

**BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E ADUBAÇÃO NITROGENADA NA
ACLI MATIZAÇÃO DE MUDAS MICROPROPAGADAS DE
ABACAXIZEIRO**

AURILENA DE AVIZ SILVA

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
AGOSTO – 2013**

**BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E ADUBAÇÃO NITROGENADA NA
ACLI MATIZAÇÃO DE MUDAS MICROPROPAGADAS DE
ABACAXIZEIRO**

AURILENA DE AVIZ SILVA

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Almy Junior Cordeiro de Carvalho

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
AGOSTO – 2013

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 099/2013

Silva, Aurilena de Aviz

Bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro / Aurilena de Aviz Silva. – 2013.

88 f. : il.

Orientador: Almy Junior Cordeiro de Carvalho.

Dissertação (Mestrado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2013.

Bibliografia: f. 71 – 84.

1. *Ananas comosus* 2. Produção de mudas 3. Micropropagação 4. Aclimatização 5. Nitrogênio I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 634.774

BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E ADUBAÇÃO NITROGENADA NA
ACLIAMATIZAÇÃO DE MUDAS MICROPROPAGADAS DE
ABACAXIZEIRO

AURILENA DE AVIZ SILVA

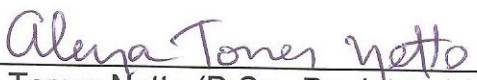
Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovado em 27 de agosto de 2013

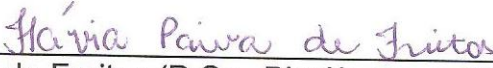
Comissão Examinadora




Prof. Marcos Oliveira Athayde (D.Sc., Produção Vegetal) – Biofábrica Biomudas



Drª Alena Torres Netto (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF/Faperj



Drª Flávia Paiva de Freitas (D.Sc., Biotecnologia) – UENF/CNPq



Prof. Almy Junior Cordeiro de Carvalho (D.Sc., Produção Vegetal) - UENF
Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus em primeiro lugar, meu amigo de todos os momentos que me deu força espiritual e física para concluir mais esta etapa;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro por proporcionar uma melhor qualificação profissional e pela concessão da bolsa;

Ao meu orientador professor Dr. Almy Junior por aceitar me orientar e melhorar minha carreira profissional. Aos professores Dr. Fabio Olivares, Dr. Arnaldo Façanha, Dr. Silvio Freitas e Dra. Marta Freitas pela colaboração no trabalho;

À minha Família
meus pais, em especial a minha mãe que me educou e sempre me apoiou em meus estudos, sei que ficaria muito orgulhosa de mim;

Aos meus irmãos Nete, Rene, Rubinho, Cléia, Milson e meu cunhado Pedro que mesmo longe me apoiaram;

Ao meu noivo Roberto por estar presente, me ouvindo e me aconselhando em todos os momentos;

Aos meus professores da graduação Dr. Heráclito, Dr. Candido Neto e o
Ms. Ítalo pelo apoio, amizade e incentivo;

Ao grupo do LFIT do CCTA/UENF amigos e companheiros de laboratório
Dra. Flávia Freitas, Dra. Patrícia Pessanha e Dra. Jalille Altoé, aos doutorandos
Paulo Cesar, Mírian e Marlon, ao mestrando Detony e aos graduandos Tiago,
Tábatha, Felipe e Rodrigo;

Ao grupo dos LBCT e LFBM do CBB/UENF em especial Bruna e Jucimara.
Ao Eng. Químico José Acácio pelo acompanhamento nas análises nutricionais no
setor de Nutrição Mineral de Plantas, do Laboratório de Fitotecnia da UENF;

Às minhas amigas Áurea, Jackeline, Nayara e Vanessa que sempre
estiveram comigo, sendo minhas companheiras e me proporcionando momentos
inesquecíveis por sete anos (graduação e mestrado);

Ao CNPq e a FAPERJ pelo financiamento concedido na execução dos
experimentos. Ao Laboratório Biomudas, da cidade de Venda Nova do Imigrante,
estado do Espírito Santo, pelos subsídios no fornecimento das mudas do
abacaxizeiro;

A todas as pessoas que diretamente ou indiretamente contribuíram para
realização deste sonho.

A Deus pela minha existência;

Eu plantei, Apolo regou; mas Deus deu o crescimento.
Por isso, nem o que planta é alguma coisa, nem o que
rega, mas Deus, que dá o crescimento (1 Co 3:6-7).

À minha mãe e aos meus queridos irmãos;
Ao meu futuro esposo Roberto Rivelino, pelo amor,
carinho e companheirismo.

Dedicatória

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. O abacaxizeiro: aspectos botânicos e cultivares.....	4
2.2. Propagação do abacaxizeiro.....	6
2.3. Nitrogênio no abacaxizeiro.....	7
2.4. Bactérias promotoras de crescimento vegetal.....	8
2.5. Atuação das Bombas de H ⁺ (tipo P e tipo V) nas plantas.....	10
3. TRABALHOS.....	13
3.1. Bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada no crescimento de mudas micropropagadas de abacaxizeiro durante a aclimatização.....	13
3.2. Composição mineral de mudas micropropagadas de abacaxizeiro inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio durante a aclimatização.....	32

3.3. Bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada na atividade de ATPases de mudas micropropagadas de abacaxizeiro durante a aclimatização.....	50
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	68
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
6. APÊNDICE.....	85

RESUMO

SILVA, AURILENA DE AVIZ. Eng. Agrônomo, M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Agosto de 2013. Bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro. Orientador: Prof. Almy Junior Cordeiro de Carvalho. Coorientadora: Dr^a Flávia Paiva de Freitas.

A produção de mudas de abacaxizeiro de forma convencional é lenta, sendo necessário para o desenvolvimento da cultura no Brasil e no mundo outros métodos de propagação mais eficientes. Com o objetivo de aumentar o crescimento e o desenvolvimento de mudas micropropagadas de abacaxizeiro 'Vitória' e diminuir seu período de aclimatização foi realizado um experimento para avaliar a resposta das mudas à inoculação com bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada. O delineamento experimental foi de blocos casualizados (DBC), em esquema fatorial (2x5x5), sendo os fatores representados por dois tipos de inóculos (ausência e presença de uma mistura de bactérias diazotróficas contendo *Burkholderia* sp. UENF 114111, *Burkholderia silvatlantica* UENF 117111 e *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC 54), cinco doses de ureia (0, 2, 5, 7 e 10 g L⁻¹) e cinco épocas de avaliação do tempo de aclimatização (30, 60, 90, 120 e 150 dias após o plantio das mudas em bandejas), com 4 blocos. Foram avaliados a altura da planta, número de folhas, área foliar, massa seca da parte aérea, massa seca da raiz, conteúdo de nutrientes da parte aérea, atividades de bombas H⁺ e a população de bactérias nas raízes das mudas. Conclui-se que a inoculação de bactérias

promoveu incremento na massa seca da parte aérea e massa seca de raiz das mudas. A aplicação de adubo nitrogenado reduziu o período de aclimatização das mudas em, aproximadamente, 60 dias. Estimou-se que doses de ureia entre 7 e 9 g L⁻¹, aplicadas durante a aclimatização, promoveram maior crescimento. As mudas inoculadas com bactérias diazotróficas, apresentaram maior conteúdo de N, K e S do que aquelas não inoculadas. O aumento das doses de nitrogênio promoveu incremento no conteúdo de N na matéria seca da parte aérea e no índice de SPAD do abacaxizeiro. Com exceção para o N, Mn e Cu, o incremento na adubação nitrogenada provocou redução no conteúdo dos outros nutrientes em mudas mais velhas na etapa de aclimatização. A extração de nutrientes por mudas micropropagadas do abacaxizeiro, na aclimatização, foi: K>N>Ca>Mg>S>P>Fe>Mn>B>Zn>Cu>Mo>Ni. A população de bactérias diazotróficas foi menor em mudas mais velhas durante a aclimatização. O transporte de H⁺ mediado pela H⁺-ATPases em membrana isolada de raiz de abacaxizeiro micropropagado tem alterações com crescimento das mudas sob diferente épocas de aclimatização. A inoculação de bactérias diazotróficas não induziu o transporte, porém, na interação com as doses de ureia F_{máx} da V-H⁺-ATPase foi menor na ausência de adubação nitrogenada. A atividade de transporte de prótons da V-H⁺-ATPase em membranas isoladas de raiz foi influenciada pela adubação nitrogenada.

ABSTRACT

SILVA, AURILENA DE AVIZ. Agronomist, M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. August, 2013. Diazotrophic and nitrogen fertilization on acclimatization of micropropagated pineapple. Advisor: Prof. Almy Junior Cordeiro de Carvalho. Co-advisor: Dr^a Flavia Paiva de Freitas.

Seedling production of pineapple in a conventional way is slow, being necessary to the development of culture in Brazil and in the world other propagation methods more efficient. Aiming to increase the growth and development of seedlings of pineapple and lower its acclimatization period an experiment was conducted to evaluate the response of plantlets to inoculation with diazotrophic and nitrogen fertilization. The experimental design was a randomized block design (RBD) in a factorial design (2x5x5), the factors being represented by two types of inocula (absence or presence of a mixture of diazotrophs containing *Burkholderia* sp. UENF 114111 , 117111 UENF *Burkholderia silvatlantica* and *Herbaspirillum seropedicae* strain HRC 54), five levels of urea (0 , 2 , 5 , 7 and 10 g L⁻¹) and five evaluation periods of time of acclimatization (30, 60, 90, 120 and 150 days after planting the seedlings in trays) with 4 blocks. Were evaluated plant height, leaf number , leaf area , shoot dry mass , root dry mass , nutrient content of shoots, activities of H⁺ pumps and the population of bacteria in the roots of seedlings. It was concluded that inoculation of bacteria promoted growth in dry mass of shoot and root dry weight of plantlets of pineapple 'Victory'. The application of nitrogen fertilizer reduced the

period of acclimatization of micropropagated pineapple 'Victory' in approximately 60 days. It was estimated that doses of urea between 7 and 9 gL⁻¹, applied to seedlings of pineapple 'Victory' during acclimatization, increased growth. The seedlings inoculated with diazotrophs showed higher contents of N, K and S than those not inoculated. The increase of nitrogen promoted increase in N content of dry matter of shoots and SPAD index of pineapple. Except for N, Mn and Cu, the increase in nitrogen fertilization caused a reduction in the content of other nutrients in older seedlings at the stage of acclimatization. Nutrient uptake by the pineapple plantlets in the acclimatization was: K>N>Ca>Mg>S>P>Fe>Mn>B>Zn>Cu>Mo>Ni. The population of diazotrophs was lower in older seedlings during acclimatization. The transport of H⁺ -mediated H⁺- ATPase in membrane isolated root micropropagated pineapple has changes with growth of seedlings under different times of acclimatization. Inoculation Diazotrophic did not induce transport, however, the interaction with the doses of urea F_{max} of V- ATPase was lower in the absence of fertilization. The nitrogen interferes with the activity of proton transport of V- ATPase in membranes isolated from root plantlets of pineapple.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um grande produtor de frutas e destaca-se na produção de abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merrill). Em 2011 foi o 2º maior produtor mundial de abacaxi (FAO, 2013) possuindo neste mesmo ano uma área plantada de 62.868 ha, com produtividade aproximadamente de 25 mil frutos por ha, tendo sido a quinta fruta mais produzida no país (IBGE, 2013).

O estado do Rio de Janeiro é um dos maiores consumidores da fruta, e tem demonstrado no ano de 2011 em relação ao ano anterior, grande avanço em área plantada com 4.455 ha. Porém, a produção ainda é baixa quando comparado com outros polos produtores (IBGE, 2013).

O fruto desta espécie pode ser destinado para o consumo “in natura” e, ou, utilizado pela indústria (Carvalho e Cunha, 1999). É consumido em todo o mundo, principalmente sob a forma de compotas e sucos. Também muito utilizado na fabricação de doces cristalizados, geleias, sorvetes, cremes, gelatinas e pudins (Gonçalves e Carvalho, 2000).

Com a demanda da fruta pelo mercado, tem-se buscado aumentar a produção de mudas das mais variadas cultivares. Nesse sentido novas cultivares têm sido lançadas, tanto para uma melhor aceitação da fruta, como para um aumento de plantas resistentes a doença fusariose, causada pelo fungo *Fusarium subglutinans* f.sp. Ananas, que tem sido uma das principais doenças da cultura, levando a grandes perdas na lavoura (Matos et al., 2009; Ventura et al., 2009).

Para proporcionar a obtenção de mudas uniformes com alta qualidade, livre de doenças e geneticamente superiores (Cid, 2001) e principalmente, para produção de mudas em larga escala, a micropropagação é uma alternativa de propagação desta espécie. Apesar das muitas vantagens oferecidas por esta técnica, para abacaxizeiro, há dificuldade no enraizamento e lentidão no crescimento das mudas (Moraes et al., 2010), necessitando de um longo período de aclimatização em casa de vegetação (Teixeira et al., 2001). A redução deste período pode ser uma opção para diminuir o custo da técnica e aumentar a produção para esse tipo de muda.

A nutrição mineral também pode contribuir para redução do período de aclimatização, além de ser um dos principais fatores responsáveis pela qualidade das mudas. Considerando o nitrogênio um elemento limitante ao crescimento vegetativo do abacaxizeiro (Aquino et al., 1986), sua aplicação em mudas micropropagadas tem demonstrado resposta positiva no crescimento das mesmas (Ribeiro et al., 2011).

As informações sobre o crescimento e a nutrição das plantas são fundamentais para o aprimoramento da produção de mudas do abacaxizeiro. Desta forma, o uso de bactérias diazotróficas, pode diminuir a adubação nitrogenada por meio do processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN) que converte nitrogênio atmosférico em amônia, podendo ser utilizada pela planta para o crescimento (Döbereiner, 1997) possibilitando a redução do gasto com este insumo.

Em plantas, a absorção de nutrientes ocorre, principalmente, via transportadores específicos encontrados nas membranas de células de raízes. Esses transportadores executam um transporte ativo de nutrientes do solo para o interior da célula (Morsomme e Boutry, 2000). A energia utilizada pelos transportadores secundários é fornecida pelos sistemas de transporte primário de prótons, constituídos pelas bombas de prótons (H^+), que são enzimas de membranas, localizadas nas membranas. Tais bombas induzem o crescimento do vegetal (Coleman et al., 1997; Ramos 2005). Essas enzimas são utilizadas como marcador bioquímico e podem demonstrar a eficácia de sistemas secundários de translocação de íons, fundamentais para a absorção de nutrientes e crescimento vegetal.

Visando promover o aumento do crescimento e desenvolvimento de mudas micropropagadas de abacaxizeiro e a redução do período de aclimatização, este

trabalho tem como objetivo avaliar; o acúmulo de nutrientes, a população de bactérias diazotróficas e a atividade das bombas H^+ em mudas de abacaxizeiro em resposta à aplicação de bactérias promotoras de crescimento vegetal e doses de nitrogênio no período de aclimatização. Os objetivos específicos são:

- Avaliar a inoculação de bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada sobre o crescimento e o conteúdo de nutrientes em mudas micropropagadas do abacaxizeiro 'Vitória';
- Quantificar se ocorre redução do tempo de aclimatização de mudas micropropagadas do abacaxizeiro em função da adubação nitrogenada e de inoculação com bactérias diazotróficas;
- Determinar a população de bactérias promotoras de crescimento vegetal em mudas do abacaxizeiro;
- Avaliar a atividade de bombas de prótons (H^+) totais (P H^+ -ATPases e V H^+ -ATPases) em membranas totais, isoladas de raízes de mudas do abacaxizeiro inoculadas com bactérias diazotróficas em função da adubação nitrogenada.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O abacaxizeiro: aspectos botânicos e cultivares

O abacaxizeiro (*Ananas comosus* L., Merrill) é uma planta originária da América tropical e subtropical, provavelmente da região central e sul do Brasil, do noroeste da Argentina e do Paraguai (Johnson, 1935).

É uma planta herbácea perene, pertencente à família Bromeliaceae (Cunha e Cabral, 1999). O abacaxi é um fruto múltiplo sincarpo, formado pela junção dos frutos individuais, do tipo baga (Collins, 1960; Py, 1969), apresenta características apreciáveis de sabor, aroma e cor, tem expandido sua comercialização no mercado mundial de frutas, se tornando um dos mais importantes no mercado de frutas tropicais (Ramos et al., 2009).

As cultivares de abacaxizeiro mais plantadas no mundo estão reunidas em cinco grupos Cayenne, Spanish, Queen, Pernambuco e Perolera, apresentam características comuns tais como: número de filhotes, número de rebentões, comprimento das folhas, presença de espinhos, comprimento do pedúnculo, peso médio do fruto, forma e tamanho dos frutinhos, coloração da polpa, teor de açúcar e acidez (Py et al., 1984).

As cultivares de abacaxizeiro Smooth Cayenne e Pérola são as mais conhecidas e cultivadas no Brasil e no mundo, ambas suscetíveis à fusariose, principal problema fitossanitário da cultura no país. Para minimizar esse problema é necessário plantar mudas saudáveis e fazer pulverizações frequentes com fungicidas. No entanto, a

utilização de cultivares resistentes é o método mais eficiente e econômico recomendado para o controle dessa doença (Ramalho et al., 2009; Freitas, 2010).

As plantas da cultivar Smooth Cayenne apresentam porte semiereto, dois a três pares de espinhos na extremidade dos bordos, pedúnculo curto com ± 15 cm, coroa pequena, poucos filhotes, suscetibilidade à fusariose (*Fusarium subglutinans*) e a murcha causada por cochonilhas. O fruto tem forma cilíndrica, com peso variando entre 1,5 a 2,5 kg, polpa amarela, casca de cor amarelo-alaranjada na maturação, elevado teor de açúcar e média acidez (Cunha e Cabral, 1999). Produz maior quantidade de mudas do tipo rebentão e menor produção de mudas do tipo filhote (Ramalho et al., 2009). Possui características favoráveis a exportação da fruta fresca e a industrialização (Rohrbach et al., 2003).

A cultivar Pérola ou Pernambuco “Grupo Pernambuco”, a mais plantada no Brasil, apresenta porte médio, crescimento ereto, com folhas compridas de ± 65 cm de comprimento e com espinhos nas bordas e próximo ao pedúnculo, o qual é longo (± 30 cm), quantidade elevada de mudas do tipo filhotes (10-15), susceptível a fusariose, porém, apresenta certa tolerância à murcha causada por cochonilha. O fruto tem forma cônica, coroa grande, peso de 1 a 1,5 kg, casca amarela, polpa branca com muito suco, teor de açúcar elevado e pouco ácida. Apesar de suas boas características organolépticas, não apresenta características apropriadas para a industrialização e exportação “in natura” (Cunha e Cabral, 1999).

Por estes materiais genéticos apresentarem pouca resistência a fusariose e diante da necessidade de obtenção de cultivares resistente à principal doença que atinge a abacaxicultura, algumas instituições de pesquisa, entre elas a EMBRAPA e o INCAPER vem lançando novas cultivares no mercado brasileiro, como as cultivares Imperial e Vitória.

Com intuito da redução das perdas causadas pela fusariose foi desenvolvido por programas de melhoramento genético a cultivar Imperial, um híbrido resultante do cruzamento de ‘Perolera’ com ‘Smooth Cayenne’, lançado em 2003, pela EMBRAPA Mandioca e Fruticultura. Apresenta resistência à fusariose, os frutos possuem coloração amarela, teores de açúcar elevados e excelente sabor nas análises sensoriais. O abacaxizeiro ‘Imperial’ não desenvolve espinhos nas folhas. As características sensoriais e físico-químicas são apropriadas tanto para o consumo “in natura”, quanto para a industrialização. As desvantagens observadas na cultivar Imperial são: crescimento lento, pedúnculo de diâmetro delgado, fruto de tamanho

pequeno a médio, perfil do frutinho proeminente, produção de três a cinco mudas tipo filhote presas à base do fruto (Cabral e Matos, 2005).

A cultivar Vitória foi lançada pelo INCAPER, originado do cruzamento entre 'Primavera' e 'Smooth Cayenne'. A planta apresenta ausência de espinhos nas folhas. O fruto possui polpa branca, boa suculência, reduzido tamanho do eixo central, elevado teor de açúcares (média de 15,8°Brix) e excelente sabor nas análises químicas abacaxizeiro, e podem ser destinados ao mercado de consumo 'in natura' e para a agroindústria, devido às suas adequadas características sensoriais e físico-químicas. A resistência a fusariose é outra principal vantagem da cultivar, podendo ser dispensado o uso de fungicidas para o controle desta doença (Ventura et al., 2006).

2.2. Propagação do abacaxizeiro

O abacaxizeiro, planta herbácea com inflorescência terminal e flores autoestéreis, produz frutos múltiplos, tipo sorose, partenocarpicamente, podendo ocorrer formação de sementes pela polinização cruzada intervarietal, o que permite a reprodução sexuada. Esse método de propagação é usado em programas de melhoramento vegetal (Py, 1969; Cunha e Cabral, 1999).

Na propagação assexuada abacaxizeiro são utilizados diferentes tipos de mudas que são brotações da planta mãe as quais são: filhote, filhote-rebentão e rebentão. A coroa pode também gerar uma planta, porém, esse método é pouco utilizado, pois a mesma é levada junto ao fruto no momento da venda do produto (Py et al., 1984).

As mudas utilizadas para implantação de novas lavouras, muitas vezes, são adquiridas de plantios comerciais e CEASAs, comprometendo a qualidade do material (Freitas, 2010). Essas mudas podem ser fonte de inóculo do fungo causador da principal doença da abacaxicultura, a fusariose, responsável por perdas significativas na produção de frutos. A cultura pode ser atingida pela infecção em todos os estádios fenológicos e os tecidos afetados apresentam podridão (Matos e Cabral, 2005).

Com a busca ao controle da doença, novas cultivares resistentes à fusariose vêm sendo lançadas. Assim, outros métodos de propagação de mudas têm sido difundidos, de forma a aumentar a produção dessas cultivares, afim de

promover maior produção das mudas de abacaxizeiro. Desta forma, a cultura de tecidos tem se tornado uma excelente aliada a essa conquista. Esse método tem oferecido a oportunidade de produção em larga escala comercial de plantas de diferentes espécies (Cid, 2001).

As etapas necessárias para o cultivo *in vitro* até a formação da muda, para plantio definitivo têm as seguintes atividades: plântulas a partir de gemas axilares (2 a 3 meses), multiplicação das gemas (3 a 5 meses), enraizamento (2 meses) e aclimatização e crescimento em casa de vegetação (6 a 8 meses), resultando em um período médio de 13 a 18 meses (Teixeira et al., 2001). O longo período de aclimatização é necessário, pois as plantas apresentam características anatômicas e fisiológicas desfavoráveis para enfrentar as condições edafoclimáticas no campo (Barboza et al., 2006).

A aclimatização da planta necessita de condições controladas, onde são utilizadas estufas, túneis plásticos, sistemas de nebulização, antitranspirantes e de substrato específicos que tornam ainda mais elevado o custo de produção dessas mudas (Guerra e Nodari, 2006). O período de aclimatização do abacaxizeiro é um dos maiores motivos pelo qual as mudas têm preço elevado (Teixeira et al., 2001).

2.3. Nitrogênio no abacaxizeiro

No processo produtivo de mudas de abacaxizeiro os principais fatores para o desempenho adequado destas são a nutrição e adubação (Freitas, 2010).

A cultura do abacaxizeiro requer para o desenvolvimento e crescimento das plantas quantidades diferenciadas de macronutriente que são em ordem decrescente: potássio (K), nitrogênio (N), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S) e fósforo (P). Para os micronutrientes são: cloro (Cl), manganês (Mn), ferro (Fe), zinco (Zn), boro (B), cobre (Cu) e molibdênio (Mo). O K elemento exigido em maior quantidade é o nutriente que mais interfere na qualidade do fruto de abacaxi. Já o N é envolvido mais com o crescimento vegetativo (Aquino et al., 1986; Malavolta et al., 1997; Souza, 1999; Gonçalves e Carvalho, 2000, Ramos et al. 2011).

Nos vegetais, o N tem sido um dos principais elementos que limita o crescimento. Plantas com quantidades inadequadas deste elemento não têm a capacidade de mostrar seu potencial produtivo, visto que, sob tais condições,

podem ocorrer reduções significativas na taxa assimilatória líquida de CO₂ (Evans, 1989).

Na natureza o N encontra-se na forma de nitrogênio atmosférico (N₂), não estando disponível para plantas, animais e maioria dos organismos vivos. Para que a planta possa assimilar o N atmosférico é necessária a quebra de uma ligação tripla co-valente entre os dois átomos de N para produzir amônia (NH₃) ou nitrato (NO₃⁻) (Taiz e Zeiger, 2009).

O N está envolvido em todos os processos vitais, constituintes de várias biomoléculas tais como ATP, NADH, NADPH, clorofila, proteínas e enzimas (Mifflin e Lea, 1976; Harper, 1994). Segundo Paula et al. (1998), o K e o N são os nutrientes mais exigidos pelo abacaxizeiro. E para o crescimento do abacaxizeiro, o N é o elemento de maior importância (Aquino et al., 1986). O N também influencia a acidez do suco, teor de açúcares e ácido ascórbico e tem principal influência no peso dos frutos (Freitas, 2010; Souza, 1999).

Plantas com sintomas de deficiências de N em abacaxizeiro têm crescimento lento, são raquíticas, retardo na frutificação, a folhagem amarelo-esverdeada a amarela, folhas pequenas, estreitas e pouco numerosas, coroas e frutos pequenos com menores teores de açúcar (Py et al., 1984; Py et al., 1987; Manica, 1999; Gonçalves e Carvalho, 2000).

2.4. Bactérias promotoras de crescimento vegetal

Um dos grupos de microrganismos mais importantes para a agricultura encontrados no solo são as bactérias promotoras de crescimento vegetal. Habitam a rizosfera, rizoplano e interior da planta hospedeira, conferindo aos vegetais maior resistência a condições de estresse biótico e abiótico, além de favorecer o crescimento da planta (Olivares, 2009).

Bactérias diazotróficas se constituem como um grupo de bactérias fixadoras de nitrogênio (N) capazes de reduzir a molécula do N₂ para amônia (NH₃), sendo as mesmas consideradas como bactérias promotoras de crescimento vegetal. São capazes de enriquecer seletivamente a rizosfera, local em que habitam como organismos de vida livre ou estão associadas à planta (Dobbelaere et al., 2003).

Estudos apontam que as bactérias promotoras de crescimento não apenas fixam o N₂, mas seus efeitos ao crescimento da planta surgem de diferentes mecanismos, incluindo: produção de sideróforos, atividade de enzima nitrato redutase, metabolismo/síntese e transporte de fitormônios com liberação para as plantas, solubilização de fosfato, antibiose e antagonismo a patógenos, atuando assim, no crescimento do vegetal (Cassan et al., 2001).

A prática da inoculação de bactérias promotoras do crescimento vegetal já é conhecida em plantas não leguminosas, tendo sido amplamente estudada nas últimas décadas, e testada em alguns países, demonstrando bom potencial para o agronegócio (Kennedy et al., 2004). Como por exemplo, em mandioca (Balota et al., 1997), banana (Weber et al., 2000), cana-de-açúcar (Silva, 2009), milho (Hungria et al., 2010) e muitas outras culturas de importância econômica.

Segundo Souza (1999), o N é considerado o principal elemento, responsável pela elevada produtividade dessa cultura. Portanto, a deficiência do mesmo resulta em baixo potencial fisiológico da planta, comprometendo o crescimento da cultura, havendo assim demanda por fertilizantes químicos para cumprir essa necessidade. Nesse sentido, o uso de bactérias diazotróficas pode diminuir a utilização desses insumos.

Weber et al. (2004) afirmam que a associação simbiótica de algumas gramíneas com bactérias promotoras de crescimento resulta na fixação biológica de N, supondo-se que poderá ocorrer o mesmo processo em abacaxizeiro, principalmente quando expostos a solo com baixa fertilidade. Porém, a melhoria da produtividade alcançada com esta prática para as espécies não leguminosas apresenta variação de 0 a 30% e baixa reprodução para algumas culturas (Dobbelaere et al., 2003).

Weber e Freire (2003), avaliando a produção de bananeiras com duas doses de ureia (210 e 350 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de N) na ausência e presença da inoculação *B. cepacia* AB202, mostraram que as plantas que receberam a estirpe, anteciparam o lançamento de cachos. A presença de bactérias aumentou a produção das plantas em um aumento (9,5%) equivalente a 2.900 kg ha⁻¹ de banana, quando comparados com o tratamento não inoculado.

Estudo tem comprovado a eficiência de bactérias diazotróficas no crescimento de mudas micropropagadas de abacaxizeiro (Weber et al., 2003). Baldotto et al. (2010) observaram que bactérias diazotróficas do gênero

Burkholderia estimulam o crescimento de plantas micropropagadas do abacaxizeiro 'Vitória', promovendo: aumento no conteúdo de nutrientes, produção de fitormônios e solubilização de fosfatos, melhorando a adaptação das plântulas ao ambiente *ex vitro* possibilitando a redução no período de aclimatização.

2.5. Atuação das Bombas de H⁺ (tipos P e V) nas plantas

As membranas biológicas são permeáveis a moléculas não polares e polares pequenas e muito permeáveis a moléculas polares grandes como açúcares e água. Isso é possível porque as membranas possuem proteínas de transporte. Os sistemas de transportadores são estabelecidos por dois grupos: os transportadores primários, constituídos por bombas eletrogênicas ou eletroneutras e o sistema de transporte secundário os quais são: canais, carreadores ou transportadores que podem transportar íons através da membrana. Esses transportadores secundários são impulsionados pelo potencial eletroquímico gerado pelas bombas de prótons(H⁺) (Logan et al., 1997; Taiz e Zeiger, 2009).

Em membranas de células vegetais, são encontrados três tipos de H⁺-ATPases. Elas se diferenciam por suas estruturas, suas funções, seus mecanismos de ação e evolução, cada uma representa uma das três classes de ATPases translocadoras de cátions e são: H⁺-ATPase da membrana vacuolar (tipo V), H⁺-ATPase da membrana plasmática (tipo P) e a H⁺-ATPase das membranas do cloroplasto e da mitocôndria (tipo F). Existem ainda no tonoplasto outra classe de enzimas denominadas de pirofosfatases (H⁺-PPases), que são enzimas que translocam prótons acoplados à hidrólise do pirofosfato inorgânico (PPi) (Rea et al., 1992).

As bombas de H⁺ são transmembranares e utilizam a energia da hidrólise de ATP, gerando um gradiente eletroquímico que está diretamente envolvido em mecanismos fundamentais para o desenvolvimento vegetal (Rodda et al., 2006). Essas bombas energizam os transportes ativos secundários de íons inorgânicos, o que é fundamental para absorção de macro e micronutrientes; faz com que ocorra o aumento da plasticidade da parede celular por meio da acidificação do apoplasto, sendo esse mecanismo fundamental para o processo de crescimento e alongamento da célula vegetal (Cosgrove, 1997).

As H⁺-ATPases do tipo P bombeiam prótons na plasmalema e são encontradas em todos os tipos de células vegetais. Elas geram através da

membrana um gradiente de pH e um potencial elétrico, assim induzem o crescimento do vegetal, provocado pela acidificação da parede celular. Esse mecanismo aumenta a plasticidade da mesma e possibilita a expansão celular. As H⁺-ATPases também são essenciais na retirada de H⁺ do citoplasma (Serrano, 1989).

As H⁺-ATPase do tipo V bombeiam prótons para dentro do vacúolo e são localizadas no tonoplasto, acidificando o vacúolo e fornecendo energia para o transporte de íons inorgânicos, açúcares e ácidos orgânicos (Rea e Sanders, 1987). Podem ser estimuladas ou ativadas em resposta a alguns fatores como: estresse salino, distúrbios nutricionais e substâncias tóxicas de metais pesados (Dietz et al., 2001; Zhang et al., 2006).

Essas enzimas exercem um papel fundamental no controle do pH citoplasmático e na manutenção da homeostase celular, por isso podem causar grandes efeitos no desenvolvimento da planta (Taiz e Zeiger, 2009). Sendo necessário a manutenção ou ajuste da atividade da V-H⁺-ATPase na sobrevivência de células vegetais submetidas a condições de estresses tais como salinidade, déficit hídrico, baixas temperaturas, acidez, anoxia e excesso de metais pesados nos solos (Dietz et al., 2001).

Estudos demonstram que a H⁺-ATPase (próton ATPase de membrana plasmática) pode se acumular em tecidos particulares da planta ou também em tipos de células do ápice, pelos e epiderme radicular, células-guardas e de transferência e em células do estelo. Em alguns casos, foi observado no córtex e na endoderme, elevada expressão de genes relacionados a H⁺-ATPase (Parets-Soler et al., 1990; Jahn et al., 1998; Morial et al. 1999).

Vários estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de verificar a atividade das bombas de prótons em células vegetais como exemplo no desenvolvimento inicial de plântulas de alface (Rodda et al., 2006) e a atividade dessas bombas em frutos de tomate (Azevedo et al., 2009).

As P H⁺-ATPase estão diretamente envolvidas em várias funções no vegetal, como na absorção de nitrato (NO³⁻), o qual é dependente da atividade das bombas de H⁺, que gera através da membrana plasmática um gradiente de próton, fazendo com que ocorra a absorção ativa contra um gradiente de potencial eletroquímico (Glass et al., 1992).

Estudos demonstraram a atividade das bombas de prótons em plantas colonizadas com microrganismos. Benabdellah et al. (1999) verificaram respostas no crescimento de plantas de tomate quando colonizadas com Fungos micorrízicos arbusculares. Plantas inoculadas com *Glomus mosseae* mostraram maior atividade enzimática de P H⁺-ATPase e a porcentagem de colonização correlacionou-se com a atividade da enzima.

Olivares et al. (2002) verificaram em cana-de-açúcar a estimulação da atividade da P H⁺-ATPase, quando as plantas foram inoculadas com a estirpe *Herbapirillum seropedicae* HRC54 e *Gluconacetobacter diazotrophicus* estirpe PAL 5, obtendo também mudanças morfológicas radiculares e incremento de nutrientes na fase inicial do estabelecimento. A *Herbapirillum seropedicae* contribuiu para o incremento da biomassa radicular, área foliar, conteúdo de clorofila e de nutrientes.

3. TRABALHOS

3.1. BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E ADUBAÇÃO NITROGENADA NO CRESCIMENTO DE MUDAS MICROPROPAGADAS DE ABACAXIZEIRO DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO

RESUMO

O processo de micropropagação do abacaxizeiro é uma alternativa para produção de grande quantidade de mudas. Estas, após a retirada do cultivo *in vitro*, apresentam crescimento lento e necessitam de um longo período de aclimatização. O objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas e adubação nitrogenada no crescimento de mudas micropropagadas de abacaxizeiro 'Vitória' durante o período de aclimatização. O delineamento experimental foi de blocos casualizados (DBC), em esquema fatorial (2x5x5), sendo os fatores representados por dois tipos de inóculos (ausência e presença de uma mistura de bactérias diazotróficas contendo *Burkholderia* sp. UENF 114111, *Burkholderia silvatlantica* UENF 117111 e *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC 54), cinco doses de ureia (0, 2, 5, 7 e 10 g L⁻¹) e cinco épocas de avaliação do tempo de aclimatização (30, 60, 90, 120 e 150 dias após o plantio das mudas em bandejas), com quatro blocos. A unidade experimental foi composta por quatro plantas cultivadas em bandeja de isopor. Verificou-se aumento na massa seca da parte aérea e massa seca da raiz de mudas micropropagadas

de abacaxizeiro 'Vitória' em função da inoculação de bactérias diazotróficas. A aclimatização pode ser reduzida em até 60 dias em função da dose de N.

Palavras-chave: *Ananas comosus*, bactéria promotora de crescimento vegetal, nitrogênio, micropropagação, abacaxi.

DIAZOTROPHIC AND NITROGEN FERTILIZATION ON THE GROWTH OF PINEAPPLE DURING THE ACCLIMATION PERIOD

ABSTRACT

The process of micropropagation of pineapple is an alternative method for producing large quantities of seedlings. After withdrawal of these in vitro experiments have slow growth rate and require a longer period of acclimatization. The objective of this work was to study the effect of inoculation with diazotrophic bacteria and nitrogen fertilization on the growth of micropropagated pineapple plants 'Vitoria' during the acclimatization period. The experimental design was a randomized block design (RBD) in a factorial design (2x5x5), the factors being represented by two types of inocula (absence or presence of a mixture of diazotrophs containing *Burkholderia* sp. UENF 114111, 117111 UENF *Burkholderia silvatlantica* and *Herbaspirillum seropedicae* strain HRC 54), five levels of urea (0, 2, 5, 7 and 10 g L⁻¹) and five evaluation periods of time of acclimatization (30, 60, 90, 120 and 150 days after planting the seedlings in trays) with four blocks. The experimental unit consisted of four plants grown in polystyrene tray. An increase in dry weight of shoot and root dry mass of micropropagated pineapple plants 'Victory' depending on the inoculation of diazotrophs. Acclimatization can be reduced up to 60 days depending on the dose of N.

Keywords: *Ananas comosus*, acclimatization, diazotrophs, nitrogen, pineapple, micropropagation.

INTRODUÇÃO

A propagação vegetativa do abacaxizeiro é a forma predominante para sua reprodução e pode ser feita por meio de mudas do tipo filhote, filhote-rebentão, rebentão e a coroa do fruto. Porém, esses métodos convencionais de propagação apresentam baixo rendimento de mudas (Matos et al., 2009). Vários outros métodos podem ser usados para aumentar a produção de mudas, tais como: destruição do meristema apical (Santos et al., 2011), seccionamento de caule (Freitas et al., 2012) e a micropropagação (Baldotto et al., 2010).

A micropropagação do abacaxizeiro permite a obtenção de mudas uniformes e sadias para formação de matrizeiro, notadamente de novas cultivares. Apesar dessas vantagens, esta técnica necessita de um longo período de tempo de aclimatização, o que torna o preço da muda pouco competitivo quando comparado com as mudas provenientes das demais técnicas de propagação (Matos et al., 2009; Baldotto et al., 2010; Santos et al., 2011). Entretanto, este período é necessário, pois plantas oriundas do cultivo *in vitro*, apresentam mudanças no mecanismo heterotrófico para o autotrófico e características anatômicas e fisiológicas desfavoráveis para enfrentar as condições edafoclimáticas (Barboza et al., 2006).

No intuito de promover essa adaptação, alguns estudos têm sido desenvolvidos, como o uso de substratos (Freitas et al., 2011), diferentes tempos de aclimatização (Berilli et al., 2011), reguladores de crescimento (Catunda et al., 2008), adubos foliares (Bregonci et al., 2008) e a inoculação de bactérias diazotróficas (Baldotto et al., 2010).

A adubação nitrogenada em abacaxizeiro é um dos aspectos mais relevantes para seu desenvolvimento, possibilitando incremento no crescimento de mudas como foi verificado por Freitas et al. (2012). Esse suprimento de N às plantas também pode ser feito por meio da inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal que têm se tornado cada vez mais comum na agricultura. A inoculação com bactérias diazotróficas isoladas da própria espécie vegetal têm demonstrado efeitos positivos na adaptação das plantas de abacaxizeiro ao ambiente externo (Baldotto et al., 2010), diminuindo o uso de fertilizante nitrogenado como já foi verificado em diversas culturas.

A interação entre a nutrição mineral e as bactérias diazotróficas podem contribuir para minimizar os efeitos críticos durante a aclimatização do abacaxizeiro, uma vez que a agricultura busca novas tecnologias que possam gerar ganhos econômicos e ecológicos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da inoculação com bactérias diazotróficas e da adubação nitrogenada no crescimento de mudas micropropagadas de abacaxizeiro 'Vitória' durante o período de aclimatização.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação localizada no *campus* da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (Latitude = 21°19'23", Longitude = 41°10'40" e Altitude = 14 m) no período de agosto de 2012 a janeiro de 2013.

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados (DBC), em esquema fatorial (2x5x5), sendo os fatores representados por dois tipos de inóculos (ausência e presença de uma mistura de bactérias diazotróficas contendo *Burkholderia* sp. UENF 114111, *Burkholderia silvatlantica* UENF 117111 e *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC 54), cinco doses de ureia (0, 2, 5, 7 e 10 g L⁻¹) e cinco épocas de avaliação do tempo de aclimatização (30, 60, 90, 120 e 150 dias após o plantio das mudas em bandejas), com quatro blocos. A unidade experimental foi composta de quatro plantas cultivadas separadas em células de bandeja de isopor.

As estirpes foram adquiridas no laboratório de biologia celular e tecidual da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e fazem parte da coleção de bactérias. As do gênero *Burkholderia* são isoladas de plantas abacaxizeiro cv Smooth Cayenne (Santos, 2008) e *Herbaspirillum seropedicae* HRC 54 isoladas de plantas de cana-de-açúcar (Olivares, 1997).

As mudas de abacaxizeiro 'Vitória' foram procedentes do Laboratório de cultura de tecidos Biomudas, localizado em Venda Nova do Imigrante-ES, provenientes de propagação *in vitro*. As mudas enraizadas estavam acondicionadas em potes de vidro tipo *baby food*, mantidas em meio MS (Murashige e Skoog, 1962). Por ocasião da implantação do experimento as mudas

foram lavadas para retirada do meio e selecionadas com peso médio de 0,30 g de matéria fresca.

Para a obtenção de cada pré-inóculo, 20 uL do estoque bacteriano foi diluído em meio de cultivo líquido DYG'S (pré-inóculos) (Döbereiner et al., 1995) e mantidos sob agitação orbital de 140 rpm a 30°C por 24 horas. Após esse tempo, cada inóculo foi preparado utilizando alíquota de 100 uL do pré-inóculo em 100 mL de meio líquido DYG's, permanecendo sob agitação orbital de 140 rpm a 30°C, o que correspondeu a um volume final de 100 mL de cada inóculo.

Na produção da mistura bacteriana, os inóculos foram dissolvidos em 5700 mL de água destilada. A inoculação ocorreu no momento do transplântio, realizada pela imersão das plantas de abacaxizeiro à mistura bacteriana por 30 minutos e o controle imerso em água destilada. Em seguida as plantas foram transferidas para bandejas de isopor de 200 células preenchidas com substrato Vivatto Slim Plus® (Tabela 1). Após 15 dias, o substrato foi inoculado e cada célula da bandeja recebeu 2 mL da mistura bacteriana.

Tabela 1. Características químicas da amostra do substrato Vivatto Slim Plus® composto por moinho de carvão vegetal, casca de pinus bio estabilizada, vermiculita, água e espuma fenólica

pH	K	Ca	Mg	Al	Na	SB	V	P	S	Fe	Cu	Zn	Mn	B
5,9	mmol _c dm ⁻³						(%)	mg dm ⁻³						
	29,7	96	58	0	13,2	196,9	85	400	1090	155,9	1,71	32,5	84,2	4,18
Matéria orgânica= 131 g dm ⁻³														

A análise foi realizada pelo Laboratório de Análise de Solos da FUNDENOR, Campos dos Goytacazes, RJ.

Aos 15 dias após o transplântio, semanalmente, em cada unidade experimental foi realizada uma adubação foliar com 8 mL da solução nutritiva completa preparada conforme Ramos et al. (2011) (Tabela 2). A partir da terceira semana a solução aplicada foi sem N, por ocasião dos tratamentos. Cada planta recebia ±2 mL das soluções. Em plantas do tratamento controle, aos 121 dias, foi aplicada solução completa, a fim de evitar perda das mudas pela deficiência do N. Todas as adubações foram feitas a partir das 17:00 horas, usando uma proteção para evitar a deriva e a contaminação dos tratamentos.

Tabela 2. Composição química da solução nutritiva completa e com omissão de nitrogênio (mL L⁻¹)

Soluções estoques	Completa	(-N)
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O 2mol L ⁻¹	1	
KNO ₃ 2mol L ⁻¹	2	
MgSO ₄ ·7H ₂ O 1mol L ⁻¹	1	1
(NH ₄)H ₂ PO ₄ 1mol L ⁻¹	0,25	
H ₃ BO ₃	1	1
Fe-EDTA	1	1
Micro -B -Fe	1	1
CaCl ₂ 2mol L ⁻¹		1
KCL 1mol L ⁻¹		3,75
KH ₂ PO ₄ 1mol L ⁻¹		0,25
NH ₄ Cl 1mol L ⁻¹		0,25

Para o preparo de 1L de solução de micronutrientes (-B e -Fe), foram utilizados os seguintes reagentes analíticos: KCl = 3,7467 g; MnSO₄·2H₂O = 0,8451 g; ZnSO₄·7H₂O = 0,5780 g; CuSO₄·5H₂O = 0,1267 g; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O = 0,088 g.

Para adubação nitrogenada, inicialmente as doses de ureia foram parceladas, a fim de evitar a queima das folhas. Conforme os tratamentos a unidade experimental recebeu a seguinte concentração: aos 25 dias - 20% da dose; aos 50 dias - 50% da dose e a partir dos 75 dias, semanalmente, foi aplicada a dose completa. Para aplicação da adubação nitrogenada, foi preparada uma solução com a concentração das doses que foram fornecidas via foliar, com auxílio de um pulverizador manual, onde cada muda recebeu ±1 mL da solução.

Após o transplante, com auxílio de um pulverizador costal, as mudas foram pulverizadas com água a fim de evitar a desidratação das folhas. Nos primeiros 30 dias em um intervalo de duas horas. A partir deste período as pulverizações foram realizadas conforme a necessidade, sendo no mínimo feitas duas pulverizações e ao final do dia molhavam-se as mudas de forma a manter a capacidade de campo do substrato.

Os dados de temperatura média diária (°C) e umidade relativa média diária (%) registrados na casa de vegetação durante a condução do experimento foram monitorados por um medidor marca KILOG (KIMO Constructeur), programado para realizar leituras a intervalos de duas horas, e estão apresentados na Figura 1.

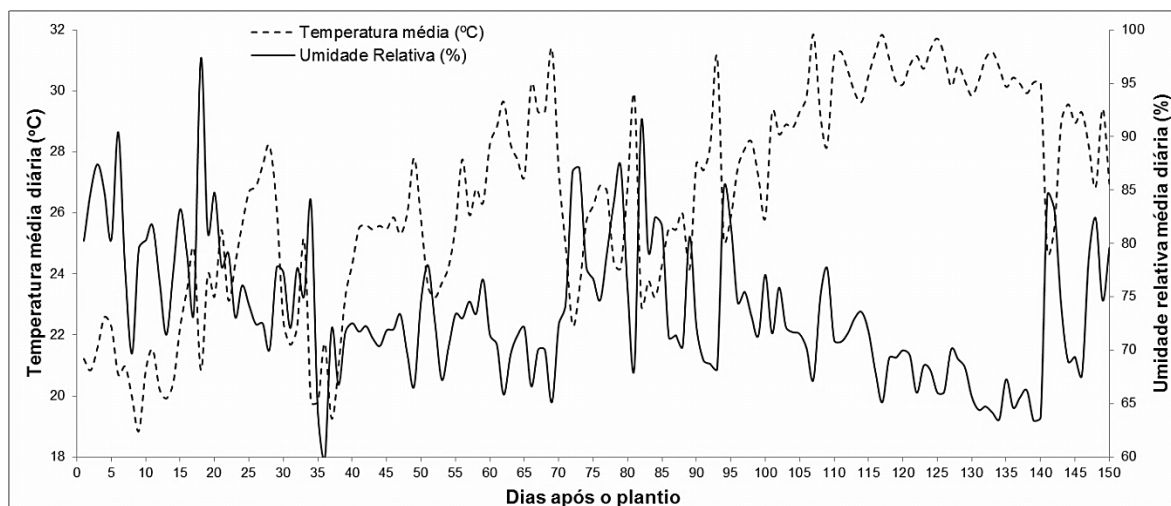


Figura 1. Temperatura média diária (°C) e umidade relativa média diária (%) registradas em casa de vegetação no período de condução do experimento (agosto/2012 a janeiro/2013).

Foram avaliados após o transplântio: a altura, o número de folhas, a área foliar, a massa seca da parte aérea e a massa seca da raiz.

A altura da muda foi medida com o auxílio de uma régua graduada em mm, as mudas tiveram suas folhas agrupadas para cima, medindo do colo da planta até a extremidade da folha maior. Para obtenção da massa seca da parte aérea e da raiz, as mudas foram secas em estufa de circulação forçada a 70°C até atingir o peso constante e posterior pesagem em balança analítica. A área foliar foi obtida no medidor de área foliar de bancada modelo LI-3100 LICOR, Lincoln, NE, USA.

Com base nos resultados obtidos para altura de planta e nas informações do setor produtivo de mudas micropropagadas do abacaxizeiro, estimou-se, para cada dose de ureia aplicada, o tempo necessário para que as mudas atingissem o tamanho de 6 e 12 cm de altura.

Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o programa SANEST. Para os dados quantitativos utilizou-se a análise de regressão polinomial, com teste F da análise da variância da regressão e coeficiente do modelo estatisticamente significativo e maior R². Para os dados qualitativos foi utilizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A inoculação de mudas do abacaxizeiro 'Vitória' com uma mistura de bactérias diazotróficas contendo *Burkholderia* sp. UENF 114111, *Burkholderia silvatlantica* UENF 117111 e *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC 54 promoveu aumento na matéria seca da parte aérea e na matéria seca de raiz no período de aclimatização (Tabela 3). Para a matéria seca da raiz, os resultados corroboraram com os encontrados por Baldotto et al. (2010), que verificaram efeitos positivos em mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Vitoria quando inoculadas com bactérias diazotróficas.

Weber et al. (2004), testando o efeito da inoculação com bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada sobre o crescimento e a produção de abacaxizeiro cv. Cayenne Champac verificaram que as bactérias proporcionaram menor desenvolvimento das características avaliadas quando associadas às menores concentrações de N.

Tabela 3. Altura de planta, número de folhas por planta, área foliar por planta, massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR) de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Vitória em função da inoculação com bactérias diazotróficas até 150 dias de aclimatização. Médias da avaliação de cinco épocas.

Inoculação com bactéria diazotrófica	Altura de planta (cm)	Nº de folhas por planta	Área foliar (cm ²)	MSPA (mg)	MSR (mg)
Não	9,73 a	13,07 a	63,0 a	365 b	39,7 b
Sim	9,77 a	13,17 a	63,7 a	400 a	45,2 a
Média	9,75	13,12	63,3	382	42,5
CV (%)	8,27	7,08	18,18	25,3	30,6

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna, não diferem entre si, a 5% de significância pelo teste de Tukey

Mudas micropropagadas com maior massa seca da parte aérea e de raiz poderão apresentar melhor crescimento aéreo e radicular em fases posteriores, possibilitado melhor desenvolvimento da planta. Ribeiro et al. (2011) avaliaram o desempenho de raízes pré-formadas de mudas micropropagadas 'Vitória' com diferentes tipos de podas radiculares em quatro épocas de aplicação de N. Esses autores utilizaram mudas que apresentavam em média 1,71 g de massa seca de parte aérea, e verificaram que mudas com 0,20 g de massa seca de raiz, as quais

não foram podadas apresentavam em todas as épocas de avaliação maior massa seca total, área radicular e acúmulo de N.

Além da fixação biológica de N, o crescimento vegetal induzido por bactérias diazotróficas pode ser proporcionado pelo aproveitamento de fitormônios produzidos pelas bactérias. Bashan e Holguin (1997) afirmam que o ácido indol-acético (AIA), produzido por *Azospirillum* desempenha papel essencial na promoção do crescimento de plantas em geral. Bastián et al. (1998) em cultivo de células de *H. seropedicae* detectaram a produção de ácido indol-acético (AIA), GA1 e GA3. Diante desta possibilidade para o crescimento vegetal, nas condições deste trabalho, além da fixação de nitrogênio, as bactérias podem ter contribuído para o aumento do peso seco da parte aérea pela indução de substâncias reguladoras de crescimento.

Quanto ao crescimento da parte aérea, efeitos diferentes foram observados por Weber et al. (2003) ao avaliarem o efeito da inoculação com bactérias diazotróficas da espécie *Asaia bogorensis* e o uso de diferentes substratos em mudas micropropagadas de abacaxizeiros cv. Cayenne no período de aclimatização. Os autores verificaram maior crescimento das raízes em plantas inoculadas e cultivadas em substrato composto da mistura de casca de arroz carbonizada, vermiculita e vermicomposto. Porém, não houve o crescimento significativo na parte aérea das mudas quando mantidas nestas mesmas condições.

Com relação à altura de plantas, verifica-se na Figura 2 que ocorreu incremento significativo no período de aclimatização avaliado, com maiores incrementos à medida que as doses de ureia foram aumentadas. A altura de planta é uma característica biométrica importante no processo de aclimatização, sendo o parâmetro indicado para se quantificar o tempo em que a planta atinge o ponto final da aclimatização. Segundo Berilli et al. (2011), normalmente quando a planta atinge de 6 a 7 cm de altura e de 2 a 3 g de massa seca da parte aérea, a muda pode ser comercializada para a aclimatação.

A adubação nitrogenada promoveu incremento na altura de plantas das mudas do abacaxizeiro nas avaliações entre 60 e 150 dias. Verifica-se que os maiores resultados estimados, 11,9, 17,5 e 20,4 cm, foram obtidos, nos tempos 90, 120 e 150 dias de aclimatização, quando se aplicou 10,5, 8,15 e 8,10 g L⁻¹ de ureia.

Os menores resultados para altura de planta foram obtidos quando não se aplicou a adubação nitrogenada (Figura 2 e 3).

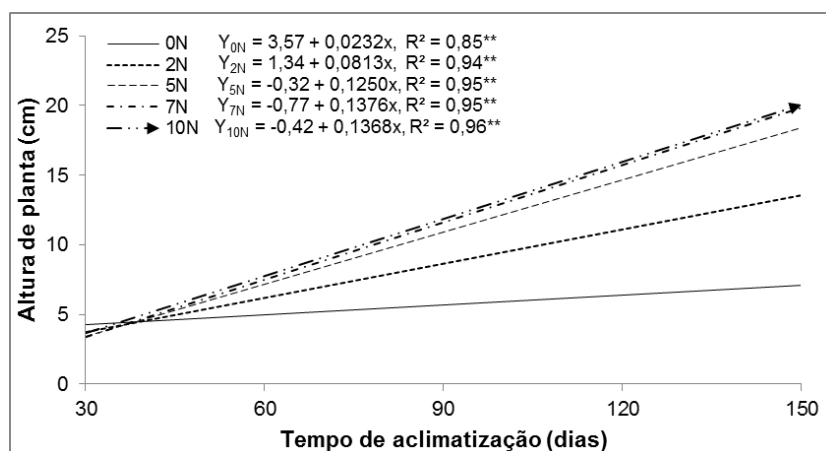


Figura 2. Altura de planta (cm) de abacaxizeiro em função do tempo de aclimatação (dias) em diferentes doses de adubação nitrogenada (g L⁻¹ de ureia).

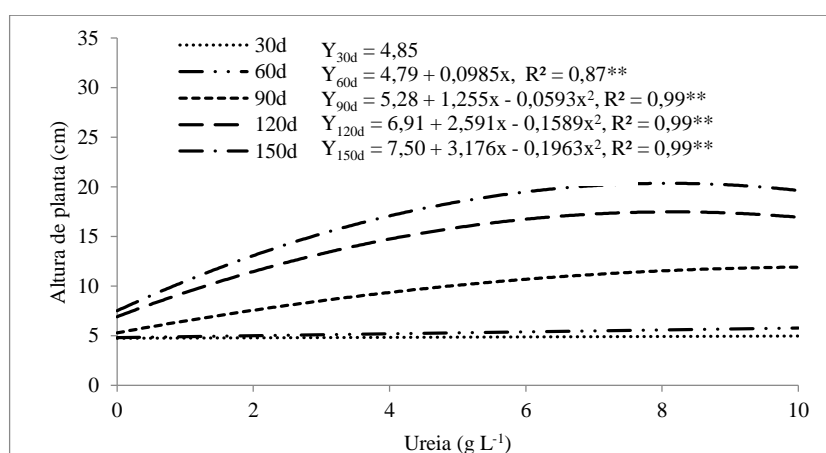


Figura 3. Altura de planta (cm) de abacaxizeiro em função de adubação nitrogenada (g L⁻¹ de ureia) em diferentes tempos de aclimatação (dias).

Coelho et al. (2007), testando os adubos foliares ureia, cloreto de potássio (KCl) e ácido bórico (H₃BO₃) em mudas de abacaxizeiro obtidas por seccionamento de caule, em fase de viveiro, verificaram efeito significativo na altura com uso de ureia, sendo que as maiores médias da planta foram observadas na dose de 10 g L⁻¹.

Freitas et al. (2012), estudaram em mudas de abacaxizeiro 'Smooth Cayenne', provenientes do seccionamento de caule, os efeitos da adubação nitrogenada e de um análogo de brassinosteroide. Eles verificaram com uso de

ureia nas concentrações de 10 e 15 g L⁻¹ de N, que houve efeitos significativos na altura e diâmetro das mudas cultivadas em canteiros.

Assim como para altura de planta, para as variáveis número de folhas (Figuras 4 e 5), área foliar (Figura 6 e 7), massa seca da parte aérea (Figuras 8 e 9) e massa seca de raiz (Figuras 10 e 11) verificou-se que houve interações significativas entre os fatores tempo de aclimatização e doses de ureia.

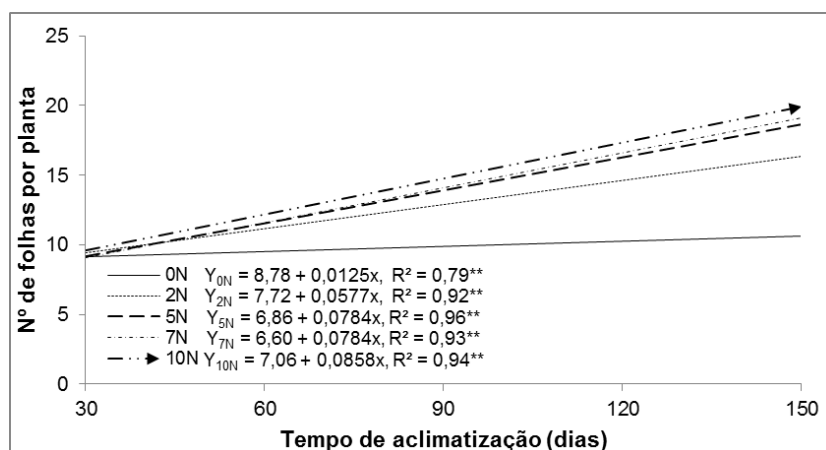


Figura 4. Número de folhas de abacaxizeiro em função do tempo de aclimatização (dias) em diferentes doses de adubação nitrogenada (g L⁻¹ de ureia).

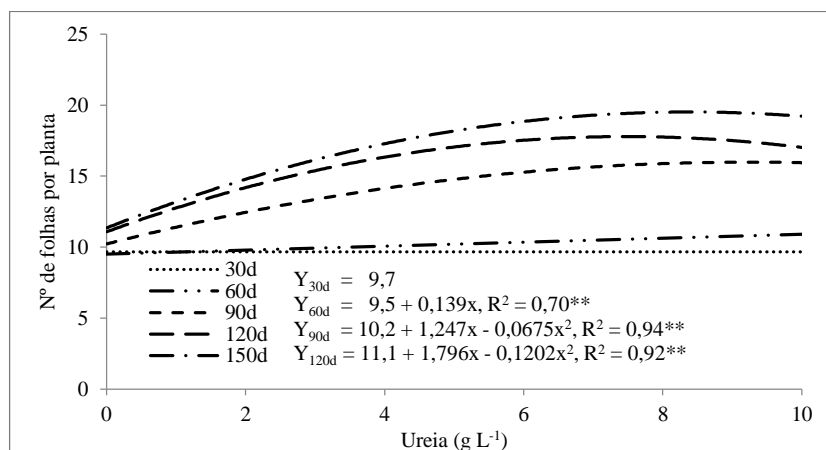


Figura 5. Número de folhas do abacaxizeiro em função de adubação nitrogenada (g L⁻¹ de ureia) em diferentes tempos de aclimatização (dias).

Quanto ao número de folhas, verifica-se que o efeito foi linear crescente em função do tempo de aclimatização das mudas (Figura 4), com maiores valores, no tempo, quando se utilizou doses maiores de nitrogênio. Com relação ao número de folhas em função da adubação nitrogenada, não foi verificado efeito nos primeiros 30 dias após o transplante e o efeito foi linear crescente até os 60 dias, sendo os

maiores valores estimados em 16, 18 e 19 folhas por planta, aos 90, 120 e 150 dias de aclimatização, respectivamente, com doses de ureia estimadas em 9,2; 7,5 e 8,4 g L⁻¹ nos respectivos tempos (Figura 5).

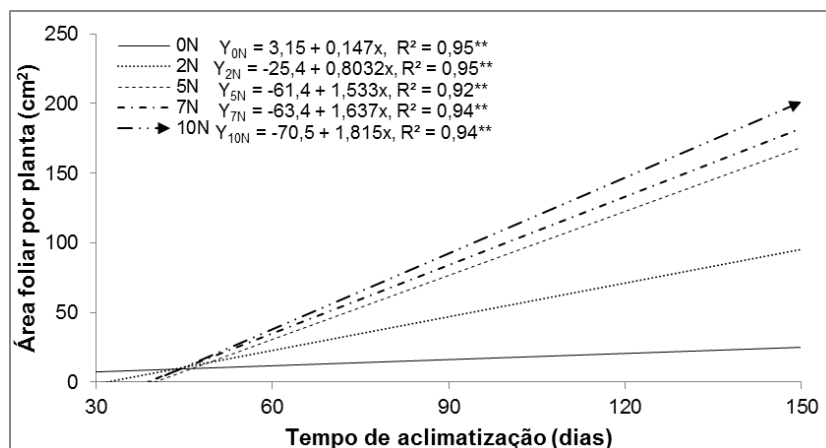


Figura 6. Área foliar (cm²) de abacaxizeiro em função do tempo de aclimatização (dias) em diferentes doses de adubação nitrogenada (g L⁻¹ de ureia).

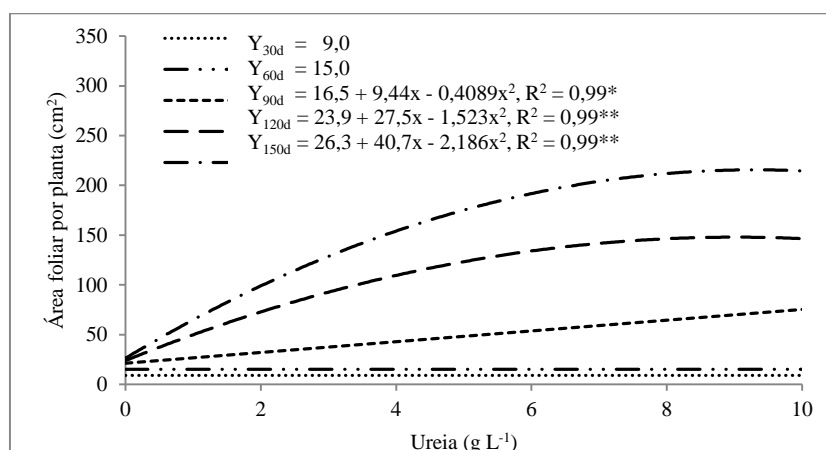


Figura 7. Área foliar (cm²) de abacaxizeiro em função de adubação nitrogenada (g L⁻¹ de ureia) em diferentes tempos de aclimatização (dias).

Estes resultados estão de acordo com Coelho et al. (2007), trabalhando com mudas de abacaxizeiro 'Smooth Cayenne' provenientes de seccionamento do caule, testando a aplicação de adubação foliar com ureia, KCl e H₃BO₃. Os resultados demonstraram o efeito significativo da adubação nitrogenada para o número de folhas, e os maiores valores encontrados foram em mudas que receberam dose de 10 g L⁻¹.

Os resultados obtidos para a área foliar tiveram comportamento semelhante aos verificados para altura de plantas e para número de folhas (Figuras 6 e 7). Quanto ao tempo de aclimatização, verificou-se crescimento linear da área foliar do abacaxizeiro, com maiores valores, ao longo do tempo, nas plantas que receberam maiores doses de adubo nitrogenado (Figura 6). Essa resposta somente foi verificada nas avaliações a partir de 90 dias de aclimatização. Os maiores valores de área foliar foram estimados em 71, 148 e 216 cm² por planta, aos 90, 120 e 150 dias de aclimatização, respectivamente, com doses de ureia estimadas em 11,5, 9,0 e 9,3 g L⁻¹ nos respectivos tempos (Figura 7).

A adubação nitrogenada é um fator limitante no crescimento da cultura, uma vez que o N faz parte de moléculas de aminoácidos e proteínas participando, ainda, de processos como, fotossíntese, absorção iônica, respiração, multiplicação e diferenciação celular. Abacaxizeiros deficientes em N apresentam menor quantidade de folhas, que se tornam amareladas, pequenas e estreitas (Py et al., 1987). Segundo Moreira et al. (2006), plantas micropropagadas com maior número de folhas podem obter maior índice de pagamento das mudas no campo, por serem providas de maior área fotossintética para produção de matéria orgânica.

Os resultados para massa seca da parte aérea do abacaxizeiro estão apresentados nas Figuras 8 e 9 e indicam comportamento semelhante ao verificado para outras variáveis apresentadas anteriormente. Para a adubação nitrogenada, resultados positivos foram verificados a partir dos 90 dias de aclimatização, com crescimento linear e menor aos 90 dias e quadrático aos 120 e 150 dias. Os maiores valores para massa seca da parte aérea foram estimados em 643 e 1422 mg por planta, aos 120 e 150 dias de aclimatização, respectivamente, com dose de ureia estimadas em 5,9 e 9,3 g L⁻¹ nos respectivos tempos (Figura 9).

Bregonci et al. (2008) testaram, em mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Gold, níveis diferentes de adubo foliar com doses crescentes de ureia e diferentes recipientes. Eles verificaram o efeito significativo no incremento do crescimento com uso da adubação nitrogenada para variável altura, área foliar e massa seca da parte aérea em todos os recipientes.

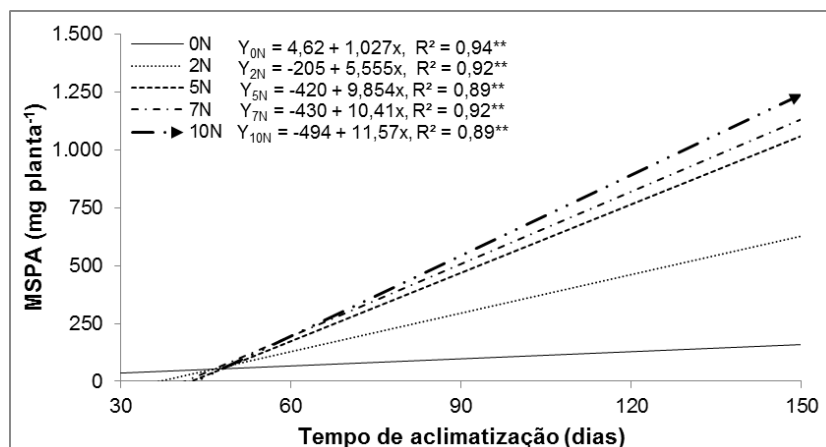


Figura 8. Massa seca da parte aérea (mg planta⁻¹) de abacaxizeiro em função do tempo de aclimatização (dias) em diferentes doses de adubação nitrogenada (g L⁻¹ de ureia).

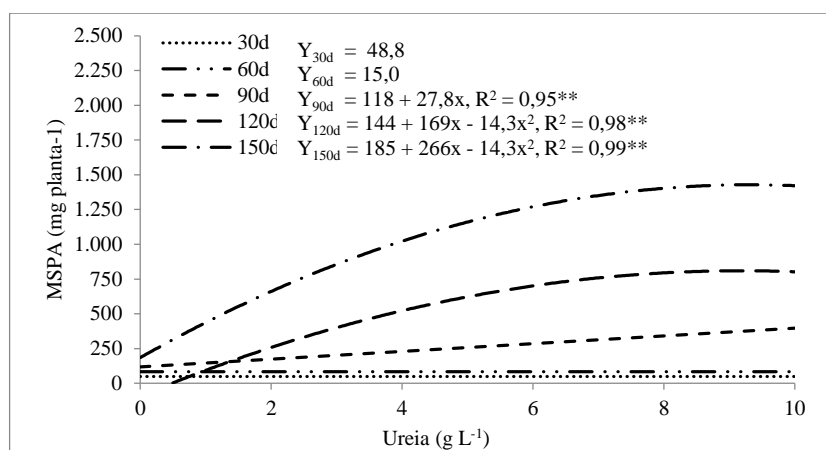


Figura 9. Massa seca da parte aérea (mg planta⁻¹) de abacaxizeiro em função de adubação nitrogenada (g L⁻¹ de ureia) em diferentes tempos de aclimatização (dias).

A massa seca de raiz do abacaxizeiro (Figuras 10 e 11), como em todas as variáveis analisadas, respondeu a adubação nitrogenada. O efeito da adubação nitrogenada sobre a massa seca de raiz foi observado apenas nos tempos 120 e 150 dias. Os maiores valores para massa seca de raiz foram estimados em 61,9 e 93,4 mg por planta, aos 120 e 150 dias de aclimatização, respectivamente, com doses de ureia estimadas em 6,1 e 7,4 g L⁻¹ nos respectivos tempos (Figura 11).

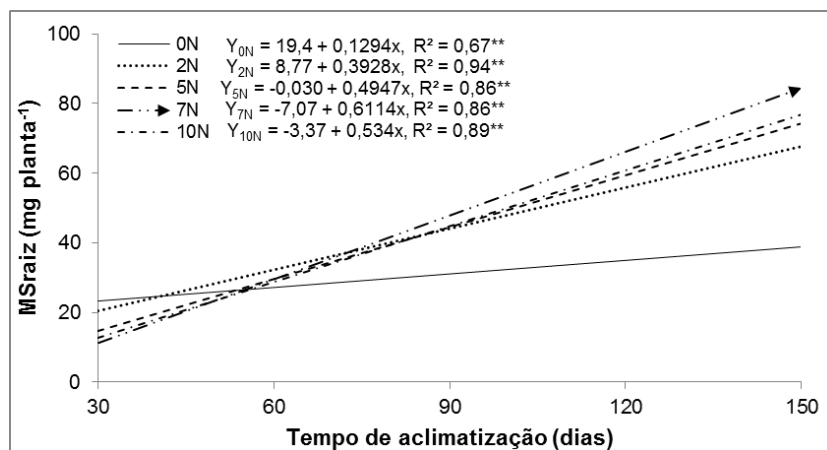


Figura 10. Massa seca de raiz (mg planta^{-1}) de abacaxizeiro em função do tempo de aclimatização (dias) em diferentes doses de adubação nitrogenada (g L^{-1} de ureia).

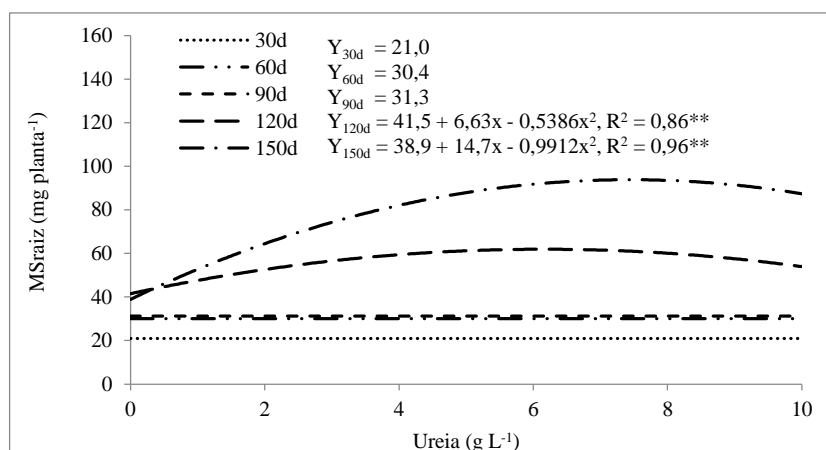


Figura 11. Massa seca de raiz (mg planta^{-1}) de abacaxizeiro em função de adubação nitrogenada (g L^{-1} de ureia) em diferentes tempos de aclimatização (dias).

Esses resultados contribuem para determinar a redução do tempo de aclimatização das mudas, visto que crescimento da parte aérea e do sistema radicular durante este período é lento (Moreira, 2006; Barboza et al., 2006), e ainda, as raízes das mudas micropropagadas são danificadas ao serem removidas dos frascos e das bandejas, antes e após o período de aclimatização.

Ao final do período de aclimatização, mudas de abacaxizeiro micropropagadas devem apresentar altura que varia entre 6 a 12 cm. Com base nesta informação, foi estimado por meio das equações de regressão obtidas para a variável altura de planta (Figura 2), o tempo, em dias, em que as mudas atingiriam estas alturas em função de cada dose de adubo nitrogenado (Tabela 4). Com base no tempo de aclimatização obtido, estimou-se, ainda, o número de folhas, a área

foliar, a massa seca da parte aérea e a massa seca de raiz que as mudas teriam quando atingissem as alturas supracitadas.

Verifica-se, na Tabela 4, que a aplicação da adubação nitrogenada, reduz o tempo para que a planta atinja a altura mínima (6 cm) no processo de aclimatização em até 57 dias quando se compara com plantas que não receberam a adubação nitrogenada no período de aclimatização até 150 dias de avaliação. No período avaliado, até 150 dias de aclimatização, as plantas não adubadas com N, não atingiram a altura máxima de planta de 12 cm e aquelas que receberam doses maiores de adubo nitrogenado atingiram esta altura em até 41 dias antes das plantas que receberam 2 g L⁻¹ de ureia.

Observa-se na Tabela 4 pouca variação no número de folhas por planta nas diferentes alturas estimadas. Variações maiores foram observadas quanto à massa seca da parte aérea e massa seca de raiz, o que porque se relacionavam mais diretamente com o tempo de crescimento das mudas.

Tabela 4. Estimativa de tempo de aclimatização(ETA), em dias, e do número de folhas (NF), da área foliar (AF), da matéria seca da parte aérea (MSPA) e da matéria seca da raiz (MSR) em mudas micropropagadas de abacaxizeiro em função das doses de ureia para que as mesmas atingissem a altura estimada de 6 e 12 cm

Ureia (g L ⁻¹)	ETA (dias)	NF	AF (cm ²)	MSPA (mg)	MSR (mg)
Altura de planta de 6 cm					
0	104	10	19	111	32,9
2	57	11	17	82	31,2
5	51	11	14	56	23,9
7	49	11	16	70	22,1
10	47	11	16	55	21,9
Altura de planta de 12 cm					
0	363	-	-	-	-
2	131	15	80	516	60,2
5	99	14	71	394	41,0
7	93	14	71	384	37,8
10	90	15	72	349	35,2

Berilli et al. (2011) avaliaram durante o período de aclimatação o desenvolvimento de mudas micropropagadas de abacaxizeiro 'Vitória' vindas da aclimatização com diferentes tamanhos. Esses autores observaram que os

diferentes dias de aclimatização influenciaram no crescimento das mudas em condições de aclimatização, podendo esse fator interferir na comercialização das mudas micropropagadas.

CONCLUSÕES

- A inoculação de bactérias promoveu incremento na massa seca da parte aérea e massa seca de raiz de mudas micropropagadas do abacaxizeiro 'Vitória';
- A aplicação de adubo nitrogenado reduziu o período de aclimatização de mudas micropropagadas do abacaxizeiro 'Vitória' em, aproximadamente, 60 dias;
- Estimou-se que as doses de ureia entre 7 e 9 g L⁻¹, aplicadas às mudas do abacaxizeiro 'Vitória durante' a aclimatização, promoveram maior crescimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baldotto, L.E.B., Baldotto, M.A., Olivares, F.L., Viana, A.P., Bressan-Smith, R. (2010) Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. *Revista de Brasileira de Ciência do Solo*. Viçosa-MG, 34(2):349-360.
- Barboza, S.B.S.C., Ribeiro, D.G., Teixeira, J.B., Portes, T.A., Souza, L.A.C. (2006) Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 41:185-194.
- Bashan, Y., Holguin, G. (1997) Azospirillum-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Canadian Journal Microbiology*, 43:103-121.
- Bastián, F., Cohen, A., Piccoli, P., Luna, V., Baraldi, R., Bottini, R. (1998) Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regulation*, 24: 7-11.

- Berilli, S.S., Carvalho, A.J.C. de, Freitas, S.J., Farias, D.C., Marinho, C.S. (2011) Avaliação do desenvolvimento de diferentes tamanhos de mudas micropropagadas de abacaxizeiro, após aclimação. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 33(1):208-214.
- Bregonci, I.S., Schmildt, E.R., Coelho, R.I., Reis, E.F., Brum, V.J., Santos, J.G. (2008) Adubação foliar com macro e micronutrientes no crescimento de mudas micropropagadas do abacaxi cv. Gold [*Ananas comosus* (L.) Merrill] em diferentes recipientes. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras-MG, 32(3):705-711.
- Catunda, P.E.A., Marinho, C.S., Gomes, M.M.A., Carvalho, A.J.C. de (2008) Brassinosteroide e substratos na aclimação do abacaxizeiro 'Imperial'. *Acta Scientiarum Agronomy*. Maringá, 30(3):345-352.
- Coelho, R.I., Carvalho, A.J.C. de, Marinho, C.S., Lopes, J.C., Pessanha, P.G.O. (2007) Resposta à adubação com ureia, cloreto de potássio e ácido bórico em mudas do abacaxizeiro 'Smooth Cayenne'. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 29(1):161-165.
- Döbereiner, J., Baldani, V.L.D., Baldani, J.I. (1995) Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: Embrapa-SPI /Embrapa-CNPAB, 60p.
- Freitas, S.J., Carvalho, A.J.C. de, Berilli, S. da S., Santos, P.C., Marinho, C.S. (2011) Substratos e Osmocote® na nutrição e desenvolvimento de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Vitória. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 33:672-679.
- Freitas, S.J., Santos, P.C., Carvalho, A.J.C. de, Berilli, S.S., Gomes, M.M.A. (2012) Brassinosteroide e adubação nitrogenada no crescimento e estado nutricional de mudas de abacaxizeiro provenientes do seccionamento de caule. *Revista Brasileira de Fruticultura*. Jaboticabal, 34(2):612-618.
- Matos, A.P. de., Reinhardt, D.H., Sanches, N.F., Souza, F.S., Teixeira, F.A., Elias Júnior, J., Gomes, D. C. (2009) *Produção de Mudas Sadias de Abacaxi*. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p.89.

- Moreira, M.A., Carvalho, J.G., Pasqual, M., Fráguas, Fráguas, C.B.; Silva, A.B. (2006) Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, 30(5):875-879.
- Ramos, M.J.M., Monnerat, P.H., Pinho, L.G. R., Silva, J.A. (2011) Deficiência de macronutrientes e de boro em abacaxizeiro 'Imperial': composição mineral. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 33(1):261-271.
- Ribeiro, D.G., Vasconcello, M.A.S., Araújo, A.P.(2011) Contribuição do sistema radicular de mudas micropropagadas na absorção de nitrogênio de abacaxizeiro cultivar Vitória. *Revista Brasileira Fruticultura*, Jaboticabal, 33(4):1240-1250.
- Santos, P.C. dos, Freitas, M.S.M., Freitas, S. de J., Silva, M.P.S. da, Berilli, S. da S. (2011) Fungos micorrízicos no crescimento e nutrição de rebentos oriundos de coroa de abacaxi. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 33(n. spe1): 658-665.
- Weber, O.B., Correia, D., Silveira, M.R.S., Crisóstomo, L.A., Oliveira, E.M.L.F., Sá, E.G. (2003) Efeito da bactéria diazotrófica em mudas micropropagadas de abacaxizeiros Cayenne Champac em diferentes substratos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 38(6): 689-696.
- Weber, O.B., Terao, D., Rocha, L.S., Correia, D., Santos, F.J.S. (2004) Efeito de bactérias diazotróficas na produção do abacaxizeiro 'Cayenne Champac', sob irrigação, em dois níveis de adubação nitrogenada. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 26:249-253.

3.2. COMPOSIÇÃO MINERAL DE MUDAS MICROPROPAGADAS DE ABACAXIZEIRO INOCULADAS COM BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E ADUBADAS COM NITROGÊNIO DURANTE ACLIMATIZAÇÃO

RESUMO

A nutrição mineral é um dos fatores principais para produção de mudas de abacaxizeiro e tem contribuído para o desenvolvimento da cultura no país. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da inoculação de bactérias diazotróficas e doses de nitrogênio sobre a composição mineral de mudas micropropagadas de abacaxizeiro 'Vitória' durante o período de aclimatização. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados (DBC), em esquema fatorial (2x5x4), sendo os fatores representados por dois tipos de inóculos (ausência e presença de uma mistura de bactérias diazotróficas contendo *Burkholderia* sp. UENF 114111, *Burkholderia silvatlantica* UENF 117111 e *Herbaspirillum seropedicae* HRC 54), cinco doses de ureia (0, 2, 5, 7 e 10 g L⁻¹) e quatro épocas de avaliação do tempo de aclimatização (60, 90, 120 e 150 dias após o plantio das mudas em bandejas), com quatro blocos. Conclui-se que mudas do abacaxizeiro 'Vitória' crescidas durante o período de aclimatização, inoculadas com bactérias diazotróficas, apresentaram maior conteúdo de N, K e de S do que aquelas não inoculadas. Os conteúdos dos nutrientes na massa seca da parte aérea não diferiram até os 60 dias de aclimatização. A elevação da adubação nitrogenada promoveu incremento no conteúdo de N na matéria seca da parte aérea e no índice de SPAD do abacaxizeiro. Com exceção para o N, Mn e Cu, o incremento na adubação nitrogenada provocou redução no conteúdo dos outros nutrientes em mudas mais

velhas na etapa de aclimatização. A extração de nutrientes por mudas micropropagadas do abacaxizeiro, na aclimatização, foi: K>N>Ca>Mg>S>P>>Fe>Mn>B>Zn>Cu>Mo>Ni.

Palavras-chave: *Ananas comosus*, nutrientes, produção de mudas

MINERAL COMPOSITION OF MICROPROPAGATED PINEAPPLE PLANTS DUE TO INOCULATION WITH DIAZOTROPHIC AND NITROGEN FERTILIZATION

ABSTRACT

The mineral nutrition of pineapple is a major factor for plant growth and has contributed to the development of culture in the country. The aim of this study was to evaluate the effect of inoculation of bacteria diazotrophic and nitrogen on the mineral composition of micropropagated pineapple plants 'Victory' during the acclimatization period. The experimental design was a randomized block design (RBD) in a factorial design (2x5x4), the factors being represented by two types of inocula (absence or presence of a mixture of diazotrophs containing *Burkholderia* sp. UENF 114111, 117111 UENF *Burkholderia silvatlantica* and *Herbaspirillum seropedicae* HRC 54), five levels of urea (0, 2, 5, 7 and 10 g L⁻¹) and four times of evaluation time of acclimatization (60, 90, 120 and 150 days after planting the seedlings in trays) with four blocks. We conclude that seedlings of pineapple 'Vitoria' grown during the acclimatization period, inoculated with diazotrophs showed higher contents of N, K and S than those not inoculated. The nutrient concentration did not differ in shoot dry mass, until 60 days of acclimatization. The increase in nitrogen fertilization increased the N content in dry matter of shoots and SPAD index of pineapple. Except for N, Mn and Cu, the increase in nitrogen fertilization caused a reduction in the content of other nutrients in older seedlings at the stage of acclimatization. Nutrient uptake by the pineapple plantlets in the acclimatization was: K> N> Ca> Mg> S> P >> Fe> Mn> B> Zn> Cu> Mo> Ni.

Keywords: *Ananas comosus*, nutrient, producing of seedlings

INTRODUÇÃO

A produção de mudas micropropagadas de abacaxizeiro desde o estabelecimento do explante até a obtenção da muda pronta para ser transplantada no campo tem duração média de 13 a 18 meses (Teixeira et al., 2001). Esse tempo inclui o período das mudas em casa de vegetação após a retirada das plantas das condições *in vitro* para adaptação ao ambiente externo (Read e Fellman, 1985). A aclimatização é um período crítico às mudas e demanda tempo e manejo adequado.

Vários estudos têm sido desenvolvidos para melhorar a aclimatização e aclimatação de plantas micropropagadas de abacaxizeiro, incluindo técnicas com uso de diferentes substratos (Moreira et al., 2006), inoculação de fungos micorrízicos (Soares et al., 2009), reguladores de crescimento (Baldotto et al., 2009; Catunda et al., 2008), diferentes lâminas de irrigação (Azevedo et al., 2008), inoculação com bactérias diazotróficas (Weber et al., 2003) e adubos de liberação lenta (Freitas et al., 2011). Essas técnicas têm estimulado o crescimento vegetativo.

Em plantas micropropagadas de abacaxizeiro, a nutrição inicia-se desde o crescimento *in vitro* com uso de meio de cultivo rico em nutrientes. Na aclimatização, uma nutrição adequada que possa suprir as necessidades das mudas também é de fundamental importância (Teixeira et al., 2001). A nutrição das plantas influencia diretamente no rendimento das culturas. No abacaxizeiro, quantidades insuficientes ou ausência de um elemento químico na nutrição diminui o crescimento e a produção da planta (Ramos et al., 2011).

A cultura do abacaxizeiro requer para o desenvolvimento e crescimento das plantas quantidades diferenciadas de macronutrientes que são requeridos na seguinte ordem decrescente: potássio (K), nitrogênio (N), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S) e fósforo (P). Para os micronutrientes são: cloro (Cl), manganês (Mn), ferro (Fe), zinco (Zn), boro (B), cobre (Cu) e molibdênio (Mo). O elemento de maior importância para o crescimento do abacaxizeiro é o N sendo, depois do K, o elemento mais extraído pela cultura (Aquino et al., 1986; Malavolta et al., 1997; Paula et al., 1998; Souza, 1999; Gonçalves e Carvalho, 2000; Ramos et al., 2011).

A nutrição do abacaxizeiro no período de aclimatização é necessária, pois as plantas têm um maior índice de mortalidade neste período, porém estudos voltados para a nutrição das plantas neste estágio de desenvolvimento são

escassos, focalizando-se quase exclusivamente ao uso de substratos que possam aumentar o índice de sobrevivência e contribuir com a nutrição da planta.

Bactérias diazotróficas promovem a fixação de N e têm diminuído o uso de adubos nitrogenados em diversas culturas, principalmente em plantas leguminosas. Essas bactérias promotoras de crescimento vegetal têm demonstrado efeito positivo em abacaxizeiro (Tapia-Hernández et al., 2000; Weber et al., 2003; Soares et al., 2009; Baldotto et al., 2010; Baldotto et al., 2011) e em mudas micropropagadas têm garantido melhores condições ao ambiente *ex vitro*, melhorando a nutrição das mudas (Baldotto et al., 2010).

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da inoculação de bactérias diazotróficas e de doses de nitrogênio sobre o conteúdo de nutrientes em mudas micropropagadas de abacaxizeiro 'Vitória' durante o período de aclimatização.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no *campus* da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (Latitude = 21°19'23", Longitude = 41°10'40" e Altitude = 14 m) no período de agosto de 2012 a janeiro de 2013.

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados (DBC), em esquema fatorial (2x5x4), sendo representado por dois tipos de inóculos: o primeiro constituído por uma mistura de bactérias diazotróficas contendo *Burkholderia* sp. UENF 114111, *Burkholderia silvatlantica* UENF 117111 e *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC 54 e o outro, sem bactérias; cinco doses de ureia (0, 2, 5, 7 e 10 gL⁻¹) e quatro épocas de avaliação do tempo de aclimatização (60, 90, 120 e 150 dias após o transplante das mudas em bandejas), com quatro blocos. A unidade experimental foi composta de quatro células de bandeja de isopor com uma planta cada, destinadas para determinação dos teores de nutrientes e, por conseguinte, o conteúdo de nutrientes por planta.

As estirpes foram adquiridas no laboratório de biologia celular e tecidual da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e fazem parte da coleção de bactérias. As do gênero *Burkholderia* são isoladas de plantas

abacaxizeiro cv Smooth Cayenne (Santos, 2008) e *Herbaspirillum seropedicae* HRC 54 isoladas de plantas de cana-de-açúcar (Olivares, 1997).

As mudas de abacaxizeiro 'Vitória' provenientes de propagação *in vitro* foram procedentes do Laboratório de cultura de tecidos Biomudas, localizado em Venda Nova do Imigrante-ES. As mudas enraizadas estavam acondicionadas em potes de vidro tipo *baby food*, mantidas em meio MS (Murashige e Skoog, 1962). Por ocasião da implantação do experimento as mudas foram lavadas para retirada do meio e selecionadas com peso médio de 0,30 g de matéria fresca.

Para a obtenção de cada pré-inóculo, 20 uL do estoque bacteriano foi diluído em meio de cultivo líquido DYG'S (pré-inóculos) (Döbereiner et al., 1995) e mantidos sob agitação orbital de 140 rpm a 30°C por 24 horas. Após esse tempo, cada inóculo foi preparado utilizando alíquota de 100 uL do pré-inóculo em 100 mL de meio líquido DYG's, permanecendo sob agitação orbital de 140 rpm a 30°C, o que correspondeu a um volume final de 100 mL de cada inóculo.

Na produção da mistura bacteriana, os inóculos foram dissolvidos em 5700 mL de água destilada. A inoculação ocorreu no momento do transplântio, realizada pela imersão das plantas de abacaxizeiro à mistura bacteriana por 30 minutos e o controle imerso em água destilada. Em seguida as plantas foram transferidas para bandejas de isopor de 200 células preenchidas com substrato Vivatto Slim Plus® (Tabela 1). Após 15 dias o substrato foi inoculado e cada célula da bandeja recebeu 2 mL da mistura bacteriana.

Tabela 1. Características químicas da amostra do substrato Vivatto Slim Plus® composto por moinha de carvão vegetal, casca de pinus bio estabilizada, vermiculita, água e espuma fenólica

pH	K	Ca	Mg	Al	Na	SB	V	P	S	Fe	Cu	Zn	Mn	B
5,9	mmol _c dm ⁻³						(%)			mg dm ⁻³				
	29,7	96	58	0	13,2	196,9	85	400	1090	155,9	1,71	32,5	84,2	4,18
Matéria orgânica = 131 g dm ⁻³														

A análise foi realizada pelo Laboratório de Análise de Solos da FUNDENOR, Campos dos Goytacazes, RJ.

Aos 15 dias após o transplântio, semanalmente, cada unidade experimental recebia, via adubação foliar, aproximadamente 2 mL planta⁻¹ da solução nutritiva completa proposta por Ramos et al. (2011). A partir da terceira semana a solução aplicada foi sem N, por ocasião dos tratamentos (Tabela 2). A solução era preparada com pH 5,5 ou 5,6. Aos 121 dias, em plantas do tratamento controle, foi

aplicada solução completa, a fim de evitar perda das mudas pela deficiência do N. Todas as adubações foram feitas a partir das 17:00 horas, usando uma cabine confeccionada com isopor para proteção, para evitar a deriva e a contaminação entre mudas de tratamentos diferentes.

Tabela 2. Composição química da solução nutritiva completa e com omissão de nitrogênio (mL L⁻¹)

Soluções estoques	Completa	(-N)
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O 2mol L ⁻¹	1	
KNO ₃ 2mol L ⁻¹	2	
MgSO ₄ 7H ₂ O 1mol L ⁻¹	1	1
(NH ₄)H ₂ PO ₄ 1mol L ⁻¹	0,25	
H ₃ BO ₃	1	1
Fe-EDTA	1	1
Micro -B -Fe	1	1
CaCl ₂ 2mol L ⁻¹		1
KCL 1mol L ⁻¹		3,75
KH ₂ PO ₄ 1mol L ⁻¹		0,25
NH ₄ Cl 1mol L ⁻¹		0,25

Para o preparo de 1L de solução de micronutrientes (-B e -Fe), foram utilizados os seguintes reagentes analíticos: KCl = 3,7467 g; MnSO₄·2H₂O = 0,8451 g; ZnSO₄·7H₂O = 0,5780 g; CuSO₄·5H₂O = 0,1267 g; (NH₄)₆ Mo7.O₂₄.4H₂O = 0,088 g.

Para adubação nitrogenada, inicialmente as doses de ureia foram parceladas, a fim de evitar a queima das folhas. Conforme os tratamentos a unidade experimental recebeu a seguinte concentração: aos 25 dias - 20% da dose; aos 50 dias - 50% da dose e a partir dos 75 dias, semanalmente, foi aplicada a dose completa. Cada planta recebia ± 1 mL via adubação foliar, aplicada com auxílio de um pulverizador manual.

Após o transplante com auxílio de um pulverizador costal as mudas foram pulverizadas com água a fim de evitar a desidratação das folhas, nos primeiros 30 dias em um intervalo de duas horas. A partir deste período, as pulverizações foram realizadas conforme a necessidade da planta, sendo realizadas duas pulverizações ao dia e uma irrigação no final da tarde de forma a manter a capacidade de campo.

Os dados de temperatura média diária (°C) e umidade relativa média diária (%) registrados na casa de vegetação durante a condução do experimento foram monitorados por um medidor marca KILOG (KIMO Constructeur), programado para realizar leituras a intervalos de duas horas, e estão apresentados na Figura 1.

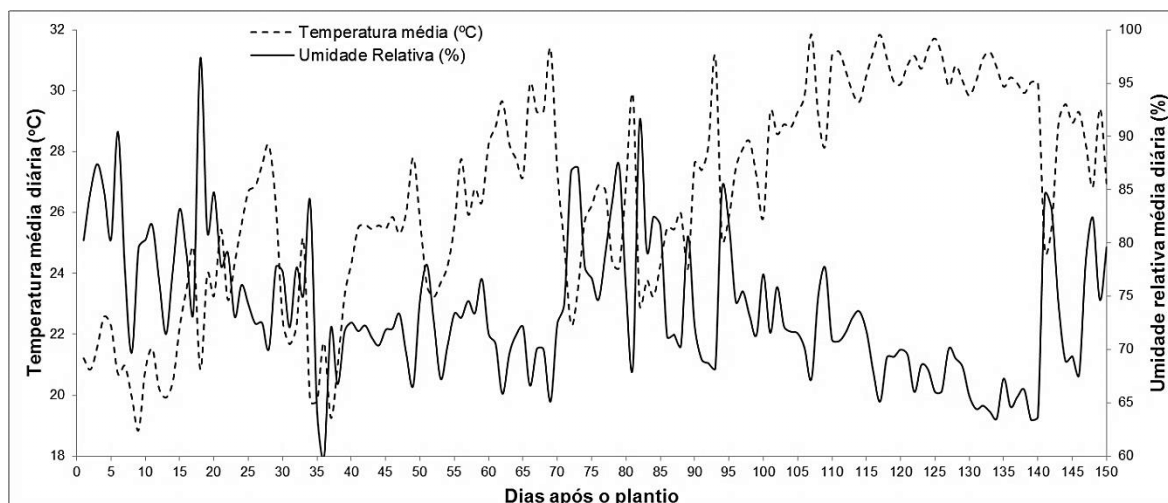


Figura 1. Temperatura média diária (°C) e umidade relativa média diária (%) registradas em casa de vegetação no período de condução do experimento (agosto/2012 a janeiro/2013).

A análise nutricional das plantas foi realizada no Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas, vinculado a UENF/CCTA/LFIT. Para análise as folhas foram secas a 70°C em estufa de ventilação forçada até atingir o peso constante, posteriormente moídas em moinho de facas tipo Wiley e foram armazenadas em frascos hermeticamente fechados.

O material moído foi pesado e foram determinados os teores dos nutrientes nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), boro (B), ferro (Fe), Zinco (Zn), manganês (Mn), cobre (Cu) e molibdênio (Mo). Para a determinação dos teores de N, o material vegetal foi submetido à digestão sulfúrica e o nutriente determinado pelo método de Nessler (Jackson, 1965). Outra amostra foi pesada e os teores de P, K, Ca, Mg, S, B, Fe, Zn, Mn e Cu foram determinados usando o plasma (ICPE-9000) da marca Shimadzu®, após digestão com HNO₃ e H₂O₂, em sistema de digestão aberta (Peters, 2005).

Os teores dos nutrientes minerais foram determinados aos 60, 90, 120 e 150 dias de aclimatização das mudas. Com base nos teores de nutrientes e na matéria seca da parte aérea obtidos por unidade experimental determinou-se o conteúdo de cada nutriente por planta, com macronutrientes expressos em mg planta⁻¹ e micronutrientes em µg planta⁻¹.

A leitura do índice SPAD (determinação indireta do teor de clorofila) foi realizada na folha D de todas as plantas aos 150 dias, utilizando o medidor portátil de clorofila modelo SPAD-502.

Os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o programa SANEST. Para os dados quantitativos utilizou-se a análise de regressão polinomial, com teste F da análise da variância da regressão e coeficiente do modelo estatisticamente significativo e maior R². Para os dados qualitativos foi utilizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi verificado efeito do fator bactérias diazotróficas no incremento do conteúdo dos macronutrientes N e S em mudas micropropagadas de abacaxizeiro 'Vitória' (Tabela 3). Os conteúdos de N, K e S foram maiores em mudas inoculadas com a mistura de bactérias diazotróficas contendo *Burkholderia* sp. UENF 114111, *Burkholderia silvatlantica* UENF 11711 e *Herbaspirillum seropedicae* HRC 54.

Baldotto et al. (2010), testando bactérias do gênero *Burkholderia*, observaram o aumento do conteúdo N, P e K em mudas micropropagadas de abacaxizeiro cultivar 'Vitória' durante a aclimatização.

Tabela 3. Conteúdo de macronutrientes, em mg planta⁻¹, em mudas do abacaxizeiro 'Vitória' em função do fator bactérias diazotróficas

Macronutrientes (mg planta ⁻¹)	Com Bactéria	Sem Bactéria	Média	C.V (%)
N	8,94 a	8,18 b	8,56	26,3
P	1,03 a	0,96 a	1,00	25,0
K	12,20 a	11,40 b	11,79	21,8
Ca	4,34 a	4,18 a	4,26	25,8
Mg	2,86 a	2,82 a	2,84	27,4
S	1,21 a	1,12 b	1,16	27,8

Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, em 5% de probabilidade.

Machado et al. (1998), testando o efeito de bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada no comportamento das enzimas de glutamina sintetase e nitrato redutase em plantas de milho, verificaram o incremento no conteúdo de N e no peso de grãos quando as plantas foram inoculadas com bactérias. Esses autores levantaram a hipótese que as bactérias possam ter influenciado na atividade das enzimas que possibilitaram maior incorporação de amônio e maior transporte de N na parte aérea.

Para os micronutrientes em função do fator bactérias, não foi verificada diferença nos conteúdos (Tabela 4). Na literatura, a avaliação de micronutrientes em função de bactérias ainda é pouco estudada e necessita de maiores esclarecimentos sobre o efeito desses microrganismos nesta espécie. Verifica-se, na Tabela 4, que o conteúdo do Fe é muito maior, por planta, do que os outros micronutrientes. Os conteúdos do Cu, Mo e Ni são menores dentre todos os nutrientes quantificados em mudas do abacaxizeiro até 150 dias de aclimatização. A necessidade de estudos voltados para a nutrição de abacaxizeiro micropropagada em fase de aclimatização tem se tornado uma necessidade, em vista de que a quantificação de nutrientes pode reduzir os gastos, melhorar a absorção de nutrientes e qualidade das mudas.

Tabela 4. Conteúdo de micronutrientes, em $\mu\text{g planta}^{-1}$, em mudas do abacaxizeiro 'Vitória' em função da inoculação com bactérias diazotróficas

Micronutrientes ($\mu\text{g planta}^{-1}$)	Com Bactéria	Sem Bactéria	Média	C.V (%)
Fe	82,55 a	77,71 a	80,13	40,90
Mn	36,36 a	33,18 a	34,76	45,47
Zn	11,32 a	10,94 a	11,13	27,65
Cu	1,43 a	1,53 a	1,48	48,87
B	21,69 a	21,64 a	21,66	29,80
Mo	1,15 a	1,22 a	1,19	44,77
Ni	0,51 a	0,52 a	0,51	79,45

Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, em 5% de probabilidade.

Verificou-se, para todos os nutrientes avaliados, a interação significativa entre tempos de aclimatização e doses de ureia (Figuras 2 e 3 e Tabelas 5 e 6). Quanto ao tempo de aclimatização, com exceção do N, quando não se aplicou adubação nitrogenada (Figura 2), os conteúdos dos outros macronutrientes aumentaram em função da idade da planta e independente da adubação nitrogenada. Comportamento semelhante ao do conteúdo de N foi verificado para os micronutrientes Zn, Ni, Cu, Mn, Fe e Mo.

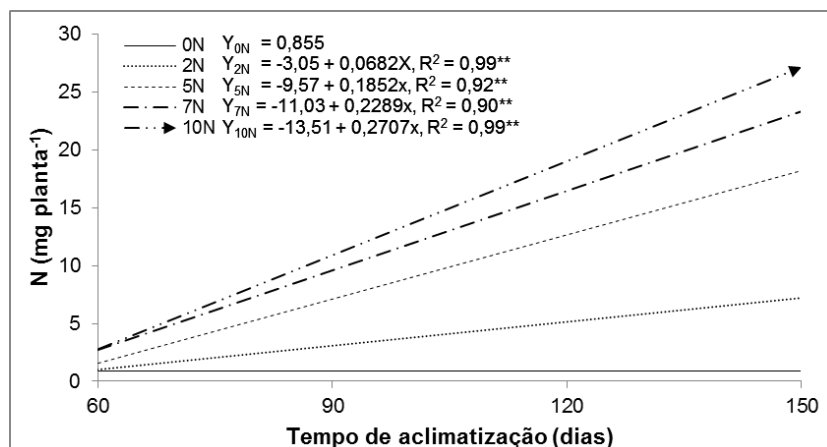


Figura 2. Conteúdo de N (mg planta⁻¹) em mudas de abacaxizeiro em função do tempo de aclimatização (dias) em diferentes doses de adubação nitrogenada (g L⁻¹ de ureia).

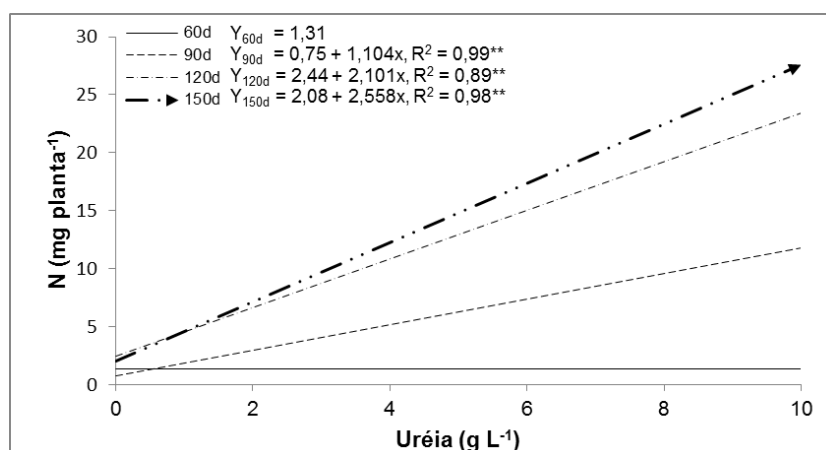


Figura 3. Conteúdo de N (mg planta⁻¹) em mudas de abacaxizeiro em função de adubação nitrogenada (g L⁻¹ de ureia) em diferentes tempos de aclimatização (dias).

A aplicação de N promoveu aumento no conteúdo de nutrientes na massa da parte aérea de mudas do abacaxizeiro a partir dos 60 dias de aclimatização (Tabelas 5 e 6). Diferente do que aconteceu com o conteúdo de N (Figura 3), que aumentou linearmente com a aplicação de adubo nitrogenado. Para os outros macronutrientes, verificou-se redução no conteúdo com o aumento da dose de adubo nitrogenado, nos últimos períodos de aclimatização (Tabela 5). Freitas et al. (2012) verificaram que o aumento da adubação nitrogenada não influenciou os teores de N em mudas provenientes de seccionamento do caule. Entretanto, estes autores não determinaram o conteúdo de N nas plantas.

A elevação das doses de N reduziram os conteúdos de P, K, Ca, Mg e S com o aumento na idade das mudas (Tabela 5). Para alguns autores (Spironello et al., 2004; Freitas et al., 2012; Coelho et al., 2010) o crescimento das mudas pode se elevar com o maior fornecimento de adubo nitrogenado e isso pode provocar o efeito de diluição de alguns nutrientes com conseqüente redução do conteúdo na planta.

Tabela 5. Regressão polinomial para conteúdo de macronutrientes (mg planta⁻¹) na matéria seca da parte aérea de mudas do abacaxizeiro 'Vitória' em função de doses de ureia em diferentes épocas de avaliação

Macronutrientes (mg planta ⁻¹)	Tempo de aclimatização (dias)	Regressão polinomial para doses de nitrogênio	R ²
P	60	Y = 0,26	-
	90	Y = 0,36 + 0,0679x	0,89**
	120	Y = 0,38 + 0,3193x - 0,0204x ²	0,99**
	150	Y = 0,58 + 0,4287x - 0,0216x ²	0,96**
K	60	Y = 4,06	-
	90	Y = 5,28 + 2,031x - 0,1234x ²	0,97**
	120	Y = 8,22 + 2,760x - 0,1895x ²	0,95**
	150	Y = 11,1 + 2,526x - 0,1523x ²	0,91**
Ca	60	Y = 0,56	-
	90	Y = 0,79 + 0,2905x	0,98**
	120	Y = 0,80 + 1,7712x - 0,1149x ²	0,99**
	150	Y = 1,58 + 2,8521x - 0,1747x ²	0,98**
Mg	60	Y = 0,33	-
	90	Y = 0,53 + 0,1684x	0,97**
	120	Y = 0,48 + 1,0276x - 0,0874x ²	0,99**
	150	Y = 0,92 + 2,2670x - 0,1568x ²	0,98**
S	60	Y = 0,27	-
	90	Y = 0,36 + 0,0782x	0,94**
	120	Y = 0,42 + 0,4163x - 0,0268x ²	0,99**
	150	Y = 0,60 + 0,5620x - 0,0319x ²	0,99**

** e * = significativo ao nível de 1% e 5% de probabilidade pelo teste F.

Silva et al. (2012), testando a aplicação de doses crescentes de N em plantas de abacaxizeiro 'Vitória' em solos de tabuleiros costeiros do estado da Paraíba, verificaram que a elevação das doses de N diminuiu os teores de P e K na porção clorofilada aos 300 dias após o plantio. Spironello et al. (2004) também obtiveram esse efeito no aumento dos teores de Ca em doses crescentes de N em abacaxieiro 'Smooth Cayenne'. Coelho et al. (2010) verificaram, após nove meses de enviveiramento de mudas de abacaxizeiro obtidas por seccionamento de caule

e que receberam adubação foliar com ureia, redução nos teores de S na matéria seca da parte aérea.

Para os micronutrientes Fe, Zn, B e Mo os conteúdos não diferiram até os 60 dias e para o Mn e o Ni até os 90 dias (Tabela 6).

Tabela 6. Regressão polinomial para conteúdo de micronutrientes, em $\mu\text{g planta}^{-1}$, na matéria seca da parte aérea de mudas do abacaxizeiro 'Vitória' em função de adubação nitrogenada e de tempos de aclimatização

Micronutrientes ($\mu\text{g planta}^{-1}$)	Tempo de aclimatização(dias)	Regressão polinomial para doses de nitrogênio	R ²
Fe	60	$Y = 20,2$	-
	90	$Y = 17,7 + 3,88x$	0,91**
	120	$Y = 10,4 + 28,4x - 1,811x^2$	0,99**
	150	$Y = 36,7 + 63,9x - 4,546x^2$	0,96**
Mn	60	$Y = 3,55$	-
	90	$Y = 11,32$	-
	120	$Y = 6,95 + 6,386x$	0,96**
	150	$Y = 7,38 + 16,576x$	0,98**
Zn	60	$Y = 2,531$	-
	90	$Y = 3,038 + 0,5804x$	0,96**
	120	$Y = 2,785 + 3,3490x - 0,2333x^2$	0,99**
	150	$Y = 4,478 + 6,6188x - 0,3391x^2$	0,98**
Cu	60	$Y = 0,341$	-
	90	$Y = 0,524 + 0,0771x$	0,90*
	120	$Y = 0,626 + 0,2087x$	0,96**
	150	$Y = 1,148 + 0,3972x$	0,92**
B	60	$Y = 4,82$	-
	90	$Y = 7,43 + 1,017x$	0,86**
	120	$Y = 6,95 + 8,589x - 0,621x^2$	0,99**
	150	$Y = 12,5 + 12,26x - 0,784x^2$	0,97**
Mo	60	$Y = 0,330$	-
	90	$Y = 0,545 + 0,0837x$	0,82**
	120	$Y = 0,480 + 0,4738x - 0,0382x^2$	0,97**
	150	$Y = 0,655 + 0,4780x - 0,0246x^2$	0,96**
Ni	60	$Y = 0,286$	-
	90	$Y = 0,322$	-
	120	$Y = 0,129 + 0,0873x$	0,98**
	150	$Y = 0,244 + 0,2972x - 0,0219x^2$	0,93**

** e * = significativo ao nível de 1% e 5% de probabilidade pelo teste F.

Diferentemente do que aconteceu com o conteúdo de N (Figura 3), do Mn e do Cu (Tabela 6), que aumentaram linearmente com a aplicação de adubo nitrogenado. Para os outros micronutrientes verificou-se redução no conteúdo com o aumento da dose de adubo nitrogenado, aos 150 dias de aclimatização (Tabela 6).

Resultados obtidos por Freitas et al. (2012) e Coelho et al. (2010) não mostraram efeito nos teores de micronutrientes em mudas de abacaxizeiro, quando aplicadas doses crescentes de ureia em mudas provenientes do seccionamento. Aumento no teor de boro em plantas sem adubação nitrogenada foi comprovado em planta do abacaxizeiro 'Imperial' quando submetida à deficiência de N (Ramos et al., 2011).

Feitosa et al. (2011), avaliaram a produção de massa seca da parte aérea e a extração dos micronutrientes Fe, Zn, Mn e B em plantas de abacaxizeiro 'Vitória', em resposta a aplicação de doses de micronutrientes. Eles verificaram que em doses maiores de micronutrientes as plantas apresentaram maior crescimento e a extração foi influenciada pela idade fisiológica da planta.

Ramos et al. (2009) estudaram os sintomas de deficiência de macronutrientes e boro em mudas micropropagadas de abacaxizeiro 'Imperial' e detectaram que os sintomas de deficiência de boro, eram observados somente aos 9 meses após o plantio das mudas. Os teores de boro encontrados neste período por esses autores foram de 5,8 mg kg⁻¹. Contudo, não foram encontrados na literatura conteúdo dos nutrientes em mudas no período de aclimatização.

O índice de SPAD determinado em mudas com 150 dias de aclimatização, não foi influenciado pela inoculação bacteriana. Os valores do índice de SPAD aumentaram linearmente ($Y = 22,6 + 2,3x$, $R^2 = 0,92^{**}$) com o aumento da adubação nitrogenada aos 150 dias após o transplante. Tais resultados têm comportamento semelhante ao conteúdo de N na massa seca da parte aérea do abacaxizeiro (Figura 3) e indicam que as folhas do abacaxizeiro estavam com coloração verde mais intensa à medida que a dose da adubação nitrogenada foi se elevando, indicando maior teor de clorofila na folha.

O SPAD em mudas de abacaxizeiro já foi avaliado em outros estudos e tem demonstrado eficiência na avaliação do estado nutricional em plantas. Como o verificado por Ramos et al. (2013) em abacaxizeiro 'Imperial' cultivados na deficiência de macronutrientes e boro. Eles verificaram que os valores de SPAD estavam proporcionais à concentração foliar de N e P em decorrência da presença ou da deficiência desses elementos (Ramos et al., 2013).

Leonardo et al. (2013), avaliaram em plantas de abacaxizeiro 'Vitória' teor de clorofila e o índice de SPAD em resposta à adubação nitrogenada com duas fontes de N, ureia e cama de frango. Eles constataram que o índice de SPAD possui

correlação direta com o teor de clorofila e com o teor de N nas folhas, sendo que as duas formas de adubação elevaram o índice de SPAD na folha D.

O abacaxizeiro em seus diferentes estádios de crescimento demanda diferentes concentrações de N, portanto, a adubação adequada de N é essencial para manter o crescimento vegetativo e a produção, sendo esse nutriente considerado um fator limitante para o crescimento de bromélias (Malézieux e Bartholomew, 2003; Kanashiro, 2005; Rodrigues et al., 2010).

CONCLUSÕES

- Mudanças de abacaxizeiro 'Vitória', crescidas durante o período de aclimatização com inoculação com bactérias diazotróficas, apresentaram maior conteúdo de N, K e de S do que aquelas não inoculadas;
- Os conteúdos dos nutrientes não diferiram, na massa seca da parte aérea, até os 60 dias de aclimatização;
- A elevação da adubação nitrogenada promoveu incremento no conteúdo de N na matéria seca da parte aérea e no índice de SPAD do abacaxizeiro;
- Com exceção para o N, Mn e Cu, o incremento na adubação nitrogenada provocou redução no conteúdo dos outros nutrientes em mudas mais velhas na etapa de aclimatização;
- A extração de nutrientes por mudas micropropagadas do abacaxizeiro, na aclimatização, foi: K>N>Ca>Mg>S>P>Fe>Mn>B>Zn>Cu>Mo>Ni.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aquino, A.R.L., Vieira, A., Azevedo, J.A., Genú, P.J.C., Kliemann, H.J. (1986) *Nutrição mineral e adubação do abacaxizeiro*. In: HAAG, P.H. Nutrição mineral e adubação de frutíferas tropicais. Campinas: Fundação Cargill, p.31-58.
- Azevedo, B.M., Bomfim, G.V., Portugal, A.C., Carvalho, P.C., Gondim, R.S., Viana, T.V.S. (2008) Aclimatização *ex vitro* de abacaxizeiro ornamental com diferentes lâminas de irrigação. *Irriga*, Botucatu, 13:298-309.
- Baldotto, L.E.B., Baldotto, M.A., Giro, V.B., Canellas, L.P., Olivares, F.L., Bressan-Smith, R. (2009) Desempenho do abacaxizeiro 'Vitória' em resposta à aplicação

de ácidos húmicos durante a aclimação. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa-MG, 33:979-990.

Baldotto, L.E.B., Baldotto, M.A., Olivares, F.L., Viana, A.P., Bressan-Smith, R. (2010) Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. *Revista de Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa-MG, 34(2):349-360.

Baldotto, L.E.B., Olivares, F.L., Bressan-Smith, R (2011) Structural interaction between GFP-labeled diazotrophic endophytic bacterium *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 and pineapple plantlets 'Vitória'. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42:114-125.

Catunda, P.E.A., Marinho, C.S., Gomes, M.M.A., Carvalho, A.J.C. de (2008) Brassinosteróide e substratos na aclimação do abacaxizeiro 'Imperial'. *Acta Sci. Agron.*, 30:345-352.

Coelho, R.I., Carvalho, A.J.C. de, Thiebaut, J.T.L. (2010) Teores foliares de nutrientes em mudas do abacaxizeiro 'Smooth Cayenne' em resposta à adubação. *Revista de Ciências Agrárias*, Lisboa, 33(2):173-179.

Epstein, E. (1975) *Nutrição mineral das plantas: Princípios e perspectivas*. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos, 341p.

Feitosa, H. de O., Amorim, A.V., Lacerda, C.F., Silva, F.B. da. (2011) Crescimento e extração de micronutrientes em abacaxizeiro 'Vitória'. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 33(n. spe1):706-712.

Freitas, S.J., Santos, P.C., Carvalho, A.J.C. de, Berilli, S.S., Gomes, M.M.A. (2012) Brassinosteróide e adubação nitrogenada no crescimento e estado nutricional de mudas de abacaxizeiro provenientes do seccionamento de caule. *Revista Brasileira de Fruticultura*. Jaboticabal, 34(2):612-618.

Freitas, S.J., Carvalho, A.J.C. de, Berilli, S.S., Santos, P.C., Marinho, C.S. (2011) Substratos e osmocote® na nutrição e desenvolvimento de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Vitória. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 33(n. spe1):672-679.

- Kanashiro, S. (2005). *Nitrogênio, Fósforo, Potássio, Cálcio e o crescimento de plântulas de Aechmea blanchetiana* (BAKER) L. B. Smith *in vitro*. (Tese de Doutorado) – Piracicaba- SP, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”- ESALQ, 215p.
- Leonardo, F.A.P., Pereira, W.E., Silva, S.M., Costa, J.P. Teor de clorofila e índice SPAD no abacaxizeiro cv. Vitória em função da adubação nitrogenada. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 35(2): 377-383.
- Machado, A.T., Sodek, L., Döbereiner, J., Reis, V.M. (1998) Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com bactérias diazotróficas no comportamento bioquímico da cultivar de milho Nitroflint. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 33(6): 961-970.
- Malavolta, E., Vitti, G.C., Oliveira, S.A. (1997) *Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações*. Potafos, Piracicaba, 319 p.
- Malézieux, E., Bartholomew, D.P. (2003) Plant nutrition. In: Bartholomew, D.P., Paul, R.E., Rohrbach, K.G. *The pineapple: botany, production and uses*. Honolulu, cab, 143-165p.
- Moreira, M.A., Carvalho, J.G., Pasqual, M., Fráguas, Fráguas, C.B.; Silva, A.B. (2006) Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, MG, 30(5):875-879.
- Murashige, J.R., Skoog, F.A. (1962) Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, 15:473-497.
- Peters, J.B. (2005). Wisconsin Procedures for Soil Testing, Plant Analysis and Feed & Forage Analysis: Plant Analysis. Department of Soil Science, College of Agriculture and Life Sciences, University of Wisconsin-Extension, Madison, WI. http://uwlabs.soils.wisc.edu/files/procedures/plant_icp.pdf acesso em 10 de março de 2012.
- Ramos, M.J.M., Monnerat, H.P., Carvalho, A.J.C. de, Pinto, J.L.A., Silva, J.A. (2009) Sintomas visuais de deficiência de macronutrientes e de boro em abacaxizeiro ‘imperial’. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 3(1):252-256.

- Ramos, M.J.M., Monnerat, P.H., Pinho, L.G.R. (2013) Leitura SPAD em abacaxizeiro imperial cultivado em deficiência de macronutrientes e de boro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 35(1):277–281.
- Ramos, M.J.M., Monnerat, P.H., Pinho, L.G.R., Silva, J.A. (2011) Deficiência de macronutrientes e de boro em abacaxizeiro 'Imperial': composição mineral. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 33(1):261-271.
- Read, P.E., Fellman, C.D. (1985) Accelerating acclimation of in vitro propagated woody ornamentals. *Acta Horticulturae, Wageningen*, 166:15-20.
- Rodrigues, A.A., Mendonça, R.M.N., Silva, A.P., Silva, S.M., Pereira, W.E. (2010) desenvolvimento vegetativo de abacaxizeiros 'pérola' e 'smooth cayenne' no estado da Paraíba. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 32:126-134.
- Silva, A.L.P., Silva, A.P., Souza, A.P., Santos D., Silva, S.M., Silva, V.B (2012). Resposta do abacaxizeiro 'Vitória' a doses de nitrogênio em solos de tabuleiros costeiros da Paraíba. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*, Viçosa – MG, 36(2):447-456
- Soares, S.A.G., Mariano, R.LR., Cavalcante, U.M.T., Maia, L.C. (2009) Efeito de bactérias na germinação de fungos micorrízicos arbusculares e coinoculação em mudas de abacaxizeiro. *Revista Caatinga*, Mossoró, 22(2): 31-38.
- Spironello, A., Quaggio, J.A., Teixeira, L.A.J., Furlani, P.R., Sigrist, J.M.M. (2004) Pineapple yield and fruit quality effected by NPK fertilization in a tropical soil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 26(1):155-159.
- Tapia-Hernández, A., Bustillos-Cristales, M.R., Jiménez-Salgado, T.; Caballero-Mellado, J., Fuentes-Ramírez, L.E. (2000) Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. *Microbial. Ecol.*, Puebla, 39:49-55.
- Teixeira, J.B., Cruz, A.R.R., Ferreira, F.R., Cabral, J.R. (2001) Biotecnologia aplicada à produção de mudas: produção de mudas micropropagadas de abacaxi. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, 3:42-47.

Weber, O.B., Correia, D., Silveira, M.R.S., Crisóstomo, L.A., Oliveira, E.M., Sá, E. G. (2003) Efeito da bactéria diazotrófica em mudas micropropagadas de abacaxizeiros Cayenne Champac em diferentes substratos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 38(6): 689-696.

3.3. BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS E ADUBAÇÃO NITROGENADA NA ATIVIDADE DE ATPASES DE MUDAS MICROPROPAGADAS DE ABACAXIZEIRO DURANTE A ACLIMATIZAÇÃO

RESUMO

Mudas micropropagadas após a retirada de condições controladas de laboratórios necessitam do período de aclimatização. A adaptação das mudas ao novo ambiente induz a planta a mudanças anatômicas e fisiológicas que podem ser controladas por vários processos celulares. O objetivo deste trabalho foi investigar a participação dos sistemas primários de transporte de prótons de membranas totais no estabelecimento da colonização de raízes de abacaxizeiro pelas bactérias diazotróficas e no desenvolvimento dessas mudas tratadas com diferentes doses de nitrogênio, permitindo o entendimento da dinâmica de absorção e acúmulo deste nutriente. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados (DBC), em esquema fatorial (2x3x2), sendo os fatores representados por dois tipos de inóculos: uma mistura de bactérias diazotróficas contendo *Burkholderia* sp. UENF 114111, *Burkholderia silvatlantica* UENF 117111 e *Herbaspirillum seropedicae* HRC 54 e o outro sem bactérias, três doses de ureia (0, 5 e 10 g L⁻¹) e duas épocas de avaliação das bombas de prótons (90 e 150 dias) e da contagem de bactérias (30 e 150 dias), com três blocos. A unidade experimental foi composta de cinquenta células da bandeja com uma muda cada, sendo uma destinada para contagem de bactérias e o restante destinado à avaliação das bombas de prótons. A população de bactérias diazotróficas foi menor em mudas mais velhas durante a aclimatização. O transporte de H⁺ mediado pela P H⁺- ATPases em membranas

totais isoladas de raízes de abacaxizeiro micropropagado tem alterações com crescimento das plantas sob diferente épocas de aclimatização. A presença da inoculação com bactérias diazotróficas não induziu o transporte, porém a $F_{\text{máx}}$ da $V \text{ H}^+$ -ATPase foi menor na ausência de adubação nitrogenada. A adubação nitrogenada interfere na atividade de transporte de prótons da $V \text{ H}^+$ -ATPase em membranas isoladas de raiz de mudas micropropagadas do abacaxizeiro.

Palavras-chave: *Ananas comosus*, abacaxi, microbiologia, nitrogênio, bombas de H^+

DIAZOTROPHIC AND NITROGEN FERTILIZATION ON THE ACTIVITY OF ATPASES OF PINEAPPLE PLANTLETS DURING ACCLIMATIZATION

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the role of the primary systems of proton transport membranes in establishing the total root colonization by diazotrophic pineapple and development of these seedlings treated with different doses of nitrogen, allowing the understanding of the dynamics of absorption and accumulation nitrogen. The experimental design was a randomized block design (RBD) in a factorial design (2x3x2), the factors being represented by two types of inoculum with a mixture of diazotrophs containing *Burkholderia* sp. UENF 114111, 117111 UENF *Burkholderia silvatlantica* and *Herbaspirillum seropedicae* HRC 54 and not mixing with bacteria, three doses of urea (0, 5 and 10 g L⁻¹) and two evaluation periods of proton pumps or bacterial count (90 and 150 days for proton pumps 30 and 150, or to bacteria count) with three blocks. The experimental unit was composed of fifty cells of each tray with a plant, one designed for counting bacteria and remaining plants intended for evaluation of proton pumps. The population of diazotrophs was lower in older plants during acclimatization. The transport of H^+ mediated by P H^+ - ATPase in total membranes isolated from pineapple roots has changes with micropropagated plants under different growth periods of acclimatization. The presence of inoculation with diazotrophic bacteria did not induce transport, but the F_{max} of the $V \text{ H}^+$ -ATPase was lower in the absence of fertilization. The nitrogen interferes with the activity of proton transport of $V \text{ H}^+$ -ATPase in membranes isolated from root plantlets of pineapple.

Index terms: *Ananas comosus*, pineapple, microbiology, nitrogen, acclimatization, pumps H^+

INTRODUÇÃO

A micropropagação tem sido muito utilizada na produção de mudas de abacaxizeiro visando, principalmente, o lançamento de novas cultivares. Essa técnica apresenta vantagem por produzir mudas livres de patógenos e em larga escala (Pasqual et al., 1998; Teixeira et al., 2001).

Como em outras espécies vegetais, as mudas do abacaxizeiro cultivadas *in vitro*, necessitam passar por um processo de aclimatização antes de serem levadas ao plantio definitivo. Este processo é necessário para que ocorram modificações morfológicas, anatômicas e fisiológicas nas plantas para sobrevivência ao novo ambiente. Essa etapa pode ser um fator limitante à micropropagação (Grattapaglia e Machado, 1998; Hararika, 2003; Teixeira et al., 2001).

O nitrogênio (N) é um dos principais nutrientes para a cultura do abacaxi. Sua absorção ocorre principalmente na forma inorgânica como amônio (NH_4^+) ou na forma de nitrato (NO_3^-) através do sistema radicular (Fernandes e Souza, 2006; Taiz e Zeiger, 2009). O NO_3^- absorvido pode ser transportado no interior da planta e acumulado no interior do vacúolo para posterior utilização. No processo de absorção e acúmulo do N estão envolvidas duas enzimas de grande importância nos vegetais, a P H^+ -ATPase e V H^+ -ATPase, respectivamente. A P H^+ -ATPase é uma enzima presente na membrana plasmática que hidrolisa ATP, bombeando íons H^+ para o exterior da célula, resultando em um gradiente de potencial eletroquímico (GLASS et al., 1992). A adubação nitrogenada em plantas micropropagadas de abacaxizeiro tem sido relatada com vantagens na produção das mudas, acelerando o crescimento das plantas (Bregonci et al., 2008; Freitas et al., 2011).

Além da absorção de nutrientes (Morsomme e Boutry, 2000), as bombas transportadoras estão envolvidas em muitos processos metabólicos da planta, tais como, alongamento celular, abertura e fechamento de estômatos e homeostase celular (Serrano, 1989; Schroeder et al., 2001; Taiz e Zeiger, 2009).

Em células vegetais, a ativação e estimulação das bombas de prótons podem ocorrer por diversos fatores como reguladores de crescimento, luz, ataque de patógenos, hormônios, inoculação por fungos micorrízicos, inoculação por bactérias diazotróficas e muitos outros fatores que estão envolvidos em processos

vitais da planta (Brummel e Hall, 1987; Dietz et al., 2001; Façanha et al., 2002; Olivares et al., 2002; Ramos et al., 2005).

A inoculação com bactérias diazotróficas tem contribuído para o incremento de N e de outros nutrientes em plantas desta espécie, além de melhorar a adaptação ao ambiente *ex vitro* e reduzir o período de aclimatização (Baldotto et al., 2010).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi investigar a participação dos sistemas primários de transporte de prótons de membranas totais no estabelecimento da colonização em raízes de abacaxizeiro pelas bactérias diazotróficas e no desenvolvimento dessas mudas tratadas com diferentes doses de N, permitindo o entendimento da dinâmica de absorção e acúmulo deste nutriente.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação localizada no *campus* da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (Latitude = 21°19'23", Longitude = 41°10'40"; Altitude = 14 m) no período de agosto de 2012 a janeiro de 2013.

O delineamento experimental foi o de blocos casualizados (DBC), em esquema fatorial (2x3x2), sendo os fatores representados por dois tipos de inóculos: uma mistura de bactérias diazotróficas contendo *Burkholderia* sp. UENF 114111, *Burkholderia silvatlantica* UENF 117111 e *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC 54 e o outro sem bactérias, três doses de ureia (0, 5 e 10 g L⁻¹) e duas épocas de avaliação das bombas de prótons (90 e 150 dias) e de contagem de bactérias (30 e 150 para contagem de bactérias), com três blocos. A unidade experimental foi composta de cinquenta células da bandeja com uma muda cada, sendo uma destinada para contagem de bactérias e o restante destinado à avaliação das bombas de prótons.

As estirpes foram adquiridas no laboratório de biologia celular e tecidual da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro e fazem parte da coleção de bactérias. As do gênero *Burkholderia* são isoladas de plantas de abacaxizeiro cv Smooth Cayenne (Santos, 2008) e a *Herbaspirillum seropedicae* HRC 54 isoladas de cana-de-açúcar (Olivares, 1997).

As mudas de abacaxizeiro 'Vitória' provenientes de propagação *in vitro* foram procedentes do laboratório de cultura de tecidos Biomudas, localizado em Venda Nova do Imigrante-ES. As mudas enraizadas estavam acondicionadas em potes de vidro tipo *baby food*, mantidas em meio MS (Murashige e Skoog, 1962). Por ocasião da implantação do experimento as mudas foram lavadas para retirada do meio e selecionadas com 0,30 g de matéria fresca em média.

Para a obtenção de cada pré-inóculo, 20 uL do estoque bacteriano foi diluído em meio de cultivo líquido DYG'S (pré-inóculos) (Döbereiner et al., 1995) e mantidos sob agitação orbital de 140 rpm a 30°C por 24 horas e, assim, do pré-inóculo foi produzido o inóculo.

Na produção da mistura bacteriana, os inóculos foram dissolvidos em 5700 mL de água destilada. A inoculação foi realizada pela imersão das mudas de abacaxizeiro à mistura bacteriana por 30 minutos e o controle imerso em água destilada. Após 15 dias, o substrato foi inoculado, e cada célula da bandeja recebeu 2 mL da mistura bacteriana. Em seguida as mudas foram transferidas para bandejas de isopor de 200 células preenchidas com substrato Vivatto Slim Plus®, cuja análise química está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Características químicas da amostra do substrato Vivatto Slim Plus® composto por moinha de carvão vegetal, casca de pinus bio estabilizada, vermiculita, água e espuma fenólica

pH	K	Ca	Mg	Al	Na	SB	V	P	S	Fe	Cu	Zn	Mn	B
5,9	mmol _c dm ⁻³						(%)	mg dm ⁻³						
	29,7	96	58	0	13,2	196,9	85	400	1090	155,9	1,71	32,5	84,2	4,18
Matéria orgânica = 131 g dm ⁻³														

A análise foi realizada pelo Laboratório de Análise de Solos da FUNDENOR, Campos dos Goytacazes, RJ.

Aos 15 dias após o transplante, semanalmente, cada unidade experimental recebeu, via adubação foliar, 100 mL da solução nutritiva completa segundo Ramos et al. (2011). A partir da terceira semana a solução aplicada foi sem nitrogênio, por ocasião dos tratamentos. As soluções foram preparadas em pH 5,5 ou 5,6 (Tabela 2). Aos 121 dias nas mudas do tratamento controle foi aplicada solução completa, a fim de evitar morte de mudas pela deficiência do N.

Para adubação nitrogenada, inicialmente as doses de ureia foram parceladas, a fim de evitar a queima das folhas. Conforme os tratamentos a unidade experimental recebeu a seguinte concentração: aos 25 dias - 20% da dose;

aos 50 dias - 50% da dose e a partir dos 75 dias semanalmente foi aplicada a dose completa. A parcela recebeu 50 mL da solução, onde cada planta recebia ± 1 mL via adubação foliar aplicada com auxílio de um pulverizador manual. Todas as adubações foram feitas a partir das 17:00 horas, usando uma cabine de isopor como proteção, para evitar a deriva e a contaminação dos tratamentos.

Tabela 2. Composição química da solução nutritiva completa e com omissão de nitrogênio (mL L^{-1})

Soluções estoques	Completa	(-N)
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2mol L^{-1}	1	
KNO_3 2mol L^{-1}	2	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1mol L^{-1}	1	1
$(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ 1mol L^{-1}	0,25	
H_3BO_3	1	1
Fe-EDTA	1	1
Micro -B -Fe	1	1
CaCl_2 2mol L^{-1}		1
KCL 1mol L^{-1}		3,75
KH_2PO_4 1mol L^{-1}		0,25
NH_4Cl 1mol L^{-1}		0,25

Para o preparo de 1L de solução de micronutrientes (-B e -Fe), foram utilizados os seguintes reagentes analíticos: KCl = 3,7467 g; $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ = 0,8451 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ = 0,5780 g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ = 0,1267 g; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ = 0,088 g.

Após o transplântio das mudas, com auxílio de um pulverizador costal, foi pulverizada água a fim de evitar a desidratação das folhas. Nos primeiros 30 dias em um intervalo de duas horas. A partir deste período as pulverizações foram realizadas conforme a necessidade da planta, sendo no mínimo duas pulverizações ao dia e uma irrigação no final da tarde de forma a manter a capacidade de campo.

Os dados de temperatura média diária ($^{\circ}\text{C}$) e umidade relativa média diária (%) registrados na casa de vegetação durante a condução do experimento foram monitorados por um medidor marca KILOG (KIMO Constructeur), programado para realizar leituras a intervalos de duas horas, e estão apresentados na Figura 1.

Foram avaliados: (a) contagem de bactérias efetuada no tecido radicular, realizada por meio da técnica do Número Mais Provável (NMP) em duas épocas (30 e 150 dias); (b) isolamento de membranas das raízes para avaliação das bombas de prótons em duas épocas (90 e 150 dias).

A contagem das bactérias por meio da técnica do NMP (Döbereiner et al., 1995) é realizada da seguinte forma: amostras de 0,1 g das raízes foram

maceradas separadamente em 99,9 mL de água destilada. A partir das diluições (10^{-3}), foram realizadas diluições seriadas, com 1 mL da diluição original em 9 mL de água até a diluição 10^{-7} . Alíquotas de 100 μ L das diluições (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}) foram inoculadas no centro do meio semissólido JNFb armazenadas em frasco de vidro contendo 5 mL do meio. Os frascos foram incubados a 30°C por sete dias.

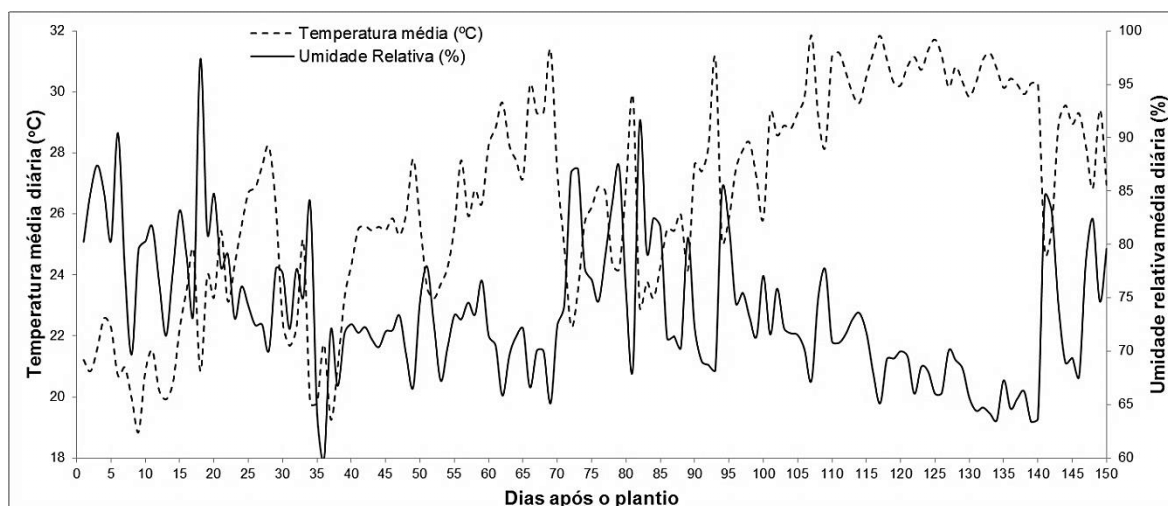


Figura 1. Temperatura média diária (°C) e umidade relativa média diária (%) registradas em casa de vegetação no período de condução do experimento (agosto/2012 a janeiro/2013).

Após esse período foi avaliado o crescimento bacteriano pela presença de uma película na superfície do meio. A identificação da espécie baseou-se na cor do indicador, na morfologia da célula e na aparência da colônia na placa. Para todos os tratamentos foi considerado o número mínimo de células por grama de raiz, baseado na diluição (10^{-1}). O Índice de NMP de bactérias foi obtido pela consulta à Tabela de McCrady para três repetições por diluição, tendo os valores normalizados pela transformação logarítmica.

Preparação da fração microssomal

O isolamento da membrana plasmática foi realizado como descrito por Giannini e Briskin (1987), com modificações (Façanha e De Meis, 1998).

As raízes foram coletadas, após pesagem, foram maceradas, com auxílio de gral e pistilo em meio tamponado pH 8,0 na proporção 1:1 (tampão: massa fresca de raiz). As concentrações finais dos reagentes no tampão de extração foram as seguintes: Sacarose 250 mM, Glicerol 10%, DTT 2 mM, EDTA 5 mM, PVP-40

0,5%, KCl 150 mM, BSA 0,13%, PMSF 2 mM, Tris-HCl (pH 8,0) 0,1 M. Após maceração, o homogenato foi filtrado, através de 4 camadas de gase e submetido à primeira centrifugação em uma centrífuga HITACHI himac CP, a 30000 rpm por 15 minutos a 4°C, para remoção de células não rompidas, núcleos e mitocôndrias. O sobrenadante foi coletado e submetido a uma nova centrifugação, em uma centrífuga HITACHI himac CP 85b, a 9100 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e submetido a uma nova centrifugação a 30000 x rpm a 2 °C por 35 minutos. O precipitado (pélete), que corresponde à fração microsomal não purificada, foi ressuspenso com 3 mL de uma solução tampão pH 7,5 - (meio de ressuspenção) contendo: Glicerol 15%, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, HEPS-KOH 10 mM (pH 7,6) e EDTA 1mM. Obtendo-se então a fração microsomal ressuspenso. O material foi então congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -70 °C até sua utilização.

Atividade enzimática - transporte de H⁺

Para determinação do transporte de H⁺, vesículas de membranas totais foram adicionadas a dois tipos de meios de incubação, sendo um com pH 6,5 e outro com pH 7,0 ambos contendo 100 mM de KCL, 5 mM de MgSO₄, 10 mM de tampão Hepes-Btp (bis tris propano), 250 mM de sacarose e 1 μM de 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina (ACMA). Foram utilizados os inibidores ortovanadato de sódio sensível (300 μM) (inibidor de P H⁺-ATPase) e concanamicina A (22 ηM) (inibidor de V H⁺-ATPase) nos meios de incubação com pH 6,5 e pH 7,0, respectivamente. Após 3 minutos de incubação foi adicionado 1 mM ATP, pH 7,2 e o transporte de H⁺ foi monitorado pelo decaimento de fluorescência do ACMA usando fluorímetro Shimadzu RF-530 1PC. NH₄CL (concentração final 20 mM) foi adicionado após extinção da fluorescência (“quenching”) (~400-600s) para a dissipação do gradiente de prótons. A atividade de P H⁺-ATPase foi avaliada utilizando-se o tampão pH 6,5 e sua atividade foi ortovanadato de sódio sensível. A atividade de V H⁺-ATPase foi avaliada utilizando-se o tampão pH 7,0 e sua atividade foi concanamicina sensível (22 ηM). A partir dos dados obtidos foi determinada a velocidade inicial (V₀) e a variação da fluorescência máxima (F_{máx}).

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F, as médias obtidas foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa SANEST.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A contagem de bactérias realizada na raiz mostrou que houve interação entre o fator época e o fator bactérias, sendo que aos 30 dias a população em mudas inoculadas obteve um aumento de 3 unidades logarítmicas em relação à população em mudas controle. Observa-se uma diminuição da população aos 150 dias, não havendo diferença estatística entre mudas controle e inoculadas (Tabela 3). Nas mudas inoculadas houve redução da população de bactérias aos 150 dias, quando comparado aos 30 dias.

Tabela 3. Número Mais Provável (NMP) de bactérias por grama de raiz do abacaxizeiro 'Vitória' em resposta à inoculação de bactérias diazotróficas em função de duas épocas de avaliação

Bactéria	Época		Média
	30	150	
Diazotróficas			
	NMP g ⁻¹ de raiz (Log ₁₀)		
Ausência	3,91 bA	2,72 aA	3,31
Presença	6,96 aA	2,84 aB	4,90
Média	5,43	2,78	
CV (%)	41,23		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, a 5% de significância pelo teste de Tukey.

Esses resultados estão de acordo com alguns trabalhos (Costa e Ruschel, 1981; Brasil et al., 2005; Bellone et al., 1996; Reis Junior et al., 2004) que confirmam que a população de diazotróficas tanto na planta, quanto no solo pode diminuir ou aumentar e pode ser influenciada por diversos fatores tais como diferentes épocas, deficiência hídrica, baixa umidade do solo e altas temperaturas.

Em mudas controle observou-se o crescimento da população de bactérias (Tabela 3). Segundo Weber et al. (2003), a presença de bactérias em plantas controle pode ser devido à proximidade das mesmas ou pela contaminação dos explantes no momento da multiplicação *in vitro*, sendo difícil evitar que ocorra tal

contaminação. Esses autores também detectaram o crescimento de bactérias em plantas controle de mudas micropropagadas de abacaxizeiro.

A Tabela 4 demonstra o transporte de prótons das P H⁺-ATPases e V H⁺-ATPases em resposta à inoculação de bactérias. Nota-se que a F_{máx} da atividade total do transporte de prótons a pH 6,5 foi induzida pela ausência de bactéria. No entanto, a presença e a ausência de bactérias não demonstraram diferença no efeito verificado na V₀ da atividade total do transporte. Já a F_{máx} do transporte de H⁺ realizado por P H⁺-ATPases e V H⁺-ATPases foi induzida na ausência de bactérias, embora os tratamentos não tenham demonstrado efeito diferenciado sobre V₀ de transporte de prótons para P H⁺-ATPases.

Tabela 4. Transporte de prótons em P H⁺-ATPases e V H⁺-ATPases isoladas de membranas totais de raiz de abacaxizeiro em função da presença e ausência de bactérias diazotróficas até 150 de aclimatização.

Bactérias diazotróficas	pH 6,5 Total		F _{máx} (P-ATPase)	V ₀ (P-ATPase)	pH 7,0 Total		F _{máx} (V-ATPase)	V ₀ (V-ATPase)
	Fmax	V ₀			Fmax	V ₀		
Ausência	399a	125a	188a	54 ^a	364a	128a	148 ^a	45 a
Presença	269b	91a	112b	32 ^a	322a	124a	57b	28 b
Média	334	108	150	43	343	126	118	36,4
CV (%)	50	51	69	84	64	56	19,2	40,2

Fluorescência máxima (F_{máx}), velocidade inicial (V₀). Médias da avaliação de duas épocas. Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, a 5% de significância pelo teste de Tukey.

Como as ATPases, principalmente as P H⁺-ATPases possuem diversas funções na fisiologia de uma célula vegetal é esperado que microrganismos que interagem com essas células desenvolvam mecanismos para atingir essa enzima. De acordo com Elmore e Coaker (2011), essas enzimas contribuem para a formação da resposta imune nas plantas e podem ser importantes alvos de microrganismos, aumentando a suscetibilidade das plantas à interação/infecção. Este fato poderia justificar a inibição das enzimas pela inoculação bacteriana. Porém, Olivares et al. (2002) observaram aumento na atividade das H⁺-ATPases isoladas de membrana plasmática provenientes de raízes de cana-de-açúcar infectadas por bactérias diazotróficas endofíticas, sendo o efeito atribuído à auxina produzida pelas bactérias.

Ainda, segundo Elmore e Coaker (2011), alterações na atividade de P H⁺-ATPase por estimulação ou inibição podem ocasionar efeitos drásticos nas funções celulares da planta.

A Tabela 5 mostra o efeito da época no transporte de prótons. Aos 90 dias, tanto a V₀ da atividade total de transporte de H⁺ a pH 6,5, quanto a V₀ da P H⁺-ATPase foi menor que aos 150 dias, indicando maior atividade desta enzima com o crescimento da planta. Porém, a F_{máx} dessas duas classes enzimáticas não foi influenciada pela idade das mudas, assim como ocorreu também na atividade total em pH 7,0. Efeito contrário foi observado na atividade de V H⁺-ATPases onde aos 150 dias a F_{máx} e V₀ de transporte de prótons foi menor, quando comparado ao transporte avaliado aos 90 dias.

Tabela 5. Transporte de prótons em P H⁺-ATPases e V H⁺-ATPases isoladas de raiz de abacaxizeiro em função da presença e ausência de bactérias diazotróficas.

Tempo de aclimatização (dias)	pH 6,5 Total		F _{máx} (P-ATPase)	V ₀ (P-ATPase)	pH 7,0 Total		F _{máx} (V-ATPase)	V ₀ (V-ATPase)
	F _{máx}	V ₀			F _{máx}	V ₀		
90	291a	83b	141a	29b	333a	133a	184a	49a
150	377a	133a	160a	57a	353a	119a	51b	23b
Média	334	108	150	43	343	126	118	36
CV (%)	50	51	69	84	64	56	19	40

Fluorescência máxima (F_{máx}) e velocidade inicial (V₀). Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, a 5% de significância pelo teste de Tukey.

O crescimento da planta aos 150 dias pode ser justificado pela maior atividade da P H⁺-ATPase. Visto que, a acidificação da parede celular por meio P H⁺-ATPase induz a plasticidade da parede, possibilitando a expansão celular fundamental para o crescimento vegetativo. Essa bomba H⁺ também faz com que haja a remoção do excesso de H⁺ do citossol (Rayle e Cleland, 1992; Serrano, 1990).

A transferência de plantas provenientes de cultivo *in vitro* para condições 'ex vitro' é uma etapa crítica, devido ao estresse fisiológico e morfológico causado pelo novo ambiente. Assim, podem haver alterações na atividade da H⁺-ATPases, como ocorre com a P H⁺-ATPase, que além da regulação de processos fisiológicos, também desempenha um papel na adaptação das plantas às condições de mudança, principalmente em condições de estresse. E tem sido relatadas alterações da expressão do gene desta enzima, em resposta a uma variedade de

fatores ambientais como alta salinidade, desidratação e baixas temperaturas (Janicka-Russak, 2011).

Foi verificada interação entre as épocas e as doses de ureia, onde a análise para a $F_{\text{máx}}$ de transporte H^+ em $V H^+$ -ATPase (Tabela 6), mostrou que, aos 90 dias, a dose 5 g L^{-1} de ureia promoveu a maior $F_{\text{máx}}$ de transporte H^+ , seguido pela dose 0 g L^{-1} de ureia. A dose 10 g L^{-1} promoveu a menor $F_{\text{máx}}$. Esta redução pode ser devido à inibição da $V H^+$ -ATPase pela alta dose de ureia.

Tabela 6. Transporte de prótons em $V H^+$ -ATPase isoladas de membrana totais de raiz de abacaxizeiro em função dos fatores tempo de aclimatização e doses de ureia para a fluorescência máxima ($F_{\text{máx}}$) e velocidade inicial (V_0)

Ureia (g L^{-1})	$F_{\text{máx}}$ (unidade relativa de fluorescência)			V_0 (unidade relativa de fluorescência)		
	90 dias	150 dias	Média	90 dias	150 dias	Média
0	158 b A	48 a B	103	32 b A	10 a B	21
5	306 a A	63 a B	185	83 a A	32 a B	58
10	88 c A	44 a B	66	34 b A	28 a A	31
Média	184	52	118	50	23	36
CV (%)	19,2			40,2		

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, a 5% de significância pelo teste de Tukey.

De acordo com Finbow e Harrison (1997), quando o NO_3^- está presente em grandes concentrações no citossol, ele funciona como um ânion caotrópico para as $V H^+$ -ATPases, causando um desligamento entre os domínios integral e periférico desta proteína tornando-a incapaz de hidrolisar ATP e translocar prótons, inativando a enzima.

Esse efeito foi diferente do observado aos 150 dias, onde a $F_{\text{máx}}$ de transporte H^+ foi igual em todas as doses aplicadas. Foi observada uma diminuição da $F_{\text{máx}}$ para todos os tratamentos na segunda época de avaliação. Quando se aplicou 5 g L^{-1} de ureia verificou-se estímulos a V_0 de transporte H^+ da enzima aos 90 dias. Sendo que aos 150 dias não foram observadas diferenças na atividade estimulada pelas doses. Nesta mesma época, quando comparado aos 90 dias, verifica-se menor V_0 de transporte H^+ para as doses 0 e 5 g L^{-1} (Tabela 6).

Sob deficiência de N como ocorre no tratamento sem adubação nitrogenada, pode ter ocorrido o transporte de N armazenado no vacúolo. Quando acumulado no vacúolo, o NO_3^- pode ser remobilizado quando seu conteúdo no citosol diminuir ou quando a planta exigir maiores quantidades desse nutriente para

processos de crescimento e reprodução. A entrada e saída de NO_3^- no vacúolo é regulada pela ativação ou inibição das enzimas V H^+ -ATPases e H^+ -PPases presentes nas membranas vacuolares (Santos, 2006). Essa remobilização ocorre através de um transportador do tipo simporte (NO_3^-/H^+). As V H^+ -ATPases e H^+ -PPases bombeiam prótons do citosol para o interior do vacúolo utilizando a energia da hidrólise do ATP e do PPI, respectivamente, criando um gradiente de potencial eletroquímico, favorecendo a saída de H^+ (Fernandes e Rossiello, 1995).

Houve interação entre os fatores bactérias e dose de ureia para o transporte de prótons em V H^+ -ATPase. Verificou-se que a $F_{\text{máx}}$ de transporte foi estimulada com a dose 5 g L^{-1} de ureia independente da inoculação com bactérias. Nota-se que na presença da mistura bacteriana a atividade foi a mesma observada na ausência de bactérias com exceção de mudas não adubadas, ou seja, com 0 g L^{-1} de ureia. Assim, a atividade em V H^+ -ATPase pode ser mantida com inoculação de bactérias desde que a planta receba adubação nitrogenada (Tabela 7).

Tabela 7. Transporte de prótons em V H^+ -ATPases isoladas de membranas totais de raiz de abacaxizeiro em função dos fatores bactérias e doses de ureia.

Ureia (g L^{-1})	$F_{\text{máx}}$ (unidade relativa de fluorescência)		
	Ausência de bactérias	Presença de bactérias	Média
0	148 b A	57 b B	103
5	187 a A	181 a A	184
10	65 c A	67 b A	66
Média	133	102	
CV(%)		19,2	

Fluorescência máxima ($F_{\text{máx}}$). Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, a 5% de significância pelo teste de Tukey.

Foi verificado efeito do fator bactérias na V_0 de transporte H^+ em V H^+ -ATPase, sendo que o transporte aos 90 dias foi maior em membranas de plantas não inoculadas. No entanto, aos 150 dias não foi verificada diferença entre os tratamentos microbiológicos. Porém, nota-se que os efeitos do transporte aos 150 dias foram diferentes daqueles observados aos 90 dias, onde V_0 da atividade desta enzima diminuiu no tratamento sem inoculação, sendo que as estirpes inoculadas neste experimento mantiveram a mesma atividade V H^+ -ATPase nas duas épocas avaliadas (Tabela 8).

Tabela 8. Transporte de prótons em V H⁺-ATPases isoladas de raiz de abacaxizeiro em função dos fatores épocas e doses de ureia e bactérias.

Bactérias diazotróficas	V ₀ (unidade relativa de fluorescência)		
	90 dias	150 dias	Média
Ausência	69 a A	21 a B	45
presença	30 b A	26 a A	28
Média	50	24	
CV(%)		40,2	

Velocidade inicial (V₀). Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si, a 5% de significância pelo teste de Tukey.

A acidificação de compartimentos intracelulares por uma bomba protônica tipo-V (V H⁺-ATPases) é responsável pela energização do transporte de íons e outros metabólitos (Padmanaban et al., 2004). No caso de mudas micropropagadas em período de aclimatização esse transporte é muito importante, já que as mudas se encontram em fase de adaptação às condições de *ex vitro* e necessitam de condições fisiológicas adequadas para o crescimento.

CONCLUSÕES

- A população de bactérias diazotróficas em mudas de abacaxizeiro foi menor em plantas mais velhas durante a aclimatização;
- O transporte de H⁺ mediado pela H⁺-ATPases em membrana isolada de raiz de abacaxizeiro micropropagado tem alterações com crescimento das plantas sob diferentes épocas de aclimatização;
- A presença de bactérias diazotróficas não induziu o transporte, porém, na interação com as doses de ureia a F_{máx} da V H⁺-ATPases foi menor na ausência de adubação nitrogenada;
- A adubação nitrogenada interfere na atividade de transporte de prótons da V H⁺-ATPases em membranas isoladas de raiz de mudas micropropagadas do abacaxizeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baldotto, L.E.B., Baldotto, M.A., Olivares, F.L., Viana, A.P., Bressan-Smith, R. (2010) Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, MG, 34(2):349-360.

- Bellone, C.H., Belone, S.C., Pedraza, R.O. (1996) Hydric deficiency and acetylene reduction in sugar-cane roots. In: *International Symposium On Nitrogen Fixation With Non-Legumes*, 7:125-126.
- Brasil, M.S., Baldani, J.I., Baldani, V.L.D. (2005) Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do Pantanal Sul Matogrossense. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, MG, 29:179-190.
- Bregonci, I.S., Schmildt, E.R., Coelho, R.I., Reis, E.F., Brum, V.J., Santos, J.G. (2008) Adubação foliar com macro e micronutrientes no crescimento de mudas micropropagadas do abacaxi cv. Gold [*Ananas comosus* (L.) Merrill] em diferentes recipientes. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, MG, 32(3):705-711.
- Brummel, D.A., Hall, J.L. (1987) Rapid cellular response to auxin and the regulation of growth. *Plant Cell & Environment*, 10(7): 523-543.
- Costa, J.M.T.F., Rushel, A.P. (1981) Seasonal variation in the microbial populations of sugar-cane plants. In: Vose, P.B., Rushel, A.P., eds. Associative N₂ – fixation. São Paulo, University of São Paulo. 2:109-118.
- Deitz, K.J., Tavakoli, N., Klunge, C., Mimura, T., Sharma, S. S., Harris, G. C., Chardonens, A. N., Gollack, D. (2001) Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. *Journal of Experimental Botany*, Bielefeld, 52 (363):1969-1980.
- Döbereiner, J., Baldani, V.L.D., Baldani, J.I. (1995) Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. Brasília: Embrapa-SPI /Embrapa-CNPAB, 60p.
- Elmore, J.M., Coaker, G. (2011) The Role of the Plasma Membrane H⁺-ATPase in Plant–Microbe Interactions. *Molecular Plant*, 4(3):416-427.
- Façanha, A.R., De Meis, L. (1998) Reversibility of H⁺-ATPase and H⁺-Pyrophosphatase in tonoplast vesicles from maize coleoptiles and seeds. *Plant Physiology*. 116(1):14-87.

- Façanha, A.R., Façanha, A.L.O., Olivares, F.L., Guridi, F., Santos, G.A., Velloso, A.C.X., Rumjanek, V.M., Brasil, F., Schripsema, J., Braz-Filho, R., Oliveira, M.A., Canellas, L.P. (2002) Bioatividade de ácidos húmicos: Efeito sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 37:1301-1310.
- Fernandes, M.S. Souza, S.R.(2006) Absorção de Nutrientes. In: Fernandes, M. S. *Nutrição Mineral de Plantas*. Ed. *Sociedade Brasileira de Ciência do Solo*, 432p.
- Fernandes, M.S., Rossiello, R.O.P. (1995) Mineral Nitrogen in Plant Physiology and Plant Nutrition. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 14(2):111-148.
- Finbow, M.E., Harrison, M. A. (1997) The vacuolar H⁺-ATPase: A universal proton pump of eukaryotes. *Biochemical Journal*, 324:697-712.
- Freitas, S.J., Carvalho, A.J.C., Berilli, S. da S., Santos, P.C., Marinho, C.S. (2011) Substratos e Osmocote® na nutrição e desenvolvimento de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Vitória. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 33(n. spe1):672-679.
- Giannini, J.L., Briskin, D.P. (1987) Proton transport in plasma membrane and tonoplast vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue. *Plant Physiology*. 84(4):613-618.
- Grattapaglia, D., Machado, M.A. (1998) Micropropagação. In: Torres, A.C., Caldas, L.S., Buso, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: CBAB/Embrapa, p.183- 260.
- Hazarika, B.N. (2003) Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science*, 85(12):1704-1712.
- Janicka-Russak, M. Plant plasma membrane H⁺ -ATPase in adaptation of plants to abiotic stresses. In: Abiotic stress response in plants - physiological, biochemical and genetic perspectives. 1. ed. Shanker, A. (ed.). Intech, p.197-218.
- Morsomme P., Boutry M., (2000) The plant plasma membrane H⁺-ATPase: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta*, 1465:1-16.

- Murashige, J.R., Skoog, F.A. (1962) Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, 15:473-497.
- Olivares, F.L., Ferreira, F.P., Silva, L.G., Façanha, A.R., Ramos, A.C., Netto, A. T., Campostrini, E., Reis, V.M., Miguens, F.C. (2002) Physiological changes induced on the host plant during the endophytic interaction between sugar cane and diazotrophic bacteria. In: *International symposium on nitrogen fixation with non-legumes, 9th.*, Leuven, Belgium. Book of abstracts. Leuven: Katholieke Universiteit/Centre of Microbial and Plant Genetics, 38-39p.
- Padmanaban, S., Lin, X., Perera, I., Kawamura, Y., Sze, H.(2004) Differential expression of vacuolar H⁺-ATPase subunit c genes in tissues active in membrane trafficking and their roles in plant growth as revealed by RNAi. *Plant Physiology*, 134:1514-1526.
- Pasqual, M., Moreira, M.A., Sobrinho, A.A. (1998) Biotecnologia aplicada à produção de mudas de abacaxi. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 19(195):20-23.
- Ramos, A.C., Martins, M.C., Façanha, A.R. (2005) Atividade ATPásica e pirofosfatásica em microsossomos de raízes de milho colonizadas com fungos micorrízicos arbusculares. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa-MG, 29:207-213.
- Ramos, M.J.M., Monnerat, P.H., Pinho, L.G. R., Silva, J.A. (2011) Deficiência de macronutrientes e de boro em abacaxizeiro 'Imperial': composição mineral. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 33(1): 261-271.
- Rayle, D.L., Cleland, R.E. (1992) The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology*, Rockville, 99:1271-1274.
- Reis Junior, F.B., Silva, M.F., Teixeira, K.R.S., Urquiaga, S., Reis, V.M. (2004) Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa-MG, 28:103-113.
- Schroeder, J.I., Allen, G.J., Hugouvieux, V., Kwak, J. M., Waner, D. (2001). Guard cell signal transduction. *Ann. Plant Physiology. Plant Mol. Biol.*, 52:627-658.

- Serrano R (1990) The plant plasma membrane-structure, function and molecular biology. (Larsson, C.; Moller, I.M.), Springer-Verlag, Berlim, Heidelberg 127-153.
- Serrano, R. (1989) Structure and finction of plasma membrane ATPase. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40(1):61-94.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2009) *Fisiologia vegetal*. 4.ed. Porto Alegre: Artmed. 819p.
- Teixeira, J.B., Cruz, A.R.R., Ferreira, F.R., Cabral, J.R. (2001) Biotecnologia aplicada à produção de mudas: produção de mudas micropropagadas de abacaxi. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, 3:42-47.
- Weber, O.B., Correia, D., Silveira, M.R.S., Crisóstomo, L.A., Oliveira, E.M., Sá, E. G. (2003) Efeito da bactéria diazotrófica em mudas micropropagadas de abacaxizeiros Cayenne Champac em diferentes substratos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 38(6):689-696.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

Com o objetivo de aumentar o crescimento e o desenvolvimento de mudas de abacaxizeiro e diminuir o período de aclimatização foi realizado um experimento para avaliar a resposta de mudas micropropagadas provenientes de cultura de tecidos, a inoculação com bactérias diazotróficas e adubação nitrogenada.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação localizada no *campus* da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (Latitude = 21°19'23" e Longitude = 41°10'40"; Altitude = 14 m) no período de agosto de 2012 a janeiro de 2013.

Foram avaliados o crescimento e o conteúdo de nutrientes nas mudas, atividades de bombas H⁺ e a população de bactérias nas raízes das mudas. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados (DBC), em esquema fatorial (2x5x5), sendo os fatores representados por dois tipos de inóculos (ausência e presença de uma mistura de bactérias diazotróficas contendo *Burkholderia* sp. UENF 114111, *Burkholderia silvatlantica* UENF 117111 e *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC 54), cinco doses de ureia (0, 2, 5, 7 e 10 g L⁻¹) e cinco épocas de avaliação do tempo de aclimatização (30, 60, 90, 120 e 150 dias após o plantio das mudas em bandejas), com quatro blocos.

Determinou-se, após o transplante das mudas, a altura, o número de folha, a massa seca da parte aérea, a massa seca da raiz, a área foliar, em cinco épocas (30, 60, 90, 120 e 150 dias); conteúdo de nutrientes, em quatro épocas (60, 90, 120 e 150 dias); contagem de bactérias efetuada no tecido radicular, realizada por meio

da técnica do Número Mais Provável (NMP), em duas épocas (30 e 150 dias) e atividade das bombas H^+ (P H^+ -ATPases e V-ATPases) em duas épocas (90 e 150 dias).

Com base nos resultados obtidos conclui-se que:

- A inoculação de bactérias promoveu incremento na massa seca da parte aérea e massa seca de raiz de mudas micropropagadas do abacaxizeiro 'Vitória';
- A aplicação de adubo nitrogenado reduziu o período de aclimatização de mudas micropropagadas do abacaxizeiro 'Vitória' em, aproximadamente, 60 dias;
- Estimou-se que as doses de ureia entre 7 e 9 g L⁻¹, aplicadas às mudas do abacaxizeiro 'Vitória' durante a aclimatização, promoveram maiores crescimentos;
- Mudas do abacaxizeiro 'Vitória', crescidas durante o período de aclimatização com inoculação com bactérias diazotróficas, apresentaram maior conteúdo de N, K e de S do que aquelas não inoculadas;
- A elevação da adubação nitrogenada promoveu incremento no conteúdo de N na matéria seca da parte aérea e no índice de SPAD do abacaxizeiro;
- Com exceção para o N, Mn e Cu, o incremento na adubação nitrogenada provocou redução no conteúdo dos outros nutrientes em mudas mais velhas na etapa de aclimatização;
- A extração de nutrientes por mudas micropropagadas do abacaxizeiro, na aclimatização, foi: K>N>Ca>Mg>S>P>>Fe>Mn>B>Zn>Cu>Mo>Ni;
- A população de bactérias diazotróficas em mudas de abacaxizeiro foi menor em plantas mais velhas durante a aclimatização;
- O transporte de H^+ mediado pela H^+ -ATPases em membrana isolada de raiz de abacaxizeiro micropropagado tem alterações com crescimento das plantas sob diferente épocas do aclimatização;
- A presença de bactérias diazotróficas inoculadas não induziu o transporte, porém, na interação com as doses de ureia $F_{máx}$ da V H^+ -ATPase foi menor na ausência de adubação nitrogenada;
- A adubação nitrogenada interfere na atividade de transporte de prótons da V H^+ -ATPase em membranas isoladas de raiz de mudas micropropagadas do abacaxizeiro.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aquino, A.R.L., Vieira, A., Azevedo, J.A., Genú, P.J. C., Kliemann, H.J. (1986) Nutrição mineral e adubação do abacaxizeiro. In: HAAG, P.H. *Nutrição mineral e adubação de frutíferas tropicais*. Campinas: Fundação Cargill, p.31-58.
- Azevedo, B.M., Bomfim, G.V., Portugal, A.C., Carvalho, P.C., Gondim, R.S., Viana, T.V.S. (2008) Aclimatização *ex vitro* de abacaxizeiro ornamental com diferentes laminas de irrigação. *Irriga*, Botucatu, 13:298-309.
- Azevedo, I.G. de, Prado, L.A.S., Façanha, A.R. (2009) Relação entre a modulação das bombas de prótons e a sinalização hormonal durante o amadurecimento de tomates (*Solanum lycopersicum*). In: Congresso Fluminense de Iniciação Científica e Tecnológica, Campos dos Goytacazes, 1:36-36.
- Baldotto, L.E.B., Baldotto, M.A., Giro, V.B., Canellas, L.P., Olivares, F.L., Bressan-Smith, R. (2009) Desempenho do abacaxizeiro 'Vitória' em resposta à aplicação de ácidos húmicos durante a aclimação. *Revista Brasileira de Ciências Solo*, Viçosa-MG, 33(4):979-990.
- Baldotto, L.E.B., Baldotto, M.A., Olivares, F.L., Viana, A.P., Bressan-Smith, R. (2010) Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. *Revista de Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa-MG, 34(2):349-360.

- Baldotto, L.E.B., Olivares, F.L., Bressan-Smith, R (2011) Structural interaction between GFP-labeled diazotrophic endophytic bacterium *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 and pineapple plantlets 'Vitória'. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42:114-125.
- Balota, E.L., Lopes, E.S., Hungria, M.; Döbereiner, J. (1997) Inoculação de Bactérias Diazotróficas e Fungos Micorrizo arbusculares na Cultura da Mandioca. *Pesquisa agropecuária brasileira*. Brasília, 32(6):2277-2285.
- Barboza, S.B.S.C., Ribeiro, D.G., Teixeira, J.B., Portes, T.A., Souza, L.A.C. (2006) Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, Brasília, 41(2):185-194.
- Bashan, Y., Holguin, G. (1997) Azospirillum-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Canadian Journal Microbiology*, 43:103-121.
- Bastián, F., Cohen, A., Piccoli, P., Luna, V., Baraldi, R., Bottini, R. (1998) Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regulation*, 24:7-11.
- Bellone, C.H., Belone, S.C., Pedraza, R.O. (1996) Hydric deficiency and acetylene reduction in sugar-cane roots. In: *International Symposium On Nitrogen Fixation With Non-Legumes*, 7:125-126.
- Benabdellah K., Azcón-Aguilar C., Ferrol, N. (1999) Plasma membrane ATPase and H⁺ transport activities in microsomal membranes from mycorrhizal tomato roots. *Journal of Experimental Botany*, 50:1343-1349.
- Berilli, S.S., Carvalho, A.J.C. de, Freitas, S.J., Farias, D.C., Marinho, C.S. (2011) Avaliação do desenvolvimento de diferentes tamanhos de mudas micropropagadas de abacaxizeiro, após aclimação. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 33(1):208-214.
- Brasil, M.S., Baldani, J.I., Baldani, V.L.D. (2005) Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do Pantanal Sul

Matogrossense. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, MG, 29(2):179-190.

Bregonci, I.S., Schmildt, E.R., Coelho, R.I., Reis, E.F., Brum, V.J., Santos, J.G. (2008) Adubação foliar com macro e micronutrientes no crescimento de mudas micropropagadas do abacaxi cv. Gold [*Ananas comosus* (L.) Merrill] em diferentes recipientes. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, MG, 32(3):705-711.

Brummel, D.A., Hall, J.L. (1987) Rapid cellular response to auxin and the regulation of growth. *Plant Cell & Environment*, 10(7):523-543.

Cabral, J.R.S., Matos, A.P. de. (2005) Imperial, nova cultivar de abacaxi. Cruz das Almas, BA: Embrapa-CNPMF, 4p. (Embrapa-CNPMF. Comunicado Técnico, 114).

Campostrini, E., Otoni, W.C. (1996) *Aclimatização de plantas: abordagens recentes*. Brasília: Embrapa-CNPq, 12p. (ABCTP notícias, 25).

Carvalho, V.D. de., Cunha, G.A.P. (1999) Produtos e usos. In: Cunha, G.A.P. da, Cabral, J.R.S. Souza, L.F.da S. (org). *O abacaxizeiro. Cultivo, agroindústria e economia*. Brasília: EMBRAPA Comunicação para Transferência de Tecnologia. p: 389-402.

Cassán, F., Bottini, R., Schneider, G., Piccoli, P. (2001) *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* hydrolyze conjugates of GA₂₀ and metabolize the resultant aglycones to GA₁ in seedlings of rice dwarf mutants. *Plant Physiology*, Minneapolis, 125(4):2053-2058.

Catunda, P.E.A., Marinho, C.S., Gomes, M.M.A., Carvalho, A.J.C. de (2008) Brassinosteroid and substrates in the acclimation of the pineapple 'Imperial'. *Acta Scientiarum Agronomy*. Maringá, 30(3):345-352.

Cid, L.P.B.A. (2001) A propagação *in vitro* de plantas: O que é isso? *Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, 19(3):16-21.

Coelho, R.I., Carvalho, A.J.C. de, Marinho, C.S., Lopes, J.C., Pessanha, P.G.O. (2007) Resposta à adubação com ureia, cloreto de potássio e ácido bórico em

- mudas do abacaxizeiro 'Smooth Cayenne'. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 29(1):161-165.
- Coelho, R.I., Carvalho, A.J.C. de, Thiebaut, J.T.L. (2010) Teores foliares de nutrientes em mudas do abacaxizeiro 'Smooth Cayenne' em resposta à adubação. *Revista de Ciências Agrárias*, Lisboa, 33(2):173-179.
- Coleman, J.O., Blake-Kalff, M.M., Davies, T.E. (1997) Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Reviews: Trends Plant Science*, 2(4):144-151.
- Collins, J.L. (1960) The pineapple: botany, cultivation and utilization. London: Leonard Hill. 294p.
- Correia, D., Borges, N.S.S., Ribeiro, E.M., Morais, J.P.S. (2011) *Produção de Mudas In Vitro e Indução Floral de Abacaxizeiro Ornamental*. Documentos 134 <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/900889/1/DOC11002.pdf> em 10/05/2012. Embrapa Agroindústria Tropical- versão eletrônica. Fortaleza, CE.
- Cosgrove, D.J. (1997) Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *Plant Cell*, 9(7):1031-1041.
- Costa, J.M.T.F., Rushel, A.P. (1981) Seasonal variation in the microbial populations of sugar-cane plants. In: Vose, P.B., Rushel, A.P., eds. Associative N₂ – fixation. São Paulo, University of São Paulo. 2:109-118.
- Cunha, G.A.P. da, Cabral, R.S.C. (1999) Taxonomia, espécies, cultivares e morfologia. In: Cabral, J.R.S., Souza, L.F. da S. *O abacaxizeiro – cultivo, agroindústria e economia*. 3. ed. Brasília, Embrapa/Mandioca e Fruticultura, p.15-51.
- Deitz, K.J., Tavakoli, N., Klunge, C., Mimura, T., Sharma, S.S., Harris, G.C., Chardonnens, A. N., Golldack, D. (2001) Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. *Journal of Experimental Botany*, Bielefeld, 52(363):1969-1980.

- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., Okon, Y. (2003) Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Review in Plant Sciences*, Boca Raton, 22(2):07-149.
- Dobereiner, J. (1997) A importância da fixação biológica de nitrogênio para a agricultura sustentável. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, Encarte especial, 1:2-3.
- Döbereiner, J., Baldani, V.L.D., Baldani, J.I. (1995) Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. Brasília: Embrapa-SPI /Embrapa-CNPAB, 60p.
- Elmore, J.M., Coaker, G. (2011) The Role of the Plasma Membrane H⁺-ATPase in Plant–Microbe Interactions. *Molecular Plant*, 4(3):416-427.
- Epstein, E. (1975) *Nutrição mineral das plantas: Princípios e perspectivas*. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos, 341p.
- Evans, J.R. (1989) Photosynthesis and nitrogen relationship in leaves of C3 plants. *Oecologia*, Berlim, 78(1): 9-19.
- Façanha, A.R., De Meis, L. (1998) Reversibility of H⁺-ATPase and H⁺-Pyrophosphatase in tonoplast vesicles from maize coleoptiles and seeds. *Plant Physiology*. 116(1):14-87.
- Façanha, A.R., Façanha, A.L.O., Olivares, F.L., Guridi, F., Santos, G.A., Velloso, A.C.X., Rumjanek, V.M., Brasil, F., Schripsema, J., Braz-Filho, R., Oliveira, M.A., Canellas, L.P. (2002) Bioatividade de ácidos húmicos: Efeito sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 37:1301- 1310.
- FAO (2013). FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistical Database. Crops database. <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Online. em: 22/03/2013.

- Feitosa, H. de O., Amorim, A.V., Lacerda, C.F., Silva, F.B. da. (2011) Crescimento e extração de micronutrientes em abacaxizeiro 'Vitória'. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 33(n. spe1):706-712.
- Fernandes, M.S. Souza, S.R.(2006) Absorção de Nutrientes. In: Fernandes, M. S. *Nutrição Mineral de Plantas*. Ed. *Sociedade Brasileira de Ciência do Solo*, 432p.
- Fernandes, M.S., Rossiello, R.O.P. (1995) Mineral Nitrogen in Plant Physiology and Plant Nutrition. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 14(2):111-148.
- Finbow, M.E., Harrison, M. A. (1997) The vacuolar H⁺-ATPase: A universal proton pump of eukaryotes. *Biochemical Journal*, 324:697-712.
- Freitas, S.J. (2010) *Brassinosteroides e adubação no desenvolvimento, crescimento e nutrição de mudas de abacaxi*. Tese (Doutorado Produção vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro– UENF, 100p.
- Freitas, S.J., Carvalho, A.J.C. de, Berilli, S. da S., Santos, P.C., Marinho, C.S. (2011) Substratos e Osmocote® na nutrição e desenvolvimento de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Vitória. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33(n. spe1):672-679.
- Freitas, S.J., Santos, P.C., Carvalho, A.J.C., Berilli, S.S., Gomes, M.M.A. (2012) Brassinosteroides e adubação nitrogenada no crescimento e estado nutricional de mudas de abacaxizeiro provenientes do seccionamento de caule. *Revista Brasileira de Fruticultura*. Jaboticabal, 34(2):612-618.
- Freitas, S.J., Carvalho, A.J.C. de, Berilli, S.S., Santos, P.C., Marinho, C.S. (2011) Substratos e osmocote® na nutrição e desenvolvimento de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Vitória. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 33(n. spe1):672-679.
- Freitas, S.J., Santos, P.C., Carvalho, A.J.C. de, Berilli, S.S., Gomes, M.M.A. (2012) Brassinosteroides e adubação nitrogenada no crescimento e estado nutricional de mudas de abacaxizeiro provenientes do seccionamento de caule. *Revista Brasileira de Fruticultura*. Jaboticabal, 34(2): 612-618.

- Giannini, J.L., Briskin, D.P. (1987) Proton transport in plasma membrane and tonoplast vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue. *Plant Physiology*. 84(4):613-618.
- Glass, A.D.M., Shaff, J.E., Kochian, L.V. (1992) Studies of the uptake of nitrate in barley. 4. Electrophysiology. *Plant Physiology*, 99(2):456-463.
- Gonçalves, N.B., Carvalho, V.D. de (2000) Características da Fruta. In: Gonçalves, N.B. (Org.) Abacaxi: pós-colheita. *Frutas do Brasil*, Brasília, (5):13-27.
- Grattapaglia, D., Machado, M.A. (1998) Micropropagação. In: Torres, A.C., Caldas, L.S., Buso, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. Brasília: CBAB/Embrapa, p.183- 260.
- Guerra, M.P., Nodari, R.O. (2006) Material didático de apoio à disciplina de Biotecnologia. Disponível em <<http://www.cca.ufsc.br/lfdgv/Apostila.htm>>. Acesso em: 08 maio 2013.
- Hazarika, B.N. (2003) Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science*, 85(12):1704-1712.
- Harper, J.E. (1994) Nitrogen metabolism. In: Boote, K.J., Bennett, J.M., Sinclair, T.R. *Physiology and determination of crop yield*. Madison: ASA/CSSA/SSSA. Chapt.11A. p. 285-302
- Heenkenda, H.M.S (1993). Effect of plant size on sucker promotion in 'Mauritius' pineapple by mechanical decapitation. *Acta Horticulture*, Wageningen, 334:331-336.
- Hungria, M., Campo, R. J., Souza, E.M.S., Pedrosa, F.O. (2010) Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and Soil*, Netherlands, 331(1/2):413-425.
- IBGE (2013) Sistema IBGE. <http://www.sidra.ibge.gov.br>. em 27/03/2013 página mantida pelo IBGE.
- Jahn T, Baluska F., Michalke W., Harper J., Volkmann D. (1998) Plasma membrane H⁺-ATPase in the root apex: Evidence for strong expression in xylem parenchyma

and asymmetric localization within cortical and epidermal cells. *Physiologia Plantarum*, 104:311-316.

Janicka-Russak, M. Plant plasma membrane H⁺ -ATPase in adaptation of plants to abiotic stresses. In: Abiotic stress response in plants - physiological, biochemical and genetic perspectives. 1. ed. Shanker, A. (ed.). Intech, p. 197-218.

Johnson, M.O. (1935). *The pineapple*. Paradise, Honolulu: [s.n.], 306p.

Kanashiro, S. (2005). *Nitrogênio, Fósforo, Potássio, Cálcio e o crescimento de plântulas de Aechmea blanchetiana* (BAKER) L. B. Smith in vitro. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Kennedy, I.R., Choudhury, A.T.M.A., Kecskés, M.L. (2004) Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: Can their potential for plant growth promotion be better exploited. *Soil Biology and Biochemistry*, Elmsford, 36 (8):1229–1244.

Leonardo, F.A.P., Pereira, W.E., Silva, S.M., Costa, J.P. Teor de clorofila e índice SPAD no abacaxizeiro cv. Vitória em função da adubação nitrogenada. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 35(2):377-383.

Logan, H., Basset, M., Véry, A.A., Setenec, H. (1997) Plasma membrane transport systems in higher plants: from black boxes to molecular physiology. *Physiology. Plant*. 100:1.

Machado, A.T., Sodek, L., Döbereiner, J., Reis, V.M. (1998) Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com bactérias diazotróficas no comportamento bioquímico da cultivar de milho Nitroflint. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 33:961-970.

Malavolta, E., Vitti, G.C., Oliveira, S.A. (1997) *Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações*. Potafos, Piracicaba, 319 p.

Malézieux, E., Bartholomew, D.P. (2003) Plant nutrition. In: Bartholomew, D.P., Paul, R.E., Rohrbach, K.G. *The pineapple: botany, production and uses*. Honolulu, cab, 143-165p.

- Matos, A.P. de, Cabral, J.R.S. (2005) *Manejo integrado da fusariose do abacaxizeiro*. Cruz das Almas: Embrapa-CNPMF, 2005. 2p. (Embrapa-CNPMF, Abacaxi em Foco n. 32).
- Matos, A.P. de., Reinhardt, D.H., Sanches, N.F., Souza, F.S., Teixeira, F.A., Elias Júnior, J., Gomes, D. C. (2009) *Produção de Mudanças Sadias de Abacaxi*. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p.89.
- Mifflin, B.J., Lea, P.J. (1976) The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochemistry*, New York, 15: 873-885.
- Moraes, A.M., Almeida, F.A.C., Bruno, R.L.A., Filho, J.C., Nunes, S.T., Gomes, J. P. (2010) Micropropagação de abacaxizeiro cv. Emepa 1. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, 14(9):932–936.
- Moreira, M.A., Carvalho, J.G., Pasqual, M., Fráguas, Fráguas, C.B.; Silva, A.B. (2006) Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, MG, 30(5):875-879.
- Morsomme P., Boutry M., (2000) The plant plasma membrane H⁺-ATPase: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta* 1465:1-16.
- Murashige, J.R., Skoog, F.A. (1962) Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, 15:473-497.
- Olivares, F.L., (2009) Bactérias promotoras de crescimento vegetal. Boletim Informativo da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Campinas. 33-34 p.
- Olivares, F.L., Ferreira, F.P., Silva, L.G., Façanha, A.R., Ramos, A.C., Netto, A. T., Campostrini, E., Reis, V.M., Miguens, F.C. (2002) Physiological changes induced on the host plant during the endophytic interaction between sugar cane and diazotrophic bacteria. In: *International symposium on nitrogen fixation with non-legumes, 9th.*, Leuven, Belgium. Book of abstracts. Leuven: Katholieke Universiteit / Centre of Microbial and Plant Genetics, 38-39p.
- Padmanaban, S., Lin, X., Perera, I., Kawamura, Y., Sze, H. (2004) Differential expression of vacuolar H⁺-ATPase subunit c genes in tissues active in

membrane trafficking and their roles in plant growth as revealed by RNAi. *Plant Physiology*, 134:1514-1526.

Parets-Soler, A., Pardo, J.M., Serrano, R. (1990) Immunolocalization of plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiology*, 93:1654-1658.

Pasqual, M., Moreira, M.A., Sobrinho, A.A. (1998) Biotecnologia aplicada à produção de mudas de abacaxi. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, 19(195): 20-23.

Paula, M.B. de., Mesquita, H.A. de., Nogueira, F.D.(1998) Nutrição e Adubação do Abacaxizeiro. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, 19(195):33-39.

Peters, J.B. (2005). Wisconsin Procedures for Soil Testing, Plant Analysis and Feed & Forage Analysis: Plant Analysis. Department of Soil Science, College of Agriculture and Life Sciences, University of Wisconsin-Extension, Madison, WI. http://uwlab.soils.wisc.edu/files/procedures/plant_icp.pdf acesso em 10 de março de 2012.

Py, C. (1969) *La Piña Tropical*, Barcelona: Blume, 228p.

Py, C., Lacoeyllhe, J.J., Teisson, C. (1984) *L'ananás: sa culture, sés produits*. Paris: Maisonneuve et Larose, 537p.

Py, C., Lacoeyllhe, J.J., Teisson, C. (1987) *The pineapple: cultivation and uses*. G.P. Maisonneuve et Larose, Paris, 568p.

Ramalho, A.R., Junior, J.R.V., Fernandes, C.F., Rocha, R.B., Marcolan, A.L., Cassaro, J.D. (2009) Características das cultivares de abacaxizeiros cultivadas no estado de Rondônia. Embrapa, www.cnpmf.embrapa.br/planilhas/Abacaxi_Brasil_2009.pdf, 23.02.2012

Ramos, A.C. (2005) *Papel da dinâmica do fluxo de prótons na sinalização das diferentes fases da Interação micorrízica arbuscular*. Tese (Doutorado Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro- UENF, 107p.

Ramos, A.C., Martins, M.C., Façanha, A.R. (2005) Atividade ATPásica e pirofosfatásica em microsomos de raízes de milho colonizadas com fungos

micorrízicos arbusculares. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa-MG, 29(2):207-213.

Ramos, M.J.M., Monnerat, H.P., Carvalho, A.J.C. de, Pinto, J.L.A., Silva, J.A. (2009) Sintomas visuais de deficiência de macronutrientes e de boro em abacaxizeiro 'Imperial'. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 3(1):252-256.

Ramos, M.J.M., Monnerat, H.P., Carvalho, A.J.C., Pinto, J.L.A., Silva, J. A. (2009) Sintomas visuais de deficiência de macronutrientes e de boro em abacaxizeiro 'Imperial'. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 3(1):252-256.

Ramos, M.J.M., Monnerat, P.H., Pinho, L.G. R., Silva, J.A. (2011) Deficiência de macronutrientes e de boro em abacaxizeiro 'Imperial': composição mineral. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 33(1):261-271.

Ramos, M.J.M., Monnerat, P.H., Pinho, L.G.R. (2013) Leitura SPAD em abacaxizeiro imperial cultivado em deficiência de macronutrientes e de boro. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 35(1):277-281.

Rayle, D.L., Cleland, R.E. (1992) The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology*, Rockville, 99:1271-1274.

Rea, P.A., Kim, Y., Sarafian, V., Poole, R.J., Davies, J.M., Sanders, D. (1992) Vacuolar H⁺ - traslocating pyrophosphatases: a new category of ion traslocase. *Trends Biochem Sci* 17:348-353.

Rea, P.A., Sanders, D. (1987) Tonoplast energization: Two H⁺ pumps, one membrane. *Physiologia Plantarum* 71:131-1

Read, P. E., Fellman, C. D. (1985) Accelerating acclimation of in vitro propagated woody ornamentals. *Acta Horticulturae, Wageningen*, 166:15-20.

Reinhardt, D.H.R.C., Cunha, G.A.P. (1999). Métodos de Propagação. In: Cunha, J.R.S., Souza, L.F.S. *O Abacaxizeiro. Cultivo, Agroindústria e Economia*. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, p.105-138.

Reinhardt, D.H.R.C., Cunha, G.A.P., (1981) Método de produção de mudas de abacaxi livres de fusariose I. Comportamento de sementeira e viveiro. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 6., Recife. *Anais...* Recife: SBF, 173-192

- Reis Junior, F.B., Silva, M.F., Teixeira, K.R.S., Urquiaga, S., Reis, V.M. (2004) Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa-MG, 28:103-113.
- Ribeiro, D.G., Vasconcellos, M.A.S., Araújo, A.P.(2011) Contribuição do sistema radicular de mudas micropropagadas na absorção de nitrogênio de abacaxizeiro cultivar Vitória. *Revista Brasileira Fruticultura*, Jaboticabal, 33(4):1240-1250.
- Rodda, M.R.C., Canellas, L.P., Façanha, A.R., Zandonadi, D.B., Guerra, J.G.M.; Almeida, D.L.; Santos, G.A. (2006) Estímulo no crescimento e na hidrólise de ATP em raízes de alface tratadas com humatos de vermicomposto. II - efeito da concentração. *Revista Brasileira Ciência do Solo*, Viçosa-MG, 30:649-656.
- Rodrigues, A.A., Mendonça, R.M.N., Silva, A.P., Silva, S.M., Pereira, W.E.(2010) desenvolvimento vegetativo de abacaxizeiros 'Pérola' e 'Smooth cayenne' no estado da Paraíba. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 32:126-134.
- Rohrbach, K.G., Leal, F., D'eeckenbrugge, G.C. (2003) History, distribution and world production. In: Bartholomew, D.P., Paul, R.E., Rohrbach, K.G. (2003). *The Pineapple: botany, production and uses*. Honolulu: CAB, cap. 1, p.1-12.
- Santos, P.C. dos, Freitas, M.S.M., Freitas, S. de J., Silva, M.P.S. da, Berilli, S. da S. (2011) Fungos micorrízicos no crescimento e nutrição de rebentos oriundos de coroa de abacaxi. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 33(n. spe1):658-665.
- Schroeder, J.I., Allen, G.J., Hugouvieux, V., Kwak, J. M., Waner, D. (2001) Guard cell signal transduction. *Ann. Plant Physiology. Plant Mol. Biol.*, 52:627-658.
- Serrano R (1990) The plant plasma membrane-structure, function and molecular biology. (Larsson, C.; Moller, I.M.), Springer-Verlag, Berlim, Heidelberg 127-153.
- Serrano, R. (1989) Structure and finction of plasma membrane ATPase. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 40(1):61-94.
- Silva, A.L.P., Silva, A.P., Souza, A.P., Santos D., Silva, S.M., Silva, V.B (2012). Resposta do abacaxizeiro 'Vitória' a doses de nitrogênio em solos de tabuleiros

- costeiros da Paraíba. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, MG, 36:447-456.
- Soares, S.A.G., Mariano, R.L.R., Cavalcante, U.M.T., Maia, L.C. (2009) Efeito de bactérias na germinação de fungos micorrízicos arbusculares e coinoculação em mudas de abacaxizeiro. *Revista Caatinga*, Mossoró, 22(2):31-38.
- Souza Júnior, E.E., Barboza, S.B.S.C., Souza, L.A.C. (2001) Efeitos de substratos e recipientes na aclimatação de plântulas de abacaxizeiro [*Ananas comosus* (L.) Merrill] cv. Pérola. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, Goiânia, 31(2):147-151.
- Souza, L.F. da S. (1999) Correção da acidez e adubação. In: Cunha, G.A.P. da, Cabral, J.R.S., Souza, L.F. da S. (orgs.) *O abacaxizeiro, Cultivo, agroindústria e economia*. Brasília: Embrapa comunicação para transferência de Tecnologia, p.169-202.
- Spironello, A., Quaggio, J.A., Teixeira, L.A.J., Furlani, P.R., Sigrist, J.M.M. (2004) Pineapple yield and fruit quality effected by NPK fertilization in a tropical soil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 26(1):155-159.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2009) *Fisiologia vegetal*. 4.ed. Porto Alegre: Artmed. 819p.
- Tapia-Hernández, A., Bustillos-Cristales, M.R., Jiménez-Salgado, T., Caballero-Mellado, J., Fuentes-Ramírez, L.E. (2000) Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. *Microbial. Ecol.*, 39:49-55.
- Teixeira, J.B., Cruz, A.R.R., Ferreira, F.R., Cabral, J.R. (2001) Biotecnologia aplicada à produção de mudas: produção de mudas micropropagadas de abacaxi. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, 3:42-47.
- Ventura, A.J., Cabral, J.R.S., Matos, A.P., Costa, H. (2006) 'Vitória', cultivar de abacaxi resistente à fusariose. Vitória: INCAPER. (Documentos nº 148)
- Ventura, J.A., Costa, H., Caetano, L.C.S. (2009) Abacaxi 'Vitória': Uma cultivar resistente à fusariose. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 31(4): 931-123.
- Weber, O.B., Baldani, J.I., Döbereiner, J. (2000) Bactérias Diazotróficas em Mudas de Bananeira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília, 35(11): 2277-2285.

- Weber, O.B., Correia, D., Silveira, M.R.S., Crisóstomo, L. A., Oliveira, E.M., Sá, E. G. (2003) Efeito da bactéria diazotrófica em mudas micropropagadas de abacaxizeiros Cayenne Champac em diferentes substratos. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, 38(6):689-696.
- Weber, O.B., Freire, F.C.O. (2003) *Contribuição de bactérias diazotróficas na cultura da bananeira: perspectivas de utilização na produção integrada*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 29p. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento; n.16
- Weber, O.B., Terao, D., Rocha, L.S., Correia, D., Santos, F.J.S. (2004) Efeito de bactérias diazotróficas na produção de abacaxizeiro 'Cayenne Champac', sob irrigação, em dois níveis de adubação. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, 26 (2):249-253.
- Zhang, A., Jiang, M., Zhang, J., Tan, M., Hu, X. (2006) Mitogen-activated protein kinase is involved in abscisic acid-induced antioxidant defense and acts downstream of reactive oxygen species production in leaves of maize plants. *Plant Physiology*, 141:475-487.

6. APÉNDICE



Figura 1A. Procedimento de inoculação de bactérias diazotróficas por imersão de mudas do abacaxizeiro.



Figura 2A. Etapa de transplântio das mudas do abacaxizeiro 'Vitória'



Figura 3A. Mudanças de abacaxizeiro 'Vitória' no terceiro dia após o transplântio para as bandejas.



Figura 4A. Cabine de isopor utilizada para pulverização da solução contendo ureia em mudas micropropagadas de abacaxizeiro.

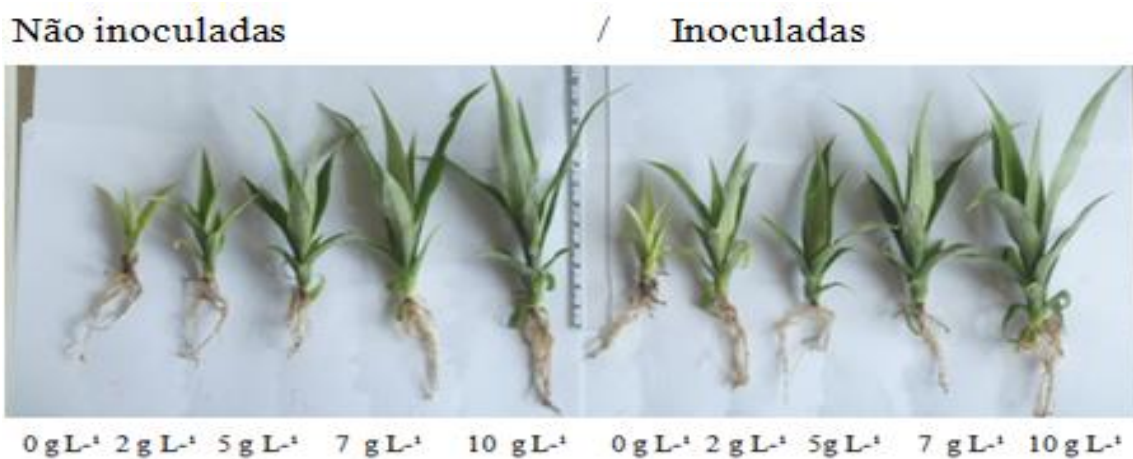


Figura 5A. Vista geral dos tratamentos com mudas não inoculadas e inoculadas com bactérias diazotróficas em diferentes doses de adubação nitrogenada aos 90 dias de aclimatização no experimento com mudas de abacaxizeiro 'Vitória'.

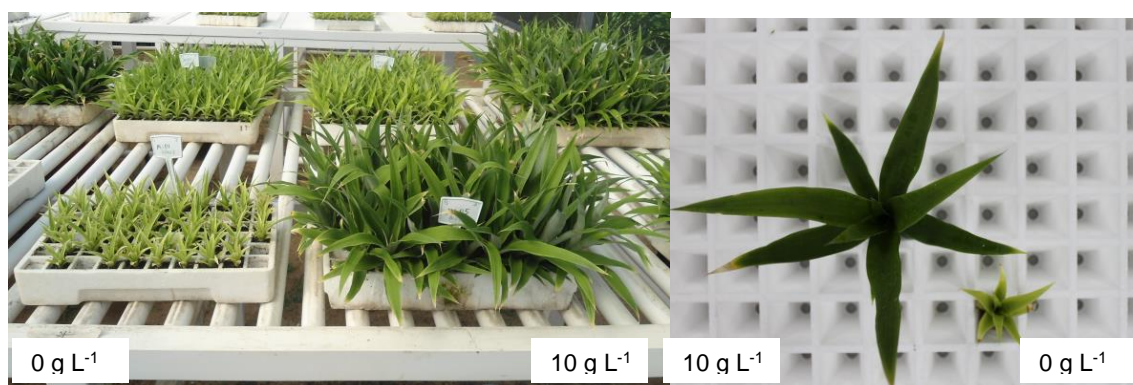


Figura 6A. Vista geral do experimento com mudas de abacaxizeiro 'Vitória' submetidas aos tratamentos 0 e 10 g L⁻¹ com adubação nitrogenada, aos 150 dias de aclimatização.

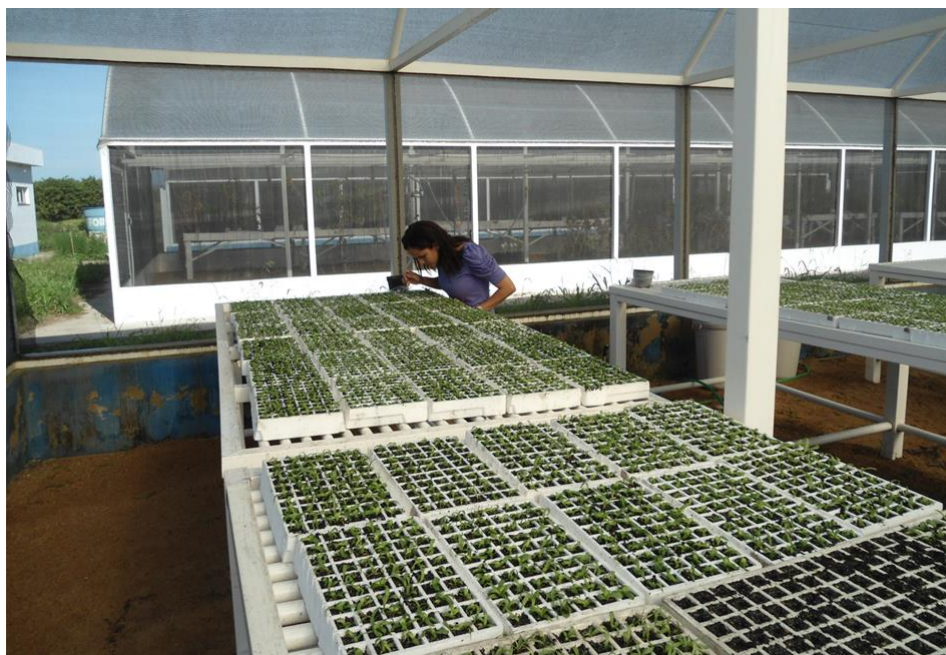


Figura 7A. Vista geral do experimento na semana de plantio das mudas micropropagadas de abacaxizeiro 'Vitória' em Campos dos Goytacazes-RJ.



Figura 8A. Vista geral do experimento aos 150 dias de aclimatização das mudas micropropagadas de abacaxizeiro 'Vitória' em Campos dos Goytacazes-RJ.