENF10	2,2a	1,2a	27,7a	2,6ab	2,3a	26,3a
Testemunha	0,6b	0,6a	21,3a	1,2c	1,0a	29,8a
C.V. (%)	29,8	36,8	36,5	29,8	36,8	36,5

<sup>1</sup>N = Nitrogênio, determinado pelo método de Kjeldahl; P = Fósforo, determinado pelo método colorimétrico do molibdo – vanadato de amônio e K = Potássio, determinado através da fotometria de chamas (4, 34).

<sup>2</sup>C210 = *B. cereus*; ENF5, ENF10 e ENF16 = não identificados; RAB9 = *Bacillus* sp.

<sup>3</sup>Média de seis repetições, representadas por uma planta. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P=0,05).

Quadro 8 - Promoção de crescimento de mudas de abacaxi micropropagadas cv. Pérola, utilizando-se o método de imersão de raízes em suspensões bacterianas em misturas e separadamente, 30 dias após a bacterização.

Tratamentos	MSA <sup>1</sup> (g)	MSR(g)	AF(cm <sup>2</sup> )
C210 <sup>2</sup>	193,7 <sup>3</sup> bc	53,7ab	9,0b
ENF16	212,5abc	51,2ab	12,3ab
RAB9	167,5bc	38,7ab	8,2b
ENF10	191,2bc	46,2ab	11,4ab
ENF10+ RAB9	187,5bc	62,5a	9,0b
ENF16+C210	180,0bc	58,7a	13,0ab
C210+RAB9	192,5bc	56,2a	8,7b
ENF16+RAB9	216,2ab	53,7ab	9,0b
ENF10+C210	226,2ab	53,7ab	17,9a
C210+RAB9+ENF10+ENF16	268,7a	53,7ab	14,7ab
ENF10+ENF16	223,7ab	50,0ab	11,1ab
Testemunha	153,7c	31,2b	9,8b
C.V. (%)	17,9	28,3	37,5

<sup>1</sup>MSA = matéria seca da parte aérea, MSR = Matéria seca das raízes, AF = Área foliar

<sup>2</sup>C210 = *B. cereus* ; ENF10 e ENF16 = não identificados; RAB9 = *Bacillus* sp.

<sup>3</sup>Média de oito repetições, representadas por uma planta. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P=0,05).

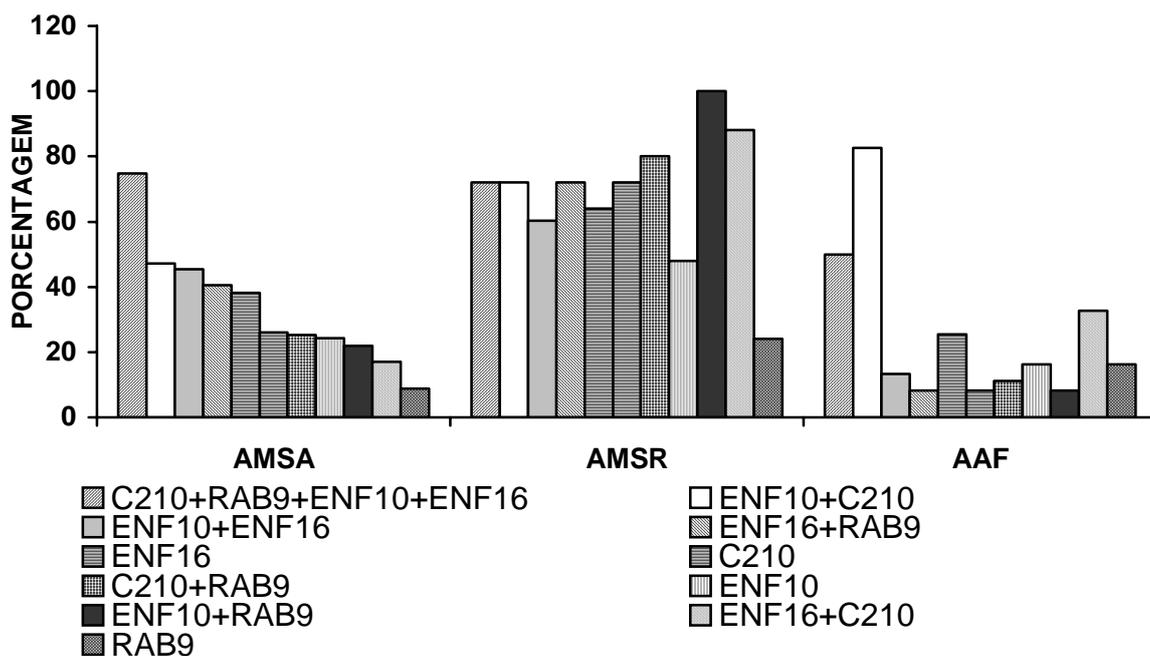


Figura 2 – Aumento da biomassa de mudas de abacaxi micropropagadas cv. Pérola, utilizando-se o método de imersão de raízes com suspensões bacterianas em misturas e separadamente, calculado em relação à testemunha não bacterizada, de acordo com a fórmula de Edginton (11), adaptada. AMSA = aumento de matéria seca da parte aérea, AMSR = aumento de matéria seca das raízes, AAF = aumento de área foliar. C210 = *B. cereus*; ENF10 e ENF16 = não identificados; RAB9 = *Bacillus* sp.

**Capítulo III**

**EFEITO DE BACTÉRIAS SOBRE A FUSARIOSE EM MUDAS DE  
ABACAXI MICROPROPAGADAS**

**Efeito de bactérias sobre a fusariose em mudas de abacaxi micropropagadas\***

Marcelo R. F. de Mello<sup>1\*\*</sup>, Rosa L. R. Mariano<sup>1\*\*\*</sup>, Maria Menezes<sup>1\*\*\*</sup>, Sayonara M. P.

Assis<sup>2\*\*\*</sup>

<sup>1</sup>UFRPE, Departamento de Agronomia - Fitossanidade, CEP 52171-900, Recife, PE, Brasil, E-mail: rmariano@truenet.com.br

<sup>2</sup>UFRPE, Departamento de Biologia - Botânica, CEP 52171-900, Recife, PE. Brasil

\*Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fitossanidade da Universidade Federal Rural de Pernambuco

\*\*Bolsista da CAPES, \*\*\*Bolsista do CNPq

Aceito para publicação em...

---

**RESUMO**

Mello, M.R.F.; Mariano, R.L.R.; Menezes, M.; Assis, S.M.P. Efeito de bactérias sobre a fusariose em mudas de abacaxi micropropagadas. *Summa Phytopathologica*

Mudas de abacaxi cv. Pérola micropropagadas, não aclimatadas, foram bacterizadas com 19 isolados endofíticos e epifíticos através de imersão de raízes ou pulverização de folhas destacadas e não destacadas. O patógeno foi inoculado após quatro dias através de ferimentos nas raízes e deposição de 40 ml de inóculo ( $10^6$  conídios.ml<sup>-1</sup>) ou ferimentos com pulverização do inóculo na base das folhas, para os métodos de imersão de raízes e pulverização das folhas, respectivamente. Após 60 dias, foram avaliados o número de folhas infectadas e a severidade da doença com base nos sintomas internos e nas lesões foliares de escala de notas. Foram ainda calculados os índices de doença para sintomas internos, para lesões foliares e a redução da severidade

da doença em relação à testemunha. A produção de HCN, celulase, pectinase, antibiose e competição por ferro foram analisadas como mecanismos de biocontrole. No primeiro experimento, utilizando a imersão de raízes, os isolados ENF12 (não identificado), C21 (*Bacillus* sp.), C11 (*Bacillus* sp.), ENF14 (*Enterobacter cloacae*), C210 (*B. cereus*) e IN937A (*Pseudomonas chlororaphis*) diferiram significativamente ( $P=0,05$ ) da testemunha com relação às notas atribuídas para cada planta, embora não diferissem do controle com benomil. ENF12, C21 e benomil reduziram a severidade da doença em 85,2; 79,1 e 88,0% respectivamente, em relação a testemunha. No segundo experimento, utilizando a pulverização de folhas destacadas com os biocontroladores, EN5 (*Alcaligenes piechaudii*) diferiu significativamente ( $P=0,05$ ) da testemunha quanto ao índice de doença com uma RSD de 90,2%. No terceiro experimento, utilizando a pulverização dos biocontroladores em plantas, apenas ENF14 diferiu significativamente ( $P=0,05$ ) da testemunha para todos os índices, reduzindo a severidade da doença em 55,6; 39,4 e 68,4 considerando, respectivamente, índice de doença para lesões foliares, número de folhas infectadas e índice de doença para sintomas internos. Nenhum isolado produziu celulase, pectinase ou HCN. No entanto, C210, R14, ENF19, ENF14, C11 e C21 inibiram o crescimento do patógeno “in vitro” por antibiose. Na competição por ferro foi demonstrado que os isolados C210 e C11 apresentaram reversão da inibição do crescimento micelial do patógeno apenas no nível de 50 ppm de  $\text{FeCl}_3$  enquanto que, EN5 apresentou reversão já no nível de 20 ppm. Os outros isolados não apresentaram diferenças significativas ( $P=0,05$ ) entre os níveis de ferro, embora todos tenham diferido da testemunha em todos os níveis. Os resultados apontam o isolado *E. cloacae* ENF14 como potencial biocontrolador para a fusariose do abacaxizeiro. No entanto, recomendam-se testes com misturas dos isolados ENF14, EN5, C210 e C21 que agem por mecanismos distintos, utilizando-se a bacterização por pulverização das folhas.

Palavras-chave adicionais: *Ananas comosus*, bactérias promotoras de crescimento, BPCP, controle biológico, *Fusarium subglutinans*, mecanismos de ação de biocontroladores.

---

## ABSTRACT

Mello, M.R.F.; Mariano, R.L.R.; Menezes, M.; Assis, S.M.P. Effect of bacteria on the fusariosis in micropropagated pineapple plants. *Summa Phytopathologica*

*Plantlets of pineapple cv. Pérola micropropagated and not acclimated were treated with 19 endophytic and epiphytic bacterial strains through root dipping and spraying of attached and detached leaves. The pathogen was inoculated after 4 days by wounding roots and pouring 40 mL of suspension ( $10^6$  conidia.mL<sup>-1</sup>) or by wounding leaf bases and spraying suspension, respectively for the bacterization methods root dipping and spraying. After 60 days the number of infected leaves was counted and disease severity evaluated based on internal symptoms and foliar lesions according to a grade scale. Disease indexes and disease severity reduction were calculated in relation to controls. The production of HCN, cellulase, pectinase, antibiosis and iron competition were analyzed as mechanisms for biocontrol. In the first experiment when root dipping was used the isolates ENF12 (not identified), C21 (*Bacillus* sp.), C11 (*Bacillus* sp.), ENF14 (*Enterobacter cloacae*), C210 (*B. cereus*) and IN937A (*Pseudomonas chlororaphis*) significantly differ ( $P=0,05$ ) from the control in relation to disease grade averages however they did not differ from the benomyl treatment. ENF12, C21 and benomyl showed disease severity reduction of 85,2; 79,0 and 88,0% respectively, in relation to control without treatment. In the second experiment using bacteria to spray detached leaves, disease index was significantly reduced ( $P=0,05$ ) by EN5 (*Alcaligenes**

*piechaudii*) which promoted disease severity reduction of 90,2%. In the third experiment when the bacteria were sprayed onto attached leaves, only ENF14 reduced significantly ( $P=0,05$ ) the disease severity in 55,6; 39,4 and 68,4 % respectively in relation to foliar symptoms, number of infected leaves and internal symptoms. None of the isolates produced cellulase, pectinase or HCN. However C210, R14, ENF19, ENF14, C11 and C21 inhibited the pathogen growth “in vitro” by antibiosis. In relation to iron competition the isolates C210 and C11 only showed reversion of inhibition of the pathogen mycelial growth at 50 ppm of  $FeCl_3$  but EN5 presented reversion at 20 ppm. The other isolates did not show significant differences ( $P=0,05$ ) among iron levels although all of them differed from control in all iron levels. The results point *E. cloacae* ENF14 as a potential biocontroler for pineapple fusariosis. However experiments by leaf spraying with mixtures of isolates ENF14, EN5, C210 e C21 that act by distinct mechanisms are recommended.

*Additional keywords:* Ananas comosus, biological control, plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR, Fusarium subglutinans, mechanisms of action of biocontrolers.

---

A fusariose do abacaxizeiro causada pelo fungo *Fusarium subglutinans* (Wollenw & Reinking)(=*Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*) (29) é responsável por perdas de 30% a 40% de plantas e frutos e 15% a 20% de mudas (43, 44). O abacaxizeiro é propagado vegetativamente por meio de mudas que contem todo o potencial genético da espécie sendo importante veículo na disseminação de doenças entre as quais a fusariose. Portanto, a qualidade e sanidade do material de propagação assumem grande importância no cultivo e sucesso da exploração do abacaxi (34).

A técnica de micropropagação a partir do cultivo de explantes obtidos de meristemas e de gemas axilares é uma alternativa viável para a produção massal de

material propagativo sadio, de alta qualidade e uniforme, não só para a multiplicação de mudas sadias das cultivares comerciais ‘Pérola’ e ‘Smooth Cayenne’, mas também para obtenção de variedades e híbridos resistentes à fusariose, permitindo a multiplicação rápida dos clones selecionados (10, 24).

No Brasil, as cultivares mais utilizadas, Pérola e Smooth Cayenne, apresentam alta suscetibilidade à fusariose causada por *F. subglutinans* (43), considerada a doença de maior importância econômica para o abacaxizeiro no país. Esta doença, também conhecida como gomose, resinose ou resina fúngica, causa podridão nos frutos e infecta todas as partes da planta, ocorrendo em todos os seus estádios de desenvolvimento, inclusive nas mudas do tipo filhote, coroa e rebentão. As plantas infectadas apresentam lesões, geralmente no terço inferior do caule, e as folhas inseridas nesta região apresentam infecção restrita à sua parte basal não-clorofilada (43). A maturidade dos tecidos das folhas é extremamente importante na infecção e colonização, verificando-se maior resistência nos tecidos maduros na região clorofilada (43). Com o desenvolvimento da lesão no caule, observa-se uma redução no fluxo da seiva, resultando em enfezamento, clorose, murcha e morte da planta. Além da lesão do caule, a planta infectada pode expressar também sintomas externos como curvatura e encurtamento do caule, redução no comprimento das folhas, morte do meristema apical, afunilamento e morte da planta. No material propagativo, os sintomas caracterizam-se por lesão no caule, exsudação de goma e infecção na parte aclorofilada. No fruto, observa-se a exsudação de goma na cavidade floral, com apodrecimento da polpa na região infectada. Embora estes sintomas possam ser observados com maior intensidade a partir do final da floração, é na fase de maturação que eles tornam-se mais evidentes (23).

*Fusarium subglutinans* pode sobreviver em material propagativo infectado ainda aderido a planta mãe, restos culturais e epifiticamente nas folhas do abacaxizeiro. Mudanças infectadas constituem o principal agente de disseminação da fusariose, seja à longa distância, de uma região para outra, seja dentro da mesma região produtora. A penetração do fungo na planta ou mudas ocorre através de ferimentos resultantes de rachaduras e fendilamentos do processo normal de crescimento da planta ou causados pela ação de agentes bióticos ou abióticos (25). A infecção nos frutos tem início nas flores durante a antese ou quando existem ferimentos. O período de maior suscetibilidade da inflorescência do abacaxizeiro a *F. subglutinans* ocorre entre a quarta e a décima semana após a indução floral e as flores abertas constituem os principais sítios de infecção (26, 44).

Mudas tratadas com bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) podem ter melhor adaptação em condições de estresse, como o que ocorre no período de aclimação. Bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP) são bactérias que colonizam os tecidos das plantas, exercendo um efeito benéfico no desenvolvimento e sanidade das mesmas (14). As BPCP atuam tanto pelo controle biológico de doenças, vetores e pragas, como diretamente pela promoção de crescimento aumentando a produtividade e desenvolvimento das plantas (21). Estas bactérias podem ser encontradas tanto epifiticamente, na superfície de plantas, como endofiticamente, ou seja em seu interior. Dentre as bactérias epifíticas destacam-se os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* spp. fluorescentes. Os gêneros mais comuns de bactérias endofíticas são *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Phyllobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia* e *Klebsiella* (11). Essas bactérias têm a capacidade de colonizar o nicho ecológico de diversos patógenos de plantas, principalmente os vasculares, apresentando efeito significativo no controle de diversas doenças (11). Neste controle podem estar envolvidos um ou mais mecanismos como

antibiose, produção de ácido cianídrico, sideróforos, indução de resistência e enzimas que degradam a parede celular, produção de ácido salicílico (22) e competição por ácidos graxos (41).

A interação entre BPCP e a fusariose em mudas de abacaxi tem sido pouco estudada, entretanto foi relatado que *Bacillus cereus*, isolado C240 aplicado através do método de imersão de raízes na fase de pós-aclimação, aumentou a biomassa de mudas desta bromeliácea induzindo aumentos de 156,7% no peso seco da parte aérea, 56,4% no peso seco das raízes e 30,94% na área foliar (39). Além disso, *Bacillus* sp. isolado RAB9 e *B. cereus* C210 já demonstraram eficiência no controle biológico de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* em couve (2) e repolho respectivamente (4). Estes isolados são capazes de formar endosporos, os quais permitem a sobrevivência e atividade metabólica sob condições adversas (37).

O objetivo deste trabalho foi testar o efeito de isolados bacterianos sobre a fusariose em mudas de abacaxi micropropagadas e analisar os mecanismos de ação dos isolados mais eficientes.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **Obtenção de mudas de abacaxi micropropagadas, isolados bacterianos e do patógeno**

As mudas de abacaxi micropropagadas da cv. Pérola, uniformes e não aclimatadas foram obtidas do Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Química da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Foram utilizados 19 isolados bacterianos endofíticos e epifíticos, provenientes da coleção do Laboratório de Fitobacteriologia do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de

Pernambuco, preservados em água de torneira esterilizada (Quadro 1). Os isolados foram cultivados a 27 °C por 48 h em meio NYDA (Ágar nutritivo/Extrato de levedura/Dextrose) (33) e preservados por repicagens periódicas em tubos com NYDA durante o decorrer do experimento. As suspensões bacterianas foram preparadas em água destilada esterilizada (ADE) contendo uma gota de Tween 80 a 0,05%, sendo ajustadas para  $A_{590} = 0,7$ .

O isolado de *Fusarium subglutinans* foi obtido do Laboratório de Patologia de Pós-Colheita do Departamento de Agronomia da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Para o teste de patogenicidade, o fungo foi cultivado em meio BDA (batata-dextrose-ágar) por sete dias, sendo então repicado para o meio líquido de Armstrong (1) onde cresceu por sete dias, com agitação manual diária, em condições de laboratório, a aproximadamente  $25 \pm 3$  °C. A suspensão foi obtida diluindo-se o meio contendo as estruturas do patógeno com ADE e quantificada em câmara de Neubauer e ajustada para a concentração de  $10^6$  conídios.ml<sup>-1</sup>.

Em todos os experimentos onde houve testemunha com fungicida, o benomil foi utilizado na concentração de 750 ppm.

### **Efeito de bactérias sobre a fusariose em mudas de abacaxi micropropagadas**

#### **Método de imersão de raízes**

Em condições de casa-de-vegetação, foram testadas 18 isolados bacterianos, utilizando-se o método de imersão de raízes em 10 ml da suspensão bacteriana por 30 minutos, seguindo-se o plantio em substrato constituído de solo esterilizado:húmus (2:1). Após quatro dias, as mudas foram inoculadas por ferimento nas raízes. Neste

método, com o auxílio de um estilete, foi realizado um corte superficial das raízes em forma de meia lua e depositados 40 ml da suspensão do inóculo por planta.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 20 tratamentos, representados por 18 isolados bacterianos, um fungicida (benomil), uma testemunha relativa (apenas com o patógeno), com seis repetições por tratamento, sendo a unidade experimental constituída por uma planta.

As plantas foram incubadas em condições de casa de vegetação e a avaliação ocorreu 60 dias após a inoculação, cortando-se a planta longitudinalmente e considerando-se como base da planta, a região desde o início das raízes até a emergência da folha mais nova. Os sintomas internos foram comparados com escala de notas onde: 0 = sem sintomas; 1 = necrose e apodrecimento estendendo-se até 20% da base da planta; 2 = necrose e apodrecimento estendendo-se até 50% da base da planta; 3 = necrose e apodrecimento estendendo-se até 80% da base da planta; 4 = necrose e apodrecimento estendendo-se até 100% da base da planta (Figura 1A).

### **Efeito de bactérias sobre a fusariose em mudas de abacaxi micropropagadas**

#### **Método de pulverização de folhas destacadas**

Em condições de laboratório, foram testadas 18 bactérias, utilizando folhas destacadas de mudas de abacaxi micropropagadas, mantidas em caixas Gerbox a  $25 \pm 3$  °C. A bacterização foi realizada através da pulverização das folhas, com 5 mL da suspensão bacteriana contendo uma gota do espalhante adesivo Tween 80 a 0,05% para cada grupo de quatro folhas com aproximadamente 8cm x 3cm em cada caixa Gerbox. A inoculação foi realizada 3 horas após a bacterização, através de ferimentos seguidos de pulverização. Neste método, a base de cada folha foi perfurada com um conjunto de

quatro alfinetes e as quatro folhas foram pulverizadas com 5 mL da suspensão do inóculo.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 20 tratamentos, representados por 18 isolados bacterianos, um fungicida (benomil), uma testemunha relativa (apenas com o patógeno), com quatro repetições por tratamento, sendo a unidade experimental constituída por uma caixa com quatro folhas.

As plantas foram incubadas em condições de laboratório e a avaliação ocorreu três dias após a inoculação, quando foram observados os primeiros sintomas. Utilizou-se uma escala de notas onde: 0 = sem sintomas; 1 = sintoma restrito a área perfurada; 2 = sintoma estendendo-se de 1-2 mm além da área perfurada; 3 = sintoma estendendo-se de 2-3 mm além da área perfurada; 4 = sintoma estendendo-se mais de 3 mm além da área perfurada (Figura 1B). Com base nas notas obtidas foi calculado o índice de doença segundo McKINNEY (27), através da fórmula  $ID\% = \frac{\sum(\text{grau da escala} \times \text{frequência}) \times 100}{n^\circ \cdot \text{total de unidades} \times \text{grau máximo da escala}}$ .

### **Efeito de bactérias sobre a fusariose em mudas de abacaxi micropropagadas**

#### **Método de pulverização de folhas não destacadas**

Foram testadas oito bactérias, selecionadas com base nos dois experimentos anteriores e no ensaio de antibiose. Na bacterização utilizou-se a pulverização das folhas dirigida para a base das mesmas, com 10 mL da suspensão bacteriana contendo uma gota do espalhante adesivo Tween 80 a 0,05%. Após 4 dias, as mudas foram inoculadas através de ferimentos seguidos de pulverização. Neste método, similarmente ao das folhas destacadas, a base das folhas foi ferida com alfinete, e pulverizada com 10 ml da suspensão do inóculo por planta.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 10 tratamentos, representados por oito isolados bacterianos, um fungicida benomil e uma testemunha relativa (apenas com o patógeno), com quatro repetições por tratamento, sendo a unidade experimental constituída por cinco plantas.

As plantas foram incubadas em condições de casa de vegetação e a avaliação ocorreu 30 dias após a inoculação, através das variáveis IDF = índice de doença calculado com base em escala de notas para lesões foliares (Figura 1B); NFI = número de folhas infectadas e IDI = índice de doença calculado com base em escala de notas para sintomas internos (Figura 1A).

### **Análise estatística**

Para análise estatística foi usado o programa SANEST e a comparação de médias foi feita pelo teste de Tukey ( $P=0,05$ ). Com base nas notas obtidas foi calculado o índice de doença segundo McKINNEY (27), através da fórmula  $ID\% = \frac{\sum(\text{grau da escala} \times \text{freqüência}) \times 100}{n^{\circ} \text{ total de unidades} \times \text{grau máximo da escala}}$ . A redução da severidade da doença foi calculada pela fórmula adaptada de EDINGTON et al. (9)  $RSD\% = \frac{(IDT - IDTr)}{IDT} \times 100$ , onde IDT = índice de doença no tratamento e IDTr = índice de doença na testemunha.

### **Mecanismos de ação das BPCP utilizados no controle biológico**

Todos os isolados utilizados foram testados quanto aos mecanismos de antibiose, produção de HCN, celulase e pectinase. A competição por ferro foi analisada apenas para os oito isolados testados no terceiro experimento. Em todos os ensaios utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamentos, sendo a unidade experimental constituída por uma placa de Petri.

Na produção de HCN, as bactérias foram cultivadas em placas de Petri com meio TSA 1/10 (Tryptic soy agar) adicionando-se 4,4 g de glicina por litro de meio. Tiras de papel de filtro impregnadas com solução de ácido pícrico foram colocadas sobre as colônias, na tampa das placas. A mudança de cor nas tiras de papel, do amarelo cítrico para laranja ou marrom, evidencia a produção do HCN (22).

Para testar a produção de celulase, os isolados foram cultivados em placas de Petri com meio TSA 1/10 suplementado com 10 g de celulose em pó por litro de meio. Após oito dias de incubação a 28-30° C, as colônias que formam halo claro ao seu redor são consideradas produtoras de celulase ou solubilizadoras de celulose (7).

Na avaliação da antibiose, os isolados bacterianos foram cultivados em meio NYDA por 24-48 h, sendo retirado um pouco do crescimento com uma alça de platina e realizada uma risca no centro da placa de Petri. O patógeno *F. subglutinans* foi cultivado por sete dias em meio BDA, retirando-se discos com 6 mm contendo estruturas das extremidades das colônias, os quais foram pareados com o crescimento bacteriano. A avaliação foi realizada aos sete dias através da medição do halo de inibição do crescimento do patógeno (22).

Para a pectinase, os isolados foram cultivados em placas de Petri com meio M9 suplementado com 1,2 g de extrato de levedura e 4 g de pectina por litro. Após dois dias de incubação a  $28 \pm 30$  °C, as colônias foram retiradas com uma mecha de algodão e adicionada uma solução de HCl 2N até cobrir completamente o meio. As colônias que formam halo claro após a reação ácida são consideradas produtoras de pectinase (7).

Na competição por ferro, foi utilizado o meio King B líquido em Erlenmeyers, com 4 níveis de FeCl<sub>3</sub> (0; 20; 50; e 100 ppm), adicionando-se as bactérias na quantidade de 1 mL de suspensão com concentração ajustada para  $A_{590} = 0,7$ . O patógeno foi

inoculado colocando-se um disco de meio com 6 mm de diâmetro contendo o crescimento micelial ativo em cada Erlenmeyer. A incubação foi feita a  $24\pm 2$  °C, fazendo-se três agitações manuais, diárias, por uma semana. A avaliação foi realizada através da filtração do crescimento fúngico em papel de filtro esterilizado, secagem em estufa a 60 °C por 24 horas, seguindo-se a pesagem (22).

## **RESULTADOS**

### **Efeito de bactérias sobre a fusariose em mudas de abacaxi micropropagadas**

#### **Método de imersão de raízes**

Dentre os 18 isolados bacterianos testados, IN937A (1,13), C210 (1,06), ENF14 (0,84), C11 (0,73), C21 (0,68), e ENF12 (0,48) diferiram significativamente ( $P=0,05$ ) da testemunha (3,25) com relação às notas atribuídas aos sintomas internos em cada planta, sem diferir significativamente ( $P=0,05$ ) do controle com o fungicida benomil (0,39) (Quadro 2). Benomil, ENF12 e C21 reduziram a severidade da doença em 88,0, 85,2 e 79,1% respectivamente, em relação a testemunha.

### **Efeito de bactérias sobre a fusariose em mudas de abacaxi micropropagadas**

#### **Método de pulverização em folhas destacadas**

Dentre os 18 isolados bacterianos testados, apenas EN5 (6,25) diferiu significativamente ( $P=0,05$ ) da testemunha (64,0) quanto ao índice de doença (Quadro 3), com uma redução da severidade da doença de 90,2%. Alguns isolados aumentaram a severidade da doença embora sem diferir significativamente ( $P=0,05$ ) da testemunha. O benomil também (62,5) não diferiu significativamente ( $P=0,05$ ) da testemunha.

## **Efeito de bactérias sobre a fusariose em mudas de abacaxi micropropagadas**

### **Método de pulverização de folhas não destacadas**

Dentre os oito isolados bacterianos testados, apenas ENF14 (16,88; 2,0; 7,5) diferiu significativamente ( $P=0,05$ ) da testemunha (38,0; 3,3; 23,7) ( $P=0,05$ ), respectivamente para o índice de doença calculado com base em escala de notas para lesões foliares, número de folhas infectadas e índice de doença calculado com base em escala de notas para sintomas internos (Quadro 4). Esse isolado reduziu a severidade da doença, em 55,6; 39,4 e 68,4% respectivamente para estas variáveis. O isolado ENF19 aumentou significativamente ( $P=0,05$ ) a severidade da doença e o benomil não diferiu significativamente ( $P=0,05$ ) da testemunha.

### **Mecanismos de ação das BPCP utilizados no controle biológico**

Nas condições dos ensaios realizados, nenhum dos isolados testados para controle da fusariose do abacaxizeiro apresentou produção de celulase, pectinase ou HCN. Os isolados C210, R14, ENF19, ENF14 e C11 inibiram o crescimento do patógeno por antibiose (Quadro 5), diferindo significativamente ( $P=0,05$ ) da testemunha e dos demais isolados. Quanto à competição pelo ferro, analisada apenas para os oito isolados utilizados no terceiro experimento, foi observado que os isolados *B. cereus* C210 e *Bacillus* sp. C11 apresentaram reversão da inibição do crescimento micelial do patógeno apenas no nível de 50 ppm de  $\text{FeCl}_3$ , enquanto que *A. piechaudii* EN5, apresentou reversão já no nível de 20 ppm de ferro (Quadro 6). No geral, os outros isolados não apresentaram diferenças significativas entre os níveis de ferro, embora tenham diferido da testemunha em todos os níveis.

## DISCUSSÃO

*Fusarium subglutinans* apresentou patogenicidade ao abacaxizeiro tanto quando inoculado por ferimento nas raízes quanto por ferimento na base de folhas destacadas ou não. A inoculação por ferimentos no tecido aclorofilado da base da folha permitiu o aparecimento dos sintomas aos três dias, comprovando que este tecido é muito suscetível e que o tempo de exposição do ferimento ao patógeno influencia na severidade da doença (43). Os sintomas internos (Figura 1A) obtidos no primeiro experimento demonstraram que o patógeno foi eficiente na colonização, mesmo penetrando pelas raízes, o que normalmente não acontece em condições de campo (25, 43).

No primeiro experimento, utilizando a bacterização por imersão de raízes e a inoculação do patógeno por ferimentos de raízes, todos os 18 isolados testados reduziram a severidade da doença com destaque para ENF12 (não identificado), C21 (*Bacillus* sp.), C11 (*Bacillus* sp.), ENF14 (*E. cloacae*), C210 (*B. cereus*) e IN937A (*Pseudomonas chlororaphis*). No segundo experimento, o isolado EN5 (*A. piechaudii*) exerceu proteção eficiente contra o patógeno quando pulverizado em folhas destacadas inoculadas posteriormente por ferimentos com *F. subglutinans*. Já no terceiro experimento, ENF14 destacou-se reduzindo o índice de doença quando pulverizado na base de folhas de plantas cultivadas em casa de vegetação, as quais foram inoculadas com o patógeno por ferimentos. As diferenças verificadas no presente estudo quanto à eficiência de alguns isolados bacterianos nos três experimentos realizados podem ser explicadas pela utilização de métodos diferentes de bacterização e, principalmente, de inoculação de *F. subglutinans*. O período de quatro dias entre bacterização e inoculação do patógeno, no experimento 1, mostrou-se suficiente para que os isolados bacterianos colonizassem as raízes epifiticamente e/ou endofiticamente, permitindo a proteção

contra o patógeno. Esta proteção pode ser atribuída à produção de metabólitos ativos, fato comprovado para os isolados C210, EN5 C21 e C11 pela inibição do patógeno “in vitro” no meio NYDA (Quadro 5), bem como no meio KMB para C210, ENF14 e C11 (Quadro 6). A imersão de raízes na suspensão bacteriana assegurou a colonização epifítica, no entanto a colonização endofítica que se inicia, principalmente, através de ferimentos na epiderme depende da densidade populacional, dos fatores nutricionais e ambientais e de uma seleção fisiológica no interior da raiz, ou seja, um gênero pode ser dominante na rizosfera e não dominante endofiticamente (19). No presente trabalho, os ferimentos existentes nas raízes ou provocados pelo crescimento das mesmas no substrato, os nutrientes contidos nesse e as condições favoráveis de temperatura e umidade foram facilitadores do processo de colonização e penetração das bactérias, promovendo a proteção contra o patógeno. A vantagem da bacterização pela imersão de raízes é a aplicação da bactéria em toda a superfície do sistema radicular já em desenvolvimento, diferentemente do que ocorre quando a bacterização é realizada através das sementes. ROBERTS et al. (36) verificaram que *E. cloacae* coloniza apenas as partes das raízes próximas às sementes, tanto no sentido vertical quanto horizontal.

No segundo experimento, o uso de folhas destacadas favoreceu o patógeno e não os antagonistas. Possivelmente, isto ocorreu devido ao curto tempo de três horas entre a bacterização e a inoculação, o qual não foi suficiente para a multiplicação e colonização das bactérias nos tecidos foliares, o que permitiria a produção de metabólitos ativos. Além disso, as condições de temperatura ( $25 \pm 2$  °C) e umidade (100%) na caixa Gerbox foram favoráveis ao patógeno, pois segundo SILVA-ACUÑA et al. (38) a melhor temperatura para desenvolvimento radial de lesão ocorreu em torno de 30 °C, e de acordo com VENTURA (43), umidade relativa acima de 92% é importante para a germinação de conídios de *F. subglutinans*. As condições muito favoráveis ao patógeno

podem ter impedido a expressão da proteção da maioria dos isolados. Entretanto, a redução do índice de doença demonstrado por *A. piechaudii* EN5 pode ter ocorrido por competição por sítios de colonização e/ou por nutrientes, possivelmente pelo ferro. De acordo com YUEN & SCHROTH (45), *A. piechaudii* MFA1, isolada de raízes de craveiro cultivado em solos supressivos à murcha de *Fusarium*, produziu um sideróforo em meio com baixo nível de ferro, inibindo a germinação e crescimento do tubo germinativo de microconídios de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, além de inibir a germinação de clamidósporos do patógeno. Isto foi revertido com a adição de  $\text{FeCl}_3$  ao solo. A severidade da doença em plantas tratadas com MFA1 foi reduzida aos 3 e 4 meses, respectivamente em 45 e 35%, mas nenhuma diferença foi detectada aos 5 meses (45). No presente trabalho, observou-se com relação ao isolado EN5 que a adição de 20 ppm de  $\text{FeCl}_3$  ao meio de King B reduziu significativamente a inibição do crescimento de *F. subglutinans*, o que sugere o mecanismo de competição pelo ferro como possível responsável pelo controle observado no experimento de folhas destacadas. Isolados de *Alcaligenes* spp. já foram detectados em rizosfera de soja (42) bem como em solo, rizosfera e interior de raízes de pepino (19, 20).

No terceiro experimento, o período de quatro dias entre a aplicação das bactérias por pulverização das folhas e a inoculação do patógeno por ferimentos na base das folhas, parece ter sido suficiente para permitir a colonização epifítica e/ou endofítica dos tecidos pelo isolado ENF14 de *E. cloacae*. Segundo MAHAFFEE & KLOEPPER (19) o gênero *Enterobacter* foi detectado em grande quantidade sete dias após o plantio, tanto na rizosfera de pepino quanto endofiticamente. O isolado ENF14 que já havia se destacado no experimento 1, reduziu tanto a incidência quanto a severidade da doença e se mostra promissor para o biocontrole do patógeno. *Enterobacter cloacae* além de colonizadora de diversas plantas mono e dicotiledôneas é também fixadora de

nitrogênio (16) e age através de competição por ácidos graxos que exsudam da rizosfera e espermosfera de algodão protegendo contra o damping-off causado por *Pythium ultimum* pela supressão da germinação de esporângios (41).

A colonização pode ser fator importante para a eficiência de um biocontrolador e depende, entre outros fatores, de sua taxa de crescimento (36). Tanto *Bacillus* spp. quanto *E. cloacae* são comuns na flora epifítica e endofítica de diversas espécies vegetais, tais como arroz (16), trigo e cevada (12), cana-de-açúcar (35), cacau (5), trevo (40) e pepino (19, 20). Neste último hospedeiro, populações de *E. cloacae* e *Alcaligenes* spp. foram detectadas no solo, na rizosfera e internamente nas raízes, em duas estações de cultivo simultâneas. Além disso, a população inicial endofítica nas raízes foi dependente da comunidade da rizosfera, embora aquela população tenha apresentado menor diversidade, com dominância dos gêneros *Agrobacterium* e *Enterobacter* (19). Não foram encontradas referências sobre colonização de *E. cloacae* ou *A. piechaudii* sobre ou dentro de folhas, embora isto seja muito comum para espécies do gênero *Bacillus* (2, 3).

Alguns dos isolados eficientes nos experimentos 1 e 3 produziram metabólitos tóxicos contra o patógeno “in vitro”. Dentre esses se destacaram os *Bacillus* spp. C210 e C11 e *E. cloacae* ENF14. Sabe-se que *Bacillus* spp. são produtores de antibióticos que agem contra vários patógenos (28). Além disso, produzem endosporos que facilitam a sobrevivência e resistência às condições adversas (37), tornando-se mais adequados à formulação de produtos estáveis e viáveis (13). Sabe-se ainda que os isolados C210, C116, RAB7 e R14 apresentaram atividade antibiótica contra *X. campestris* pv. *campestris* isolado LFR3 e que o R14, após 24 h de fermentação em meio a base de melaço, produziu em torno de  $10^9$  esporos viáveis.ml<sup>-1</sup> (17). Quanto à *E. cloacae* existem relatos de que produz o antibiótico diacetilfluoroglucinol em rizosfera de milho

(32); o sideróforo aerobactina que não está envolvido no biocontrole de damping-off causado por *Pythium* em pepino (18); enzimas quitinolíticas que atuam no controle de *Pythium* em algodão (8) e ACC deaminase, enzima que reduz a quantidade de 1-aminociclopropano 1-ácido carboxílico sintase e, conseqüentemente de etileno, na parte externa de sementes em germinação, promovendo o alongamento de raízes de plântulas de canola (30). Já o isolado EN5 de *A. piechaudii*, destaque no experimento 2, não produziu antibióticos.

Isolados como R14 e ENF19 que apresentaram antibiose “in vitro” foram incapazes de proteção “in vivo”. Isto pode ter ocorrido devido, entre outros fatores, à baixa capacidade de colonização dos tecidos do hospedeiro e/ou interações negativas com outros organismos existentes no substrato ou superfície foliar. Essas interações podem incluir antibiose ou competição por espaço e/ou nutrientes, pois o húmus não foi esterilizado, contendo assim microflora natural. Além disso, as plantas, apesar de provenientes de cultura de tecidos, podem abrigar microflora diversificada conforme relatado por KNEIFEL & LEONHARDT (15).

A não detecção dos outros mecanismos de ação analisados, quais sejam produção de celulase, pectinase e HCN, sugere que o seu envolvimento não foi essencial na bioproteção dos isolados encontrados neste trabalho como eficientes contra *F. subglutinans* ou que os métodos utilizados não foram suficientemente acurados para a sua detecção.

A competição por ferro foi observada nos isolados *B. cereus* C210 e *Bacillus* sp. C11, apenas no nível de 50 ppm de FeCl<sub>3</sub> enquanto para *A. piechaudii* EN5, houve reversão já no nível de 20 ppm. Conforme já discutido, *Alcaligenes* sp. foi relatado como produtor de sideróforos no controle da murcha do craveiro (45) e *E. cloacae*

produz o sideróforo aerobactina, o qual entretanto, não está envolvido no controle do damping-off em pepino (18).

É interessante discutir porque isolados bacterianos de couve (C11, C21 e C210), repolho (EN5) e feijão (ENF12 e ENF14) foram, em determinadas condições, eficientes no controle da fusariose do abacaxizeiro. Isto denota a falta de especificidade dos mesmos com relação ao hospedeiro e ao patógeno controlado. A ausência de especificidade pode ser explicada pela ampla gama de hospedeiros e capacidade de resistência às condições adversas em *Bacillus* (37) e justificada em *E. cloacae* pela utilização de vários nutrientes para crescimento e colonização em diferentes partes da planta (36).

Outra questão importante a ser explorada é porque alguns isolados elevaram o índice de doença no segundo e terceiro experimentos, destacando-se o ENF19 que diferiu significativamente ( $P=0,05$ ) da testemunha. Este fato pode ocorrer devido a interações deletérias entre organismos e já foi observado em outros estudos de biocontrole utilizando bactérias, principalmente do gênero *Bacillus* (6, 31).

Apesar dos resultados apontarem o isolado *E. cloacae* ENF14 como potencial biocontrolador para a fusariose do abacaxizeiro, mais experimentos precisam ser realizados, principalmente em campo, para a comprovação da eficiência do controle e outros métodos devem ser empregados para uma precisa detecção dos mecanismos envolvidos no biocontrole da doença. Além disso, recomendam-se mais estudos com misturas dos isolados ENF14, EN5, C210 e C21, utilizando-se a pulverização das folhas com o biocontrolador. Este método será o mais prático no manejo da cultura do abacaxi em condições de campo, tendo em vista que oferece maior proteção à base das folhas e parte aérea, que constituem os principais sítios de infecção da doença.

## AGRADECIMENTOS

Os autores expressam seus agradecimentos à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro e concessão de bolsas. Os autores agradecem ainda ao Dr. John McInroy, da Universidade de Auburn, Alabama – USA, pela identificação de alguns isolados bacterianos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARMSTRONG, G.M.A solution culture infection method used in the study of *Fusarium* wilts. **Phytopathology**, St. Paul, v.4, n.1, p.7, 1941.
2. ASSIS, S.M.P.; MARIANO, R.L.R.; MICHEREFF, S.J.; COELHO, R.S.B. Biocontrol of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on kale with *Bacillus* spp. and endophytic bacteria. In: WENHUA, T.; COOK, R. J.; ROVIRA, A. (Eds.). **Advances in biological control of plant diseases**. Beijing: China Agricultural University Press, 1996. p.347-355.
3. ASSIS, S.M.P.; MARIANO, R.L.R.; MICHEREFF, S.J.; COELHO, R.S.B. Survival and redistribution of *Bacillus* spp., potential biocontrol agents of black rot, on kale phylloplane. In: WENHUA, T.; COOK, R. J.; ROVIRA, A. (Eds.). **Advances in biological control of plant diseases**. Beijing: China Agricultural University Press, 1996. p. 374-379

4. ASSIS, S.M.P.; MARIANO, R.L.R.; MICHEREFF, S.J.; SILVA, G.; MARANHÃO, E.A.A. Antagonism of *Bacillus* spp. to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on cabbage phylloplane in the field. In: OGOSHI, A.; KOBAYASHI, K.; HOMMA, Y.; KODAMA, F.; KONDO, N.; AKINO, S. (Eds.). **Plant growth-promoting rhizobacteria – present status and future prospects**. Sapporo: Nakanishi Printing, 1997. p.345-348.
5. BONG, C.L. Microorganisms and algae recorded on cocoa in sabah, Malaysia. [on line]. Malasya: Agriculture Research Centre, 2001. Disponível em: <[http://www.google.com/search?q=cache:RBDC8a3LhjA:www.koko.gov.my/Research...</a>>. Acesso em 13 ago. 2001](http://www.google.com/search?q=cache:RBDC8a3LhjA:www.koko.gov.my/Research...)
6. BROADBENT, P.; BACKER, K.F.; WATERWORYE, Y. Bacterial and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in Australian soils. **Australian Journal of Science**. v.24, p.925-944, 1971.
7. CATTELAN, A.J. **Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal**. Londrina: EMBRAPA-CNPS, 1999. 36p.
8. CHERNIN, L.; ISMAILOV, Z.; HARAN, S.; CHET, I. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.5, p.1720-1726, 1995.
9. EDGINGTON, L.V.; KHEW, K.L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, St. Paul, v.61, n.1, p.42-44, 1971.
10. ELOY, AM.M.; CABRAL, J.R.S.; SOUZA, A. da S.; MATOS A.P. de.; ALMEIDA, W.A.B. Propagação *in vitro* do abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merr.). In: ENCONTRO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL. 1., 1993, Brasília. **Programas e resumos**. Brasília, 1993.

11. HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Journal of Microbiology**, London, v.43, p.895-914, 1997.
12. KLEEBERGER, A.; CASTORPH, H.; KLINGMULLER, W. The rhizosphere microflora of wheat and barley with special reference to Gram-negative bacteria. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v.136, p.306-311, 1983.
13. KLOEPPER, J. W. Current status and future trends in biocontrol research and development in the U. S. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CLEAN AGRICULTURE, 1997, Japan. **Proceedings...** Japan, 1997, p.49-52.
14. KLOEPPER, J.W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCHROTH, M. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. **Nature**, v.28, n.14, p.885-886, 1980.
15. KNEIFEL, W.; LEONHARDT, W. Testing of different antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from plant tissue culture. **Plant Cell. Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.29, p.139-144, 1992.
16. LADHA, J.K.; BARRAQUIO, W.L.; WATANABE, I. Isolation and identification of nitrogen-fixing *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella planticola* associated with rice plants. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.29, p.1301-1308, 1983.
17. LUNA, C.L.; MARIANO, R.L.R.; SOUTO-MAIOR, A.M. Produção de *Bacillus subtilis* R14 para utilização em controle biológico da podridão negra das crucíferas. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 13., 2000, Teresópolis. **Resumos...** Rio de Janeiro: COPPE, 2000.

18. LOPER, J.E.; ISHIMARU, C.A.; CARNEGIE, S.R.; VANAVICHIT, A. Cloning and characterization of aerobactin biosynthesis genes of the biological control agent *Enterobacter cloacae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.4189-4197, 1993.
19. MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial communities of the rhizosphere and endorhiza associated with field-grown cucumber plants inoculated with a plant growth-promoting rhizobacterium or its genetically modified derivative. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.43, p.344-353, 1997.
20. MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Temporal changes in the bacterial communities of soil, rhizosphere, and endorhiza, associated with field-grown cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Microbial Ecology**, New York, v.34, p.210-223, 1996.
21. MARIANO, R.L.M.; ROMEIRO, R.S. Indução de resistência sistêmica mediada por rizobactérias promotoras de crescimento de plantas. In: MELLO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Eds.) **Controle biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, 2000. v.2, p.305.
22. MARIANO, R.L.R.; ASSIS, S.M.P.; SILVEIRA, E.B.; GOMES, A.M.A. Mecanismos de ação bactérias promotoras de crescimento. In: MARIANO, R.L.R. (Coord.). **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: Editora Universitária, 2000. p.139-151.
23. MATOS, A.P. de. Doenças e seu controle. In: CUNHA, G.A.P.; CABRAL, J.R.S.; SOUZA, L.F.S. (Eds.). **O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia**. Cruz das Almas: EMBRAPA, 1999. p.269-305.

24. MATOS, A.P. de.; CABRAL, J.R.S. Interação entre variedades de abacaxi e isolados de *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v.10, n.3, p.55-61, 1988.
25. MATOS, A.P. de.; CUNHA, G.A.P. da. Incidência da fusariose em mudas de abacaxi 'Pérola', tipos coroa, filhote e rebentão. **Magistra**, Cruz das Almas, v.5, n.4, p.75-84, 1987.
26. MATOS, A.P. de; SOUTO, G.F. Reaction of pineapple, cultivars Pérola and Smooth Cayenne, to inoculation with *fusarium moniliforme* Sheld. var. *subglutinans*, WR. & RG. **Fruits**, Paris, v.40, n.10, p.641-645, 1985.
27. 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.3, p.195-218, 1923.
28. MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO J.L. (Eds.). **Controle Biológico**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1998. v.1, p.262.
29. NELSON, P.E.; TOUSSOUN, T.A.; MARASAS, W.F. **Fusarium species: an illustrated manual for identification**. State University Press, Pennsylvania: 1983, 44p.
30. PENROSE, D.M.; GLICK, B.R. Quantification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in canola seedlings treated with plant growth. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON PLANT GROWTH-PROMOTING RHIZOBACTERIA, 5., 2000, Cordoba. **Proceedings...** Auburn: OECD. 2000. p.98.

31. NORONHA, M.A.; MICHEREFF, S.J.; MARIANO, R.L.R. Efeito do tratamento de sementes de caupi com *Bacillus subtilis* no controle de *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, n.2, p.174-178.
32. PICARD, C.; DI CELLO, F.; VENTURA, M.; FANI, R.; GUCKERT, A. Frequency and biodiversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.3, p.948-955, 2000.
33. PUSEY, P.L.; WILSON, C.L. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. **Plant Disease**, St. Paul, v.68, n.9, p.753-756, 1984.
34. REINHARDT, D.H.R.C.; CUNHA, G.A.P. Métodos de propagação. In: CUNHA, G.A.P.; CABRAL, J.R.S.; SOUZA, L.F.S. (Eds.). **O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia**. Cruz das Almas: EMBRAPA, 1999. p.105-139.
35. RENNIE, J.R.; DE FREITAS J.R.; RUSCHEL, A.P.; VOSE, P.B. Isolation and identification of N<sub>2</sub>-fixing bacteria associated with sugar cane (*Saccharum* sp.). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.28, p.462-467, 1982.
36. ROBERTS, D.P.; DERY, P.D.; YUCEL, I.; BUYER, J.; HOLTMAN, M.A.; KOBAYASHI I. Role of *pfkA* and general carbohydrate catabolism in seed colonization by *Enterobacter cloacae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, n.6, p.2513-2519, 1999.
37. RODGERS, P.B. Potencial of biological control organisms as a source of antifungal compounds for agrochemical and pharmaceutical product development. **Pesticide Science**, Oxford, v.27, p.155-164, 1989.

38. SILVA-ACUÑA, R.; COSTA, A. F.; BARRETO, M.; ZAMBOLIM, L. Efeito da temperatura e do tipo de folha no desenvolvimento de lesões de *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas* no abacaxizeiro Pérola. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.20, n.3, p.498-500, 1995.
39. SIQUEIRA, K.M.S.; OLIVEIRA, G.M.; VASCONCELOS, A.G.; PINHO, P.A.L.; GOMES, A.M.A.; MARIANO, R.L.M.; WILLADINO, L. Promoção de crescimento de mudas de abacaxi através da utilização de bactérias. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 9., 1997, Recife. **Resumos...** Recife: Imprensa Universitária, 1997. p.92.
40. STURZ, A.V.; CHRISTIE, B.R.; MATHESON, B.G.; NOWAK, J. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. **Bio Fertility Soils**, v.25, p.13-19, 1997.
41. VAN DIJK, K.; NELSON, E.B. Fatty-acids competition as a mechanism by which *Enterobacter cloacae* suppresses *Pythium ultimum* sporangium germination and damping-off. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.66, p.5340-5347. 2000.
42. VARGAS-AYALA, R.; RODRIGUES-KÁBANA, R.; MORGAN-JONES, G.; McINROY, J.A.; KLOPPER, J.W. Shifts in soil microflora induced by velvetbean (*Mucuna deeringiana*) in cropping systems to control root-knot nematodes. **Biological Control**, London, v.17, p.11-22, 1999.
43. VENTURA, J.A. **Fusariose do abacaxizeiro: caracterização do patógeno, epidemiologia da doença, resistência e micropropagação do hospedeiro *in vitro***. 1994. 111f. (Doutorado em Fitopatologia)-Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 1994.

44. VENTURA, J. A.; MAFFIA, L. A.; CHAVES, G.M. Field induction of fusariosis in pineapple fruits with *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* Wr. & Reg. **Fruits**, Paris, v.36, n.11, p.707-710, 1981.
45. YUEN, G.Y.; SCHROTH, M.N. Inhibition of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* by iron competition with an *Alcaligenes* sp. **Phytopathology**, St. Paul, v.76, n.2, p.171-175, 1986.

Quadro 1. Bactérias testadas para o controle biológico da fusariose causada por *Fusarium subglutinans* em mudas de abacaxi micropropagadas cv. Pérola.

Isolados	Hospedeiro/Origem	Identificação
C11	Couve/Epifítica	<i>Bacillus</i> sp. (Cohn)
C21	Couve/Epifítica	<i>Bacillus</i> sp. (Cohn)
C210	Couve/Epifítica	<i>Bacillus cereus</i> (Cohn)
E2	Couve flor/Endofítica	N. I. <sup>1</sup>
EN5	Feijão/Endofítica	<i>Alcaligenes piechaudii</i> (Kiredjian)
ENF2	Feijão/Endofítica	N. I.
ENF4	Feijão/Endofítica	N. I.
ENF5	Feijão/Endofítica	N. I.
ENF10	Feijão/Endofítica	<i>B. thuringiensis</i> subvar. <i>Kurstakii</i> (Berlinev)
ENF12	Feijão/Endofítica	N. I.
ENF14	Feijão/Endofítica	<i>Enterobacter cloacae</i> (Hormaeche & Edwards)
ENF16	Feijão/Endofítica	<i>B. pumilus</i> (Meyer & Gotheir)
ENF17	Feijão/Endofítica	N. I.
ENF19	Feijão/Endofítica	N. I.
IN937A	.....	<i>B. amyloliquefaciens</i> (Priest)
JM339	.....	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> (Guignard & Sauvagean)
R14	Repolho/Epifítica	<i>B. subtilis</i> (Cohn)
RAB7	Rabanete/Epifítica	<i>B. megaterium</i> pv. <i>Cerealis</i> (Hosford)
RAB9	Rabanete/Epifítica	<i>Bacillus</i> sp. (Cohn)

<sup>1</sup>N. I. = Não identificado

Quadro 2. Efeito de bactérias aplicadas através de imersão de raízes de mudas de abacaxi micropropagadas cv. Pérola sobre a fusariose causada por *Fusarium subglutinans* inoculado por ferimentos de raízes em condições de casa de vegetação

Testemunha	3,2 a <sup>4</sup>	-
ENF5	2,5 ab	23,4
RAB9	2,4 ab	26,8
ENF2	2,0 abc	38,5
JM339	2,0 abcd	39,7
EN5	1,9 abcd	40,9
RAB7	1,9 abcd	42,1
ENF4	1,5 abcd	52,6
ENF10	1,4 abcd	55,7
ENF16	1,3 abcd	59,1
R14	1,3 abcd	59,1
E2	1,3 abcd	61,2
ENF17	1,2 abcd	63,4
IN937A	1,1 bcd	65,2
C210	1,1 bcd	67,8
ENF14	0,8 bcd	74,1
C11	0,7 bcd	77,5
C21	0,7 bcd	79,1
ENF12	0,5 bcd	85,2
Benomil	0,4 d	88,0
CV (%)	37,7	

<sup>1</sup>C210 = *Bacillus cereus*; C21, C11 = *Bacillus* sp.; EN5 = *Alcaligenes piechaudii*; E2, ENF2, ENF4, ENF5, ENF12, ENF17 e ENF19 = não identificados, ENF10 = *B. thuringiensis* subvar. *kurstakii*; ENF16 = *B. pumilus*, ENF14 = *Enterobacter cloacae*; IN937A = *B. amyloliquefaciens*; JM339 = *Pseudomonas chlororaphis*; R14 = *B. subtilis*; RAB9 = *Bacillus* sp.

<sup>2</sup>Média das sete repetições, avaliadas por escala de notas com base nos sintomas internos da doença onde: 0 = sem sintomas; 1 = necrose e apodrecimento estendendo-se até 20% da base da planta; 2 = necrose e apodrecimento estendendo-se até 50% da base da planta; 3 = necrose e apodrecimento estendendo-se até 80% da base da planta; 4 = necrose e apodrecimento estendendo-se até 100% da base da planta.

<sup>3</sup>RSD (%) - Redução da severidade da doença calculada pela fórmula de EDINGTON et al. (9).

<sup>4</sup>Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P=0,05).

Quadro 3. Efeito de bactérias aplicadas através de pulverização em folhas destacadas de mudas de abacaxi micropropagadas cv. Pérola sobre a fusariose causada por *Fusarium subglutinans* inoculado por ferimentos na base das folhas mantidas em caixas Gerbox

Tratamentos <sup>1</sup>	ID <sup>2</sup>	RSD(%) <sup>3</sup>
ENF14	81,2 a <sup>4</sup>	-
C21	76,0 ab	-
ENF16	75,0 ab	-
ENF2	71,9 ab	-
ENF19	70,3 ab	-
ENF17	69,8 ab	-
RAB9	69,8 ab	-
ENF5	68,7 ab	-
JM339	68,7 ab	-
ENF12	65,6 ab	-
IN937A	65,6 ab	-
Testemunha	64,0 ab	-
Benomil	62,5 ab	2,4
ENF10	60,4 ab	5,7
C210	57,8 ab	9,8
R14	56,2 b	12,2
E2	54,8 b	14,6
RAB7	54,1 b	13,9
C11	53,1 b	17,1
EN5	6,2 c	90,2
C.V. (%)	28,6	

<sup>1</sup>C210 = *Bacillus cereus*; C21, C11 = *Bacillus* sp.; EN5 = *Alcaligenes piechaudii*; ENF10 = *B. thuringiensis* subvar. *kurstakii*; ENF16 = *B. pumilus*; ENF4 = *Enterobacter cloacae*; E2, ENF2, ENF5, ENF12, ENF17 e ENF19 = não identificados; IN937A = *B. amyloliquefaciens*; JM339 = *Pseudomonas chlororaphis*; R14 = *B. subtilis*; RAB9 = *Bacillus* sp.

<sup>2</sup>Índice de doença calculado segundo McKINNEY (27).

<sup>3</sup>RSD (%) - Redução da severidade da doença calculada pela fórmula de EDINGTON et al. (9).

<sup>4</sup>Média de quatro repetições. Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P=0,05).

Quadro 4. Efeito de bactérias aplicadas através de pulverização da base de folhas de mudas de abacaxi micropropagadas cv. Pérola sobre a fusariose causada por *Fusarium subglutinans* inoculados por pulverização em condições de casa de vegetação

Tratamentos <sup>1</sup>	IDF <sup>2</sup>	RSD <sup>3</sup> (%)	NFI	RSD (%)	IDI	RSD (%)
ENF19	50,2a <sup>4</sup>	-	4,1a	-	43,7a	-
C11	47,6a	-	3,8a	-	32,5ab	-
R14	41,2ab	-	3,8ab	-	32,5ab	-
EN5	39,3ab	-	3,6abc	-	25,0bc	-
Testemunha	38,0ab	-	3,3abc	-	23,7bc	-
C21	37,9ab	0,2	3,4abc	-	32,5ab	-
RAB9	34,0abc	10,4	3,2abc	3,0	27,5bc	-
Benomil	33,6abc	11,5	2,8bcd	15,1	21,2bc	10,5
C210	29,1bc	23,5	2,6cd	19,7	18,7cd	21,0
ENF14	16,9c	55,6	2,0d	39,4	7,5d	68,4
C.V (%)	19,8		12,7		21,2	

<sup>1</sup>C210 = *Bacillus cereus*; C21, C11 = *Bacillus* sp.; EN5 = *Alcaligenes piechaudii*; ENF14 = *Enterobacter cloacae*; ENF19 = não identificado; R14 = *B. subtilis*; RAB9 = *Bacillus* sp.

<sup>2</sup>IDF = índice de doença calculado com base em escala de notas para lesões foliares, NFI = número de folhas infectadas, IDI = índice de doença calculado com base em escala de notas para sintomas internos

<sup>3</sup>RSD (%) - Redução da severidade da doença calculada pela fórmula de EDINGTON et al. (9).

<sup>4</sup>Médias de quatro repetições com 5 plantas. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P=0,05).

Quadro 5. Antibiose de bactérias sobre *Fusarium subglutinans* agente da fusariose do abacaxizeiro avaliada através do halo de inibição do crescimento micelial em meio de cultura batata-dextrose-ágar.

Tratamentos <sup>1</sup>	Halo de inibição (mm)
C210	11,1* <sup>2</sup>
R14	10,5*
ENF19	9,8*
ENF14	9,8*
C11	9,6*
C21	5,3
RAB9	4,5
ENF16	4,1
1N937A	3,8
ENF12	3,6
ENF17	3,5
ENF10	2,8
ENF2	2,6
ENF5	2,5
RAB7	1,6
E2	1,5
ENF4	1,0
JM339	0
EN5	0
Testemunha	0
C.V.%	37,2

<sup>1</sup>C210 = *Bacillus cereus*; C21, C11 = *Bacillus* sp.; EN5 = *Alcaligenes piechaudii*; ENF10 = *B. thuringiensis* sub var. *kurstakii*; ENF16 = *B. pumilus*; ENF14 = *Enterobacter cloacae*; E2, ENF2, ENF4, ENF5, ENF12, ENF17 e ENF19 = não identificados; IN937A = *B. amyloliquefaciens*; JM339 = *Pseudomonas chlororaphis*; R14 = *B. subtilis*; RAB9 = *Bacillus* sp.

<sup>2</sup>Média de cinco repetições. Valores seguidos de asterisco diferem significativamente da testemunha pelo teste de Tukey (P=0,05).

Quadro 6. Influência de níveis de ferro ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) no antagonismo de bactérias contra *Fusarium subglutinans*, avaliada após 7 dias de cultivo em meio King B, através da medição do diâmetro da colônia

Isolados	Níveis de $\text{FeCl}_3$			
	0 ppm	20 ppm	50 ppm	100 ppm
	9,0a <sup>2</sup> A	9,0a A	9,0a A	9,0a A
C210	1,07b B	1,20bcd B	2,77b A	0,92bc B
R14	1,06b A	1,35b A	1,13cd A	1,17b A
C11	0,98b B	1,03bcd B	1,62c A	1,18b AB
E2	0,91b A	0,91bcd A	0,81d A	0,96bc A
ENF19	0,71b A	0,66d A	0,65d A	0,88bc A
ENF14	0,65b A	0,73cd A	0,87d A	0,60bc A
EN5	0,57b B	1,28bc A	0,81d AB	0,52c B
RAB9	0,52b A	0,90bcd A	0,85d A	0,70bc A
C.V. (%)	14,4%			

<sup>1</sup>C210 = *Bacillus cereus*; C21, C11 = *Bacillus* sp.; EN5 = *Alcaligenes piechaudii*, ENF14 = *Enterobacter cloacae*; ENF19 = não identificado; R14 = *B. subtilis*; RAB9 = *Bacillus* sp.

<sup>2</sup>Médias de quatro repetições com uma placa cada. Médias seguidas pela mesma letra minúscula no sentido vertical e maiúscula no sentido horizontal não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P=0,05).

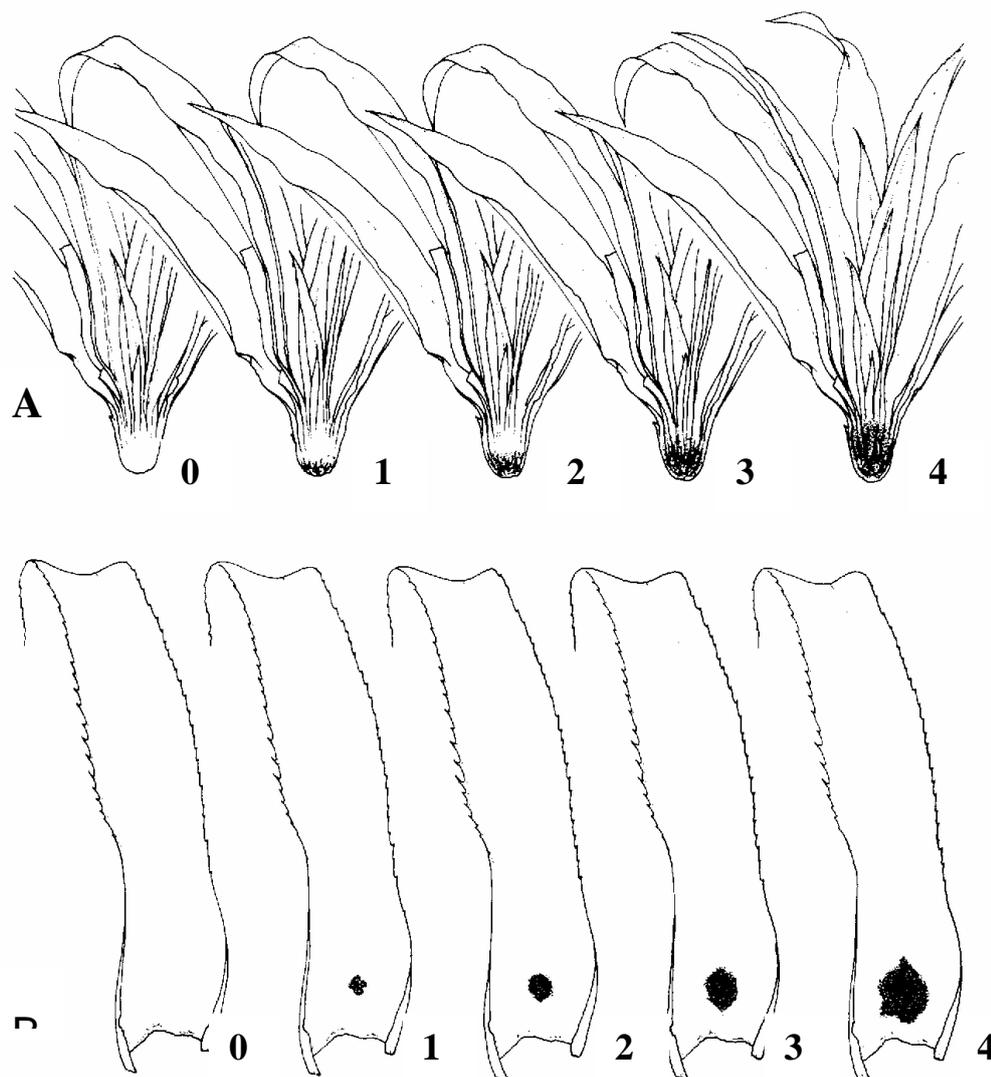


Figura 1 - Escalas de notas dos sintomas internos (A) e externos (B) da fusariose em mudas de abacaxi micropropagadas, considerando-se como base da planta desde o início das raízes até a emergência da folha mais nova. (A) 0 = sem sintomas; 1 = necrose e apodrecimento estendendo-se até 20% da base da planta; 2 = necrose e apodrecimento estendendo-se até 50% da base da planta; 3 = necrose e apodrecimento estendendo-se até 80% da base da planta; 4 = necrose e apodrecimento estendendo-se até 100% da base da planta. (B) 0 = sem sintomas; 1 = sintoma restrito a área perfurada; 2 = sintoma estendendo-se de 1-2 mm além da área perfurada; 3 = sintoma estendendo-se de 2-3 mm além da área perfurada; 4 = sintoma estendendo-se mais de 3 mm além da área perfurada.

## CONCLUSÕES GERAIS

- ✓ Dentre os métodos de bacterização testados, imersão de raízes + infestação do substrato e imersão de raízes foram os mais eficientes, sendo escolhido o segundo, pela maior praticidade e viabilidade na produção de mudas em larga escala.
- ✓ Dentre os 19 isolados bacterianos testados, os mais eficientes para promoção de crescimento foram, C210 (*Bacillus cereus*), ENF16 (*B. pumilus*), ENF10 (*B. thuringiensis*) e RAB9 (*Bacillus* sp.)
- ✓ Todos os isolados selecionados foram compatíveis e as misturas entre os isolados ENF10 + RAB9, ENF16 + C210 e C210 + RAB9 aplicados pelo método de imersão de raízes induziram aumentos acima de 80% para a variável matéria seca das raízes.
- ✓ Não foi observada a produção do AIA, HCN ou solubilização de fosfatos pelos isolados bacterianos mais eficientes na promoção de crescimento, nas condições experimentais utilizadas.
- ✓ O nitrogênio foi o único macronutriente cujo teor diferiu significativamente entre as mudas bacterizadas.
- ✓ Misturas dos isolados C210, ENF16, RAB9 e ENF10 aplicadas pela imersão de raízes, podem promover o aumento de biomassa de mudas de abacaxi micropropagadas, reduzindo a fase de aclimatação.
- ✓ Os isolados ENF12 (não identificado), C21 (*Bacillus* sp.), C11 (*Bacillus* sp.), C210, IN937A (*Pseudomonas chlororaphis*), EN5 (*Alcaligenes piechaudii*) e ENF14 (*Enterobacter cloacae*) reduziram a severidade da fusariose do abacaxizeiro nos diferentes experimentos realizados;

- ✓ Nenhum dos isolados bacteriano que reduziu a severidade da fusariose do abacaxizeiro produziu celulase, pectinase ou HCN. No entanto, C210, R14 (*B. subtilis*), ENF19 (não identificado), ENF14 e C11 exerceram antibiose “in vitro” contra o patógeno e o isolado EN5 apresentou competição por ferro;
- ✓ O isolado *E. cloacae* ENF14 pulverizado na base da folha revelou-se como potencial biocontrolador para a fusariose do abacaxizeiro, em condições de casa de vegetação.
- ✓ Recomendam-se testes com misturas dos isolados ENF14, EN5, C210 e C21 que agem por mecanismos distintos, utilizando-se a bacterização por pulverização das folhas.