

ANÁLISE DE MUDAS DE ABACAXIZEIRO 'VITÓRIA' INOCULADO  
COM BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL  
SUBMETIDAS A ESTRESSE HÍDRICO DURANTE ACLIMATIZAÇÃO

**JEFFERSON RANGEL DA SILVA**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
FEVEREIRO – 2014

ANÁLISE DE MUDAS DE ABACAXIZEIRO 'VITÓRIA' INOCULADO  
COM BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL  
SUBMETIDAS A ESTRESSE HÍDRICO DURANTE ACLIMATIZAÇÃO

**JEFFERSON RANGEL DA 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

Orientadora: D. Sc. Alena Torres Netto

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
FEVEREIRO – 2014

ANÁLISE DE MUDAS DE ABACAXIZEIRO 'VITÓRIA' INOCULADO  
COM BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL  
SUBMETIDAS A ESTRESSE HÍDRICO DURANTE ACLIMATIZAÇÃO

**JEFFERSON RANGEL DA 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

Aprovada em 21 de fevereiro de 2014

Comissão Examinadora

---

Prof. Fábio Lopes Olivares (D.Sc., Agronomia) – UENF

---

Prof. Anderson Lopes Peçanha (D.Sc., Produção Vegetal) – UFES

---

D. Sc. Tiago Massi Ferraz (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF

---

D. Sc. Alena Torres Netto (D.Sc., Produção Vegetal) – UENF  
(Orientadora)

## AGRADECIMENTO

Agradeço primeriamente a Deus.

À minha família, em especial aos meus pais, pelo amor incondicional e pelo apoio, sem medir esforços, para que eu pudesse concluir essa etapa.

Aos amigos do setor de Fisiologia Vegetal e do Nudiba, pela ajuda na execução dos trabalhos, em especiais à Bruna Pintor, Bruna de Deus, Daniel, Fábio, Marcus Vinícius, Tiago e Validoro.

Aos demais amigos: Álvaro, Ana Paula, Caroline, Cássia, Nathália, Rafaela, Leonardo, Marcelo e Tarcisio, pelo companheirismo nesse período.

Aos Professores Fábio Olivares e Eliemar Campostrini, que abriram as portas dos seus respectivos setores e permitiram que eu realizasse o meu trabalho.

À Alena, minha orientadora desde a iniciação científica, pela amizade, compreensão e ensinamentos, que foram fundamentais pro meu desenvolvimento.

Ao professor Carlos Resende e a todo Grupo de Biogeoquímica de Ecossistemas Aquáticos - Laboratório de Ciências Ambientais – UENF, que foram responsáveis pelas análises da Composição Isotópica do Carbono.

À BioMudas, em especial ao Marcos Athayde, pelo fornecimento das mudas.

À CAPES, pela concessão da bolsa.

À UENF e ao Programa de Pos Graduação em Produção Vegetal.

## SUMÁRIO

	Pág
SUMÁRIO.....	lii
Lista de Quadros .....	V
Lista de Figuras.....	Vii
Lista de Símbolos, Abreviaturas e Nomenclaturas.....	Xii
RESUMO.....	Xv
ABSTRACT.....	Xvii
1-INTRODUÇÃO.....	1
2-REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1-A cultura do Abacaxizeiro.....	4
2.1.1-Importância Econômica.....	5
2.1.2-Exigências Climáticas.....	6
2.1.3-Exigências Edáficas e Nutricionais.....	7
2.1.4-Cultivares.....	8
2.1.4.1- Características da cv. Vitória.....	9
2.1.5-Métodos de Propagação.....	9
2.1.5.1-Micropropagação.....	10
2.1.6-Aspectos Fisiológicos: Metabolismo Ácido das Crassuláceas – “Crassulacean Acid Metabolism” (CAM).....	13
2.1.6.1- Importância da Irrigação na Aclimatização.....	16
2.1.6.1.1-Estresse hídrico.....	16
2.1.6.1.1.1-Efeitos Fisiológicos.....	17

2.2-Discriminação Isotópica do Carbono.....	22
2.3-Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal.....	24
2.3.1- Bactérias Endofíticas.....	26
2.3.1.1-Os gêneros <i>Herbaspirillum</i> e <i>Burkholderia</i> .....	27
2.3.1.2-Efeitos das BPCV na tolerância de plantas à condição de estresse.....	28
3-MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1-Localização.....	30
3.2-Material Vegetal.....	30
3.3-Crescimento Bacteriano, Transplântio e Inoculação.....	30
3.4-Tratamentos.....	32
3.5-Condições de Cultivo e Aplicação da Restrição Hídrica.....	33
3.6-Contagem Bacteriana.....	36
3.7-Métodos Empregados para a Caracterização da Promoção do Crescimento Vegetal.....	37
3.7.1-Análises destrutivas.....	37
3.8-Avaliação Nutricional.....	38
3.9-Métodos Empregados para Determinar a Capacidade Fotossintética.....	38
3.10-Densidade Estomática, Diâmetro e Comprimento do Poro Estomático.....	40
3.11-Determinação da Composição Isotópica do Carbono.....	40
3.12-Delineamento Estatístico.....	41
4-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1-Contagem Bacteriana.....	42
4.2-Characterização da Promoção do Crescimento Vegetal.....	48
4.3-Teores de Nutrientes Minerais.....	57
4.4-Capacidade Fotossintética.....	62
4.4.1-Trocas Gasosas.....	62
4.4.2 - Determinação da Composição Isotópica do Carbono.....	73
4.4.3-Rendimento quântico máximo do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) e índice fotossintético “photosynthetic index” (PI).....	77
4.4.4-Intensidade de Verde.....	82
4.5-Densidade Estomática, Diâmetro e Comprimento do Poro Estomático....	84
5-RESUMO E CONCLUSÕES.....	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

## LISTA DE QUADROS

	Pág
Quadro 1. Características Biométricas das mudas no dia do transplântio, aos 60 dias de aclimatização.....	31
Quadro 2. Análise Química do substrato comercial Vivatto® .....	31
Quadro 3. Tratamentos.....	33
Quadro 4. Contagem do Número Mais Provável (NMP) de bactérias diazotróficas em um grama de raiz do abacaxizeiro 'Vitória' 24 horas após a inoculação bacteriana dos respectivos tratamentos. C – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias; B1 – Tratamento com inoculação de <i>Burkholderia silvatlantica</i> UENF117111; B2 – Tratamento com inoculação de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> HRC54.....	43
Quadro 5. Contagem do Número Mais Provável (NMP) de bactérias diazotróficas em um grama de raiz do abacaxizeiro 'Vitória' no dia de estresse máximo, 24 dias após o início da imposição da Restrição Hídrica. C – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias; CRH – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias e submetido ao estresse hídrico; B1 – Tratamento com inoculação de <i>Burkholderia silvatlantica</i> UENF117111; B1RH – Tratamento com inoculação de <i>Burkholderia silvatlantica</i> UENF117111 e submetido ao estresse hídrico; B2 – Tratamento com inoculação de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> HRC54; B2RH – Tratamento com inoculação de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> HRC54 e submetido ao estresse hídrico.....	47

Quadro 6. Densidade Estomática, Comprimento do Poro Estomático e Largura Central do Poro Estomático nas folhas de abacaxizeiro 'Vitória' submetido aos respectivos tratamentos no dia do estresse máximo, 24 dias após o início da imposição da restrição hídrica. Cada valor de Densidade Estomática representa a média de 5 repetições. Para os dois outros parâmetros, os valores representam a média de 15 repetições. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente, segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade. C – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias; CRH – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias e submetido ao estresse hídrico; B1 – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111; B1RH – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111 e submetido ao estresse hídrico; B2 – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54; B2RH – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 e submetido ao estresse hídrico.....

86

## LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Representação esquemática e classificação das folhas de abacaxizeiro ( <i>Ananas comosus</i> ) de acordo com a posição na planta e seu formato (Fonte: Py,1969) .....	5
Figura 2. Inoculação das Bactérias.....	32
Figura 3. Fluxo de Fótons Fotossintéticos - FFF (A), temperatura (B), umidade relativa (C) e Déficit de Pressão de Vapor do ar - DPV (D) durante o período experimental. As setas indicam o início da imposição da restrição hídrica e os asteriscos indicam o dia em que foi feita a reirrigação.....	35
Figura 4. Percentual de Umidade do substrato irrigado e sob restrição hídrica ao longo do período de imposição do estresse. A seta indica o início da imposição da restrição hídrica e o asterisco indica o dia em que foi feita a reirrigação.....	36
Figura 5. Altura da planta (A) e Diâmetro da roseta (B) do abacaxizeiro 'Vitória' submetido aos respectivos tratamentos no tempo zero (antes da submissão ao estresse hídrico), 120 dias após a inoculação. Cada coluna representa média de 15 repetições. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente na mesma data, segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade. C – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias; B1 – Tratamento com inoculação de <i>Burkholderia silvatlantica</i> UENF117111; B2 – Tratamento com inoculação de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> HRC54....	49
Figura 6. Altura da planta (A) e Diâmetro da roseta (B) do abacaxizeiro 'Vitória' submetido aos respectivos tratamentos, no estresse máximo (24 dias após a suspensão da irrigação). Cada coluna representa média de 15 repetições. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente	

na mesma data, segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade. C – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias; CRH – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias e submetido ao estresse hídrico; B1 – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111; B1RH – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111 e submetido ao estresse hídrico; B2 – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54; B2RH – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 e submetido ao estresse hídrico..... 52

Figura 7. Massa Seca de Raiz (MSR) do abacaxizeiro ‘Vitória’ submetido aos respectivos tratamentos no dia do estresse máximo (24 dias após a suspensão da irrigação). Cada coluna representa média de 10 repetições. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente, segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade. C – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias; CRH – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias e submetido ao estresse hídrico; B1 – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111; B1RH – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111 e submetido ao estresse hídrico; B2 – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54; B2RH – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 e submetido ao estresse hídrico..... 54

Figura 8. Teores foliar de Nitrogênio (A), Potássio (B), Fósforo (C), Cálcio (D) e Magnésio (E) do abacaxizeiro ‘Vitória’ submetidos aos respectivos tratamentos, no dia do estresse máximo (24 dias após a suspensão da irrigação). Cada coluna representa média de 3 repetições. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente, segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade. C – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias; CRH – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias e submetido ao estresse hídrico; B1 – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111; B1RH – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111 e submetido ao estresse hídrico; B2 – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54; B2RH – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 e submetido ao estresse hídrico..... 60

Figura 9. Valores matinais da: taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (B), transpiração (C) e déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar (D) do abacaxizeiro ‘Vitória’ submetido aos respectivos tratamentos. Cada símbolo representa média de 4 repetições. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente na mesma data, segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade. As setas indicam o momento da reirrigação. C – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias; CRH – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias e submetido ao estresse hídrico; B1 – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111; B1RH – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111 e submetido ao estresse hídrico; B2 – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54; B2RH – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 e submetido ao estresse hídrico..... 63

Figura 10. Valores noturnos da: taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (B), transpiração (C) e déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar (D) do abacaxizeiro 'Vitória' submetido aos respectivos tratamentos. Cada símbolo representa média de 4 repetições. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente na mesma data, segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade. As setas indicam o momento da reirrigação. C – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias; CRH – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias e submetido ao estresse hídrico; B1 – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111; B1RH – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111 e submetido ao estresse hídrico; B2 – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54; B2RH – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 e submetido ao estresse hídrico..... 70

Figura 11. Composição isotópica do carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) do abacaxizeiro 'Vitória' submetido aos respectivos tratamentos no dia do estresse máximo (24 dias após a suspensão da irrigação). Cada coluna representa a média de 3 repetições. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente na mesma data, segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade. C – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias; CRH – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias e submetido ao estresse hídrico; B1 – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111; B1RH – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111 e submetido ao estresse hídrico; B2 – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54; B2RH – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 e submetido ao estresse hídrico..... 74

Figura 12. Composição isotópica do carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) do abacaxizeiro 'Vitória' submetido aos respectivos tratamentos dois dias após a reirrigação. Cada coluna representa a média de 3 repetições. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente na mesma data, segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade. C – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias; CRH – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias e submetido ao estresse hídrico; B1 – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111; B1RH – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111 e submetido ao estresse hídrico; B2 – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54; B2RH – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 e submetido ao estresse hídrico..... 76

Figura 13. Eficiência quântica máxima do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) do abacaxizeiro 'Vitória' submetido aos respectivos tratamentos. Cada símbolo representa média de 4 repetições. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente na mesma data, segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade. A seta indica o momento da reirrigação. C – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias; CRH – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias e submetido ao estresse hídrico; B1 – Tratamento

com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111; B1RH – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111 e submetido ao estresse hídrico; B2 – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54; B2RH – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 e submetido ao estresse hídrico..... 78

Figura 14. Índice Fotossintético “photosynthetic index” (PI) do abacaxizeiro ‘Vitória’ submetido aos respectivos tratamentos. Cada símbolo representa média de 4 repetições. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente na mesma data, segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade. A seta indica o momento da reirrigação. C – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias; CRH – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias e submetido ao estresse hídrico; B1 – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111; B1RH – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111 e submetido ao estresse hídrico; B2 – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54; B2RH – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 e submetido ao estresse hídrico..... 81

Figura 15. Intensidade de Verde do abacaxizeiro ‘Vitória’ submetido aos respectivos tratamentos. Cada símbolo representa média de 4 repetições. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente na mesma data, segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade. A seta indica o momento da reirrigação. C – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias; CRH – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias e submetido ao estresse hídrico; B1 – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111; B1RH – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111 e submetido ao estresse hídrico; B2 – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54; B2RH – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 e submetido ao estresse hídrico..... 83

Figura 16. Microscopia Eletrônica de Varredura, ilustrando a densidade estomática em abacaxizeiro ‘Vitória’ submetido aos diferentes tratamentos. (A) Tratamento C - Tratamento controle, sem aplicação de bactérias, (B) Tratamento CRH; – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias e submetido ao estresse hídrico (C) Tratamento B1 - Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111; (D) Tratamento B1RH - Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111 e submetido ao estresse hídrico; (E) Tratamento B2 - Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54e (F) Tratamento B2RH - Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 e submetido ao estresse hídrico..... 89

Figura 17. Microscopia eletrônica de Varredura, ilustrando a abertura estomática em abacaxizeiro ‘Vitória’ submetido aos diferentes tratamentos. . (A) Tratamento C - Tratamento controle, sem aplicação de bactérias, (B) Tratamento CRH; – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias e submetido ao estresse hídrico (C) Tratamento B1 - Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111; (D) Tratamento

B1RH - Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111 e submetido ao estresse hídrico; (E) Tratamento B2 - Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54e (F) Tratamento B2RH - Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 e submetido ao estresse hídrico..... 90

## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E NOMENCLATURAS

$\delta^{13}\text{C}$ : Composição isotópica do carbono

$^{12}\text{C}$ : Isótopo de Carbono com energia de excitação igual a 12

$^{13}\text{C}$ : Isótopo de Carbono com energia de excitação igual a 13

A: Taxa fotossintética líquida

ABA: Ácido abscísico

ABA<sup>-</sup>: Ácido abscísico dissociado

ABAH: Ácido abscísico protonado

ACC: 1-aminociclopropano -1-carboxilato

AIA: ácido-indol acético

A<sub>manhã</sub>: Taxa fotossintética líquida mensurada pela manhã

A<sub>noite</sub>: Taxa fotossintética líquida mensurada à noite

ATP: Adenosina trifosfato

B1: Tratamento inoculado com a bactéria *Burkholderia silvatlantica* UENF11711

B1RH: Tratamento inoculado com a bactéria *Burkholderia silvatlantica* UENF11711 e submetido ao estresse hídrico

B2: Tratamento inoculado com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* HRC54

B2RH: Tratamento inoculado com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 e submetido ao estresse hídrico

BPCV: Bactéria Promotora do Crescimento Vegetal

C: Tratamento Controle

Ca: Cálcio elementar

CAM: Metabolismo Ácido das Crassuláceas

CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono  
CRA: Capacidade de Retenção de Água  
CRH: Tratamento Controle submetido ao estresse hídrico  
DPV: Déficit de pressão de vapor  
DPV<sub>folha-ar</sub>: Déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar  
DPV<sub>folha-ar manhã</sub>: Déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar mensurado pela manhã  
DPV<sub>folha-ar noite</sub>: Déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar mensurado à noite  
E: Transpiração  
E<sub>manhã</sub>: Transpiração mensurada pela manhã  
EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
E<sub>noite</sub>: Transpiração mensurada à noite  
ERO: Espécie Reativa de oxigênio  
FBN: Fixação Biológica de Nitrogênio  
FFF: Fluxo de fótons fotossintéticos  
Folha D: Folha D que forma um ângulo de 45° entre o nível do solo e um eixo imaginário que passa pelo centro da planta  
F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>: Rendimento quântico máximo do fotossistema II  
g<sub>s</sub>: Condutância estomática  
g<sub>s</sub><sub>manhã</sub>: condutância estomática mensurada pela manhã  
g<sub>s</sub><sub>noite</sub>: condutância estomática mensurada à noite  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de Hidrogênio  
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
INCAPER: Instituto Capixaba de Pesquisa e Extensão Rural  
IRGA: Analisador de gás a infravermelho  
JMV: Meio de cultura para crescimento de bactérias do gênero *Burkholderia*  
JNFb: Meio de cultura para crescimento de bactérias do gênero *Herbaspirillum*  
K: Potássio elementar  
N<sub>2</sub>: Nitrogênio atmosférico  
N: Nitrogênio elementar  
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato desidrogenase  
NH<sub>3</sub>: Amônia  
NMP: Número Mais Provável  
MDH: Malato desidrogenase

Mg: Magnésio elementar  
MSPA: Massa seca da parte aérea  
MSR: Massa seca das raízes  
O<sub>2</sub>: Oxigênio  
OAA: Oxaloacetato  
P: Fósforo elementar  
pa: Concentração de CO<sub>2</sub> do ar  
PDB: Padrão “Pee Dee Belemnite” para determinação da composição isotópica do carbono  
PEP: Fosfoenol-piruvato  
PEPC: Fosfoenol-piruvato carboxilase  
pH: Potencial hidrogeniônico  
PI: Índice fotossintético (do inglês, “Photosynthetic index”)  
pi: Taxa de CO<sub>2</sub> intercelular  
PSII: Fotossistema II  
QA: Quinona A  
Rb é a relação <sup>13</sup>C/ <sup>12</sup>C do padrão PDB  
Rs: relação <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C da amostra (“Pee Dee Belemnite”)  
Rubisco: Ribulose-1,5-Bisfosfato Carboxilase-Oxigenase  
RuBP: Ribulose 1,5 Bisfosfato  
SOD: superóxido dismutase  
T0: Início da imposição do estresse hídrico  
T°: Temperatura em graus Celsius  
UR: Umidade relativa

## RESUMO

SILVA, Jefferson Rangel da; M.Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; fevereiro 2014; **Análise de mudas de abacaxizeiro 'vitória' inoculado com bactérias promotoras do crescimento vegetal submetidas a estresse hídrico durante aclimatização**; Orientadora: D. Sc. Alena Torres Netto

O objetivo desse trabalho foi estudar respostas ecofisiológicas e de promoção do crescimento resultantes da interação das BPCV no abacaxizeiro 'Vitória' submetido ao estresse hídrico durante aclimatização. O experimento foi constituído de: tratamentos com inoculação de bactérias *Burkholderia silvatlantica* (B1) e *Herbaspirillum seropedicae* (B2) irrigados e com restrição hídrica total (B1RH e B2RH), e tratamentos controle sem bactérias (com restrição hídrica - CRH e sem restrição hídrica -C). Depois de 24 horas da inoculação bacteriana e ao final do experimento, realizou-se a contagem do Número Mais Provável de bactérias diazotróficas associadas às raízes das plantas. Após 120 dias de adaptação das mudas, foram impostas as restrições hídricas (T0), e foram avaliadas a cada 4 dias, as trocas gasosas (pela manhã e à noite), a fluorescência da clorofila a, e a intensidade de verde. As avaliações foram realizadas até quando se atingiram valores de taxa fotossintética líquida próxima de zero pela manhã (estresse máximo), momento este em que foi feita a reirrigação dos tratamentos, e então as mesmas avaliações foram realizadas 48 horas depois. Foram realizadas: análises biométricas, teor de nutrientes foliares, discriminação isotópica do carbono e observação dos estômatos por microscopia eletrônica de varredura. Apesar da existência de elevada população de bactérias

diazotróficas associadas naturalmente às plantas, foi possível observar que a inoculação das duas bactérias foi efetiva. O estresse hídrico causou redução no NMP dos tratamentos controle (com uso do meio JNFb) e contendo B2, entretanto os tratamentos inoculados mantiveram uma maior população do que os controles. Não foram observadas diferenças significativas em relação ao teor de nutrientes foliar. A presença de B1 não alterou o crescimento da parte aérea em relação ao controle, mas foi observada uma maior tendência ao crescimento de raiz naqueles tratamentos, mostrados pelos valores de Massa Seca de Raiz, que teve seu padrão alterado em resposta ao estresse, representando um mecanismo de tolerância. B2 apesar de ter promovido efeito negativo no crescimento, induziu tolerância ao estresse hídrico, traduzida pela elevada recuperação da taxa fotossintética líquida após a reirrigação. O tratamento B1RH também apresentou tal recuperação, embora menor, algo não observado para o tratamento CRH. Esse detalhe ficou evidenciado pela tendência a maior discriminação do  $^{13}\text{C}$  no material coletado dois dias após a reirrigação nos tratamentos B1RH e B2RH, que apresentaram médias estatisticamente iguais aos tratamentos irrigados. As trocas gasosas medidas à noite não foram alteradas com os tratamentos. As reduções nas trocas gasosas pela manhã (efeitos estomáticos) foram acompanhadas por efeitos não-estomáticos, mostrados pelos valores de  $F_v/F_m$  e PI, entretanto, houve recuperação nesses parâmetros após a reirrigação. A inoculação de B1 manteve as médias da intensidade de verde do tratamento B1RH estáveis e estatisticamente iguais aos tratamentos irrigados. Por fim, houve alteração na densidade estomática e no comprimento e largura do poro estomático devido à inoculação bacteriana, que alterou o padrão também em resposta ao estresse. Conclui-se que as bactérias utilizadas possuem potencial para uso durante a aclimatização de mudas de abacaxizeiro no sentido de amenizar os efeitos deletérios do estresse hídrico.

Palavras-chave: capacidade fotossintética, metabolismo ácido das crassuláceas, *Ananas comosus*.

## ABSTRACT

SILVA, Jefferson Rangel da; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; fevereiro 2014; **Analysis of pineapple 'Vitória' inoculated with plant growth-promoting bacteria subjected to water stress during acclimatization;** Supervisor: D. Sc. Alena Torres Netto

The aim of this work was to study the ecophysiological and growth promotion effects of the interaction of PGPB with seedlings of micropropagated 'Vitória' pineapple under water stress. The experiment consisted of treatments inoculated with the bacteria *Burkholderia silvatlantica* (B1) and *Herbaspirillum seropedicae* (B2) irrigated and with the total water restriction (B1RH) and (B2RH) and control treatments without bacteria (with water restriction - CRH and no water restriction - C). After 24 h of bacterial inoculation and at the end of the experiment, was determined the Most Probable Number (MNP) of diazotrophic bacteria associated with plant roots. After 120 days of seedlings adaptation, the water restrictions were imposed (T0) and were measured every 4 days, gas exchange (morning and night), chlorophyll a fluorescence and the green leaf intensity. The evaluations were conducted until the net photosynthetic rate reached values close to zero (maximum stress), and at this time it was made the rewatering, so it was repeated the same evaluations 48 hours later. Biometric evaluations, foliar nutrients content, carbon isotope discrimination and stomatal observations by scanning electron microscopy were also performed. Despite the existence of a

large population of diazotrophic bacteria associated naturally to plants, it was observed that inoculation of both bacteria was effective. The water stress caused a reduction in the MNP of bacteria, except for the treatment containing B1, nevertheless, inoculated treatments maintained a higher population than the controls. No significant differences in relation to the content of foliar nutrients were observed. The presence of B1 did not change the pattern of shoot growth compared to control, but there was a tendency to greater root growth in those treatments, showed by the MSR values, which had its pattern changed in response to stress was observed, representing a tolerance mechanism. Despite of promoted negative effect on growth, B2 induced tolerance to water stress, reflected by the high recovery of net photosynthetic rate in response to rewatering. The B1RH treatments also showed a recovery, but smaller, something was not observed to CRH. This detail was evidenced by the tendency to greater discrimination of  $^{13}\text{C}$  in material collected 2 days after re-irrigation in B1RH and B2RH treatments, which had values statistically equal to the irrigated treatments. The gas exchange measurements at night were not changed by treatments. The decreases in net photosynthetic in the morning (stomatal effects) were related with non-stomatal effects, showed by  $F_v/F_m$  and PI values, however, there was recovery in these parameters after re-irrigation. B1 inoculation kept the intensity of green of the B1RH treatment stable and statistically equal to the irrigated ones. There was also differences in the density, length and width of the stomatal pore due the bacterial inoculation, which also changed the pattern in response to stress. Is possible to concluded that the used bacteria have potential for mitigate water stress during the acclimatization of pineapple plants.

Keywords: photosynthetic capacity, crassulacean acid metabolism, *Ananas comosus*.

## 1. INTRODUÇÃO

A cultura do abacaxizeiro é de grande importância para a fruticultura brasileira, sendo o país o segundo maior produtor mundial de frutos (FAO, 2013). Pela adaptabilidade, é considerada uma das culturas mais promissoras da fruticultura brasileira (Reinhardt et al., 2000).

A micropropagação é uma das técnicas de propagação vegetativa que vem ganhando força para a cultura do abacaxi, devido à possibilidade de se obter uma rápida produção de plantas livres de doenças (Pospisilová et al., 1992), demandar menor espaço físico (Grattapaglia e Machado, 1990) e produção de maior quantidade de mudas por unidade de tempo, além de serem geneticamente semelhantes e com características de tamanho uniforme (Hartmann et al., 1990).

Por outro lado, é necessário considerar que os explantes oriundos de cultivo *in vitro* são crescidos em pequenos frascos, com baixa intensidade luminosa, em meio artificial contendo sacarose, sais minerais, vitaminas, reguladores de crescimento, em concentrações mais altas que em condições naturais (Nowak, 1998), além de não permitirem troca de gases (Budden-dorf-Joosten e Woltering, 1994). Esta técnica, apesar das inúmeras vantagens, produz plantas com características peculiares, como estômatos não-funcionais (Ziv et al. 1987; Cassells e Walsh, 1994), baixa atividade foto-autotrófica (Deng e Donnelly, 1993; Pospisilová et al., 1992) e sistema radicular com poucos pelos (Preece e Sutter, 1991). Tais características fazem com que as plantas tenham dificuldade de se adaptar às novas condições, durante a aclimatização. Um dos estresses ao

qual as plantas são submetidas durante essa fase é o estresse hídrico, e este é o responsável por grande parte das perdas que ocorrem com a utilização da micropropagação (Barboza et al., 2006).

O abacaxizeiro, para reduzir as perdas de água em condições de estresse hídrico, pode absorver o CO<sub>2</sub> atmosférico durante a noite, período em que a temperatura está mais amena, realizando a fixação fotossintética do carbono por meio do Metabolismo Ácido das Crassuláceas, do inglês “*Crassulacean Acid Metabolism*” (CAM) (Borland e Griffiths, 1989; Medina et al., 1994; Sayed, 2001; Cushman, 2001).

Apesar de ser uma vantagem na proteção contra o estresse hídrico, o processo é limitado, e a produção dos carboidratos é reduzida, limitando o desenvolvimento das plantas, e conseqüentemente, a fase de aclimatização se torna mais prolongada, onerando o processo. Em condições nas quais as plantas não estejam sofrendo estresse hídrico, a cultura pode fixar o CO<sub>2</sub> por meio apenas do ciclo de Calvin (metabolismo C3), abrindo os estômatos durante o dia, o que melhora seu desenvolvimento (Taiz e Zeiger, 2013).

O uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal pode ser uma alternativa viável nesse sentido, pois podem auxiliar no desenvolvimento de plantas sob condições de estresse, devido ao estímulo a produção de fitohormônios e fixação biológica de nitrogênio, que em conjunto com outras características induzidas por esses micro-organismos, atuam no sentido de reduzir os efeitos negativos que o estresse pode causar no desenvolvimento das plantas (Bashan e Hognin, 1997; Zaided et al., 2003; Potters et al., 2007).

Pouco se sabe sobre os efeitos que as bactérias promotoras de crescimento vegetal impõem sobre a fisiologia das plantas, havendo apenas suposições de que determinados efeitos são consequência de uma melhora na fotossíntese e aumento no conteúdo relativo de água (Creus et al., 2004, Zhang et al., 2008).

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo estudar as respostas: 1. Ecofisiológicas - Trocas gasosas; Fluorescência da clorofila a, Estimativa do conteúdo de clorofila, Composição isotópica do carbono, Densidade, diâmetro e comprimento dos estômatos, 2. Nutricionais e 3. Promoção de crescimento em plantas de abacaxizeiro ‘Vitória’ micropropagadas, submetidas ao estresse hídrico

e inoculadas com as bactérias promotoras do crescimento vegetal *Burkholderia silvatlantica* UENF117111 e *Herbaspirillum seropedicae* HRC54.

Tal investigação visa encontrar respostas a respeito da interação planta-bactéria, no sentido de atenuação dos efeitos deletérios do estresse e melhorar o desenvolvimento das mudas, para que haja embasamento para estudos futuros, os quais possam viabilizar o uso de bioinoculantes em produções comerciais, reduzindo as perdas e os custos de produção de mudas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1- A cultura do abacaxizeiro

De acordo com Py et al. (1984), o abacaxizeiro é originário da região compreendida entre 15° N e 30° S de latitude e 60° W de longitude, o que inclui as zonas central e sul do Brasil, o nordeste da Argentina e o Paraguai.

O abacaxizeiro é uma planta monocotiledônea (Liliopsida), herbácea perene da família *Bromeliaceae*, cujas espécies podem ser divididas em dois grupos distintos, em relação aos seus habitats, sendo consideradas epífitas ou terrestres. Os abacaxis pertencem ao segundo grupo, mais precisamente ao gênero *Ananas*, mesmo apresentando algumas características epífitas, como a capacidade de armazenar água no tecido de suas folhas e também nas axilas (Collins, 1960; Ochse et al., 1961).

O gênero *Ananas* apresenta um fruto do tipo sincarpo, formado pela coalescência dos frutos individuais, das brácteas adjacentes e do eixo da inflorescência (Py, 1969).

Dentro do gênero *Ananas* está contido o abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill) e outras espécies que são utilizadas para produção de fibras ou para ornamentação, abrangendo todas as cultivares plantadas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. O fruto geralmente atinge 15 centímetros de comprimento, tem polpa abundante, sucosa e de sabor agradável, quando atinge a maturação.

Uma característica marcante da espécie é a ausência ou escassez de sementes (Cunha e Cabral, 1999).

Com relação à classificação das folhas, utiliza-se o seu formato e a posição na planta, da mais velha e externa para a mais jovem e interna em A, B, C, D, E e F (Figura 1). A folha D é a mais importante do ponto de vista de manejo da planta, sendo a mais jovem dentre as folhas adultas e metabolicamente a mais ativa de todas, por isso, é a folha utilizada na análise do crescimento e do estudo nutricional da planta. Em geral, a folha D forma um ângulo de 45° entre o nível do solo e um eixo imaginário que passa pelo centro da planta, apresentando os bordos da parte inferior perpendicular à base (Py et al., 1984).

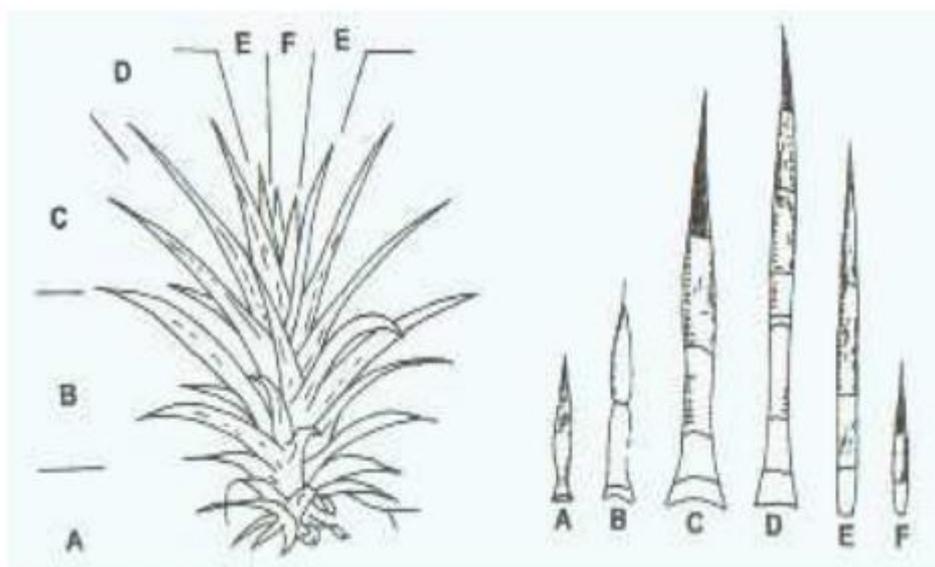


Figura 1. Representação esquemática e classificação das folhas de abacaxizeiro (*Ananas comosus*) de acordo com a posição na planta e seu formato (Fonte: Py, 1969).

#### 2.1.1- Importância econômica

A cultura do abacaxi está amplamente disseminada nos países da região tropical e o Brasil destaca-se como segundo produtor, perdendo apenas para a Tailândia, juntamente com a Costa Rica e as Filipinas. Esses quatro países concentram 43,33% da produção mundial do fruto (FAO, 2013).

No ano de 2013, houve uma produção de 1.697.734 frutos no Brasil, sendo a produção distribuída principalmente nas regiões Nordeste, Sudeste e Norte, 36,18%; 30,58%; e 26,00%, respectivamente. Na região Sudeste, Minas Gerais é o maior produtor, seguido pelo Rio de Janeiro, que teve uma produção de 133.093 frutos em 2012, o que corresponde a 25,39 % da produção da região Sudeste, e a 8,04% da produção nacional (IBGE, 2012).

O fruto não é apreciado apenas pelas propriedades sensoriais, mas também pelo seu valor nutritivo, devido ao seu alto teor de açúcar, vitaminas e minerais, podendo ser utilizado *in natura* ou industrializado, sendo elaborada uma infinidade de subprodutos (Carvalho e Cunha, 1999).

### 2.1.2- Exigências Climáticas

O abacaxizeiro, por ser originário de regiões que se caracterizam por apresentar clima quente e distribuição pluvial bastante irregular, é considerado uma planta rústica e resistente a condições adversas (Cunha, 1999).

O crescimento e o desenvolvimento do abacaxizeiro são bastante influenciados pela temperatura, e a faixa ótima para o crescimento das raízes e das folhas está entre 22°C e 32°C, mais especificamente entre 29° e 32°C (Sanford, 1962). Seu crescimento é bastante reduzido quando temperaturas baixas prevalecem (Green, 1963), pois há uma redução na absorção de nutrientes e na produção (Cunha, 1999).

O abacaxizeiro é mais produtivo em áreas extensivamente ensolaradas, entretanto, não existe uma extensão específica do comprimento do dia para que haja o crescimento ideal e florescimento (Hepton, 2003).

Mesmo em regiões onde a disponibilidade de água é limitada, o abacaxizeiro pode manter bons níveis de produtividade, pois a planta possui um bom aproveitamento da água (Green, 1963). Porém, a deficiência hídrica atrasa o desenvolvimento da planta e do fruto, como também pode ocasionar problemas na diferenciação floral. O ideal é que se forneça em torno de 60 a 100 mm por mês de água para a cultura, em épocas de escassez de chuva (Py, 1969).

Com relação à Umidade Relativa do ar, ocorre um desenvolvimento satisfatório da cultura em valores próximos a 75% (Green, 1963).

### 2.1.3- Exigências Edáficas e Nutricionais

O abacaxizeiro desenvolve um sistema radicular limitado e frágil, que se concentra principalmente nos primeiros 15 a 20 cm da superfície do solo. Por esse fato, exigem solos com boa aeração e drenagem (Souza, 1999). Assim, seu melhor desenvolvimento se dá em solos com textura média (15 a 35% de argila e mais de 15% de areia), sem impedimentos a uma livre drenagem do excesso de água (Souza, 1999). Ainda, a cultura se desenvolve melhor em solos ácidos, com uma faixa de pH que vai de 4,5 a 5,5 (Py et al., 1984).

O bom desenvolvimento das raízes apresenta grande relevância para o cultivo, pois a absorção de água e de elementos minerais depende, em grande parte, da extensão do contato entre as raízes e o solo, sendo que quanto mais numerosas e melhor distribuídas, melhor é a nutrição vegetal (Malavolta, 1980).

O estado nutricional das plantas de abacaxizeiro tem grande influência no crescimento e, conseqüentemente, na qualidade dos frutos e produtividade (Malézieux e Bartholomew, 2003).

Indicadores do estado nutricional de plantas incluem sintomas visuais de deficiência e níveis críticos de nutrientes em tecidos de referência em plantas, sendo no abacaxizeiro esse tecido a folha D, pois é a única que pode ser facilmente identificada e é a folha mais jovem e fisiologicamente madura na planta (Malézieux e Bartholomew, 2003).

O potássio na cultura do abacaxizeiro é considerado o elemento da qualidade. O mesmo é requerido em grande quantidade na cultura. É responsável pelo carregamento da sacarose no floema e, assim, na taxa de transporte dos fotoassimilados da fonte para o dreno. Sua falta causa não somente a redução no crescimento e produção das plantas, mas também afeta a qualidade dos frutos (Reis et al., 2012). Veloso et al. (2001), ao avaliar a resposta do abacaxizeiro a adição de potássio, mostraram que com o aumento da quantidade de potássio aplicado por planta, houve uma redução na acidez e incremento do comprimento e diâmetro do fruto, tendo assim ganho de produtividade.

O abacaxizeiro também requer grandes quantidades de nitrogênio para o seu desenvolvimento (Souza, 1999). Providenciar adequados suprimentos de nitrogênio é essencial para manter altas taxas de crescimento e produtividade (Malézieux e Bartholomew, 2003). Resultados encontrados por alguns autores

mostram que quanto maior a disponibilidade desse elemento, maior a taxa de crescimento vegetativo do abacaxizeiro (Silva et al., 2012, Weber et al., 2003a, Weber et al., 2003b). Além disso, tanto a área da folha quanto o número delas decrescem quando existe deficiência desse elemento, reduzindo também a massa e o peso dos frutos (Malézieux e Bartholomew, 2003).

Com relação ao fósforo, apesar de ser requerido em menores quantidades e geralmente não ser um problema para o desenvolvimento do abacaxizeiro, o crescimento de todas as partes da planta também é reduzido como resultado da deficiência desse nutriente (Malézieux e Bartholomew, 2003). De acordo com Gonçalves e Carvalho (2000), a deficiência de fósforo leva a formação de frutos pequenos com coloração avermelhada ou arroxeadada.

Como a maioria dos solos não consegue suprir as exigências da maioria dos macronutrientes e micronutrientes, para sustentar o crescimento e obter boas produtividades, é importante providenciar o abastecimento dos nutrientes em quantidades adequadas, por meio de adubação (Souza, 1999).

#### 2.1.4- Cultivares

Na escolha de uma cultivar de abacaxi para a implantação de plantios comerciais, o agricultor deve considerar, entre outros fatores, a disponibilidade e qualidade das mudas e o destino da produção. Qualquer que seja a cultivar utilizada, o agricultor deve se preocupar com a manutenção das características morfo-agronômicas. Embora o abacaxizeiro seja uma planta de propagação predominantemente vegetativa, o uso contínuo do mesmo material de plantio pode proporcionar a degeneração do clone, pelo surgimento de pragas e doenças, e o aparecimento de plantas com características diferentes do padrão da cultivar (Cunha, 1999).

As cultivares mais plantadas no mundo são Smooth Cayenne, Singapore Spanish, Queen, Spañola Roja, Pérola (Pernambuco) e Perolera. Cerca de 70% do plantio mundial é da cultivar Smooth Cayenne. No Brasil, a mais plantada é a 'Pérola' (Cunha, 2007).

A fusariose, doença fúngica causada pelo *Fusarium subglutinans* (Nelson et al., 1983), é a doença mais importante do abacaxizeiro no Brasil, sendo que as mudas constituem a principal fonte de disseminação da doença (Matos, 1987),

que está presente nas principais regiões produtoras de abacaxi do país, provocando perdas elevadas na produção de frutos (Pissara, 1978). As principais cultivares que possuem participação expressiva na produção mundial de abacaxi são susceptíveis à doença, dentre elas a cv. Smooth Cayenne e a Pérola (Matos et al., 1991).

#### 2.1.4.1- Características da cv. Vitória

A cv. Vitória, originária do cruzamento das cultivares Primavera e Smooth Cayenne, é resistente à fusariose, sendo indicada para as regiões produtoras onde a fusariose é o fator limitante à produção. Além disso, possui alta produtividade, folhas sem espinhos e frutos de qualidade (Meletti et al., 2011). Em comparação à cv. Pérola e à cv. Smooth Cayenne, a cv. Vitória apresenta características agronômicas semelhantes ou superiores. Esse genótipo foi desenvolvido pelo Instituto de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural – INCAPER-ES em parceria com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, e lançado em 2006 (Ventura et al., 2006).

A cv. Vitória possui praticamente o mesmo porte da cv. Pérola, além de possuir plantas vigorosas, apresentar bom perfilhamento, bom desenvolvimento e crescimento, e produzir frutos quando maduros, de excelente qualidade para o mercado. Os frutos têm polpa branca, elevados teores de açúcares (média de 15,8 °Brix) e excelente sabor nas análises químicas e sensoriais, sugerindo que suas características relativas à acidez são superiores às do abacaxi 'Pérola' e 'Smooth Cayenne' (Ventura et al., 2006).

Esta cultivar apresenta ainda uma maior resistência ao transporte em pós-colheita. Outras características favoráveis da cultivar Vitória são o formato cilíndrico dos frutos, casca de cor amarela na maturação, pesando em torno de 1,5 kg. Os frutos obtidos podem ser destinados ao mercado de consumo *in natura* e para a agroindústria (Ventura et al., 2006).

#### 2.1.5- Métodos de propagação

O sucesso da abacaxicultura depende da qualidade da muda (Reinhardt e Cunha, 1999), sendo que a pequena oferta de mudas de boa qualidade é um dos

fatores que mais limitam a expansão da abacaxicultura (Reinhardt, 2002; Reinhardt et al., 2002)

O abacaxizeiro é uma planta perene, não propagada comercialmente via sementes, as quais são geralmente vestigiais (abortadas), em razão das cultivares serem auto-incompatíveis e/ou, apresentarem baixa fertilidade (Cabral et al., 2003).

A propagação do abacaxizeiro é vegetativa e é feita comercialmente por diversas partes das plantas matriz, tais como as gemas de seções do caule, rebentão (brotação da base do caule), filhote (brotação do pedúnculo), filhote-rebentão (brotação da região de inserção do pedúnculo no caule) e coroa (brotação do ápice do fruto) (Coppens d'Eeckenbrugge e Leal, 2003).

A qualidade (vigor e sanidade) de tais mudas depende das condições ambientais onde são produzidas e do manejo dado à cultura (Reinhardt e Cunha, 1999).

Outro método de grande importância para a cultura é a micropropagação, feita em laboratórios comerciais denominados biofábricas. Esta técnica produz mudas uniformes, sadias, de alto vigor e já enraizadas, o que facilita o planejamento durante o desenvolvimento da cultura, e posterior comercialização das mudas (Coppens d'Eeckenbrugge e Leal, 2003).

#### 2.1.5.1- Micropropagação

A intensificação do uso da micropropagação para abacaxizeiro frente a um cenário de grande demanda de material vegetal deve-se ao fato de que é uma técnica de multiplicação rápida de cultivares em comparação com os métodos convencionais de propagação (Smith et al., 2003).

A micropropagação baseia-se na totipotencialidade das células\* e deve ser entendida como propagação *in vitro*. A micropropagação permite a obtenção de uma grande quantidade de plantas utilizando pequena quantidade de material vegetal original, restringindo ou minimizando a limitação que a baixa oferta de mudas constitui para a expansão das culturas (Souza et al., 2009).

Em comparação com as técnicas de propagação tradicional, a micropropagação apresenta significativas vantagens, dentre as quais a possibilidade de propagar rapidamente em larga-escala novos genótipos e obter

\* Totipotencialidade das células - a capacidade da célula de conservar sua genética total para o desenvolvimento de uma planta completa (Taiz e Zeiger, 2013).

plantas livres de doenças (Souza et al., 2009).

No entanto, o uso generalizado da micropropagação ainda continua sendo limitado nos dias de hoje, devido ao alto custo de produção. Estes custos são atribuídos principalmente a uma baixa taxa de crescimento, uma perda significativa de mudas *in vitro* (devido à contaminação microbiana e desordens fisiológicas e morfológicas), a baixa sobrevivência das mudas no campo e aos altos custos com mão de obra (Xiao e Kozai, 2006; Houllou-Kido et al., 2009).

Na maior parte, a técnica de micropropagação convencional é realizada utilizando-se recipientes de pequeno porte com meio de cultura com ágar ou outros agentes geleificantes, contendo nutrientes minerais e sacarose como fonte de carbono para o metabolismo das plantas, um baixo fluxo de fótons fotossintéticos (FFF), o qual é fornecido geralmente por lâmpadas fluorescentes, sendo que os frascos fechados não permitem a troca de gases. Tais características fazem com que o método exija a fase de aclimatização antes de levar as mudas para o campo (Cui et al., 2000; Dary et al., 2001; Fuentes et al., 2007).

A fase de aclimatização é a transferência para condições de casa de vegetação. Nessa fase objetiva-se assegurar a sobrevivência das mudas sob condição *ex vitro* (González-Olmedo et al., 2005), sendo esse período, de acordo com Teixeira et al. (2001), seis a oito meses de duração, e dependendo do substrato e da nutrição das plantas pode levar até dez meses (Folliot e Marchal, 1990).

As perdas das mudas, tanto na fase *in vitro* quanto na fase *ex vitro*, são direta ou indiretamente relacionadas às características fotomixotróficas\* ou heterotróficas do crescimento das mudas *in vitro* no sistema de micropropagação convencional, em que o açúcar no meio de cultura é a fonte de carbono e energia principal ou exclusiva para a planta em crescimento (Nguyen e Kozai, 2001; Khan et al., 2003; Zhang et al., 2009).

A dificuldade de transição do mecanismo heterotrófico para fotoautotrófico em plantas micropropagadas ocorre em virtude das alterações epigenéticas anatômicas e fisiológicas, induzidas pelas condições *in vitro* (Campostrini e Otoni, 1996) e, portanto, tal processo requer a realização de determinadas investigações, para que a aclimatização venha a ter mais sucesso.

\*Fotomixotrófica - cultivo *in vitro* misto, ou seja, as mudas além de incrementarem a matéria seca por meio de componentes adicionados ao meio de cultivo, também podem incrementar a matéria seca por meio da absorção do CO<sub>2</sub> do ar em torno do explante (Kozai, 1991).

Há tempos se sabe que a aclimatização é considerada uma fase crítica da micropropagação, sendo um dos maiores obstáculos à aplicação prática da cultura de tecidos na propagação de plantas, devido à grande diferença entre as condições laboratoriais e as condições do ambiente *ex vitro* (Read e Fellman, 1985, Zhang et al., 2009).

Apesar das inúmeras vantagens, a micropropagação produz plantas com características peculiares como: parte aérea pequena, menor quantidade de cera cuticular e epicuticular nas folhas (Fuchigami et al., 1981), tecidos com reduzida resistência mecânica (menos colênquima e esclerênquima), maior conteúdo de água, estômatos não-funcionais (Ziv et al. 1987; Cassells e Walsh, 1994), folhas finas, pequenas, com poucos tricomas (Wetzstein e Sommer, 1982), com baixa atividade foto-autotrófica (Deng e Donnelly, 1993; Pospisilová et al., 1992), sistema radicular com poucos pelos (Preece e Sutter, 1991) e dificuldade de controlar a perda de água, quando submetidas às condições do ambiente natural, com aumento da demanda evaporativa (Albany et al., 2005; Barboza et al., 2006).

Os estômatos possuem considerável importância nesse sentido, pois o movimento de água contida nos espaços intercelulares para a atmosfera ocorre quase que completamente por difusão do vapor de água através deles, cujo principal mecanismo de controle é a resistência estomática (Taiz e Zeiger, 2013).

Um dos problemas enfrentados pela técnica que pode ser citado é que durante o cultivo *in vitro*, as plantas recebem uma pequena intensidade de fluxo de fótons fotossintéticos (FFF), e na aclimatização, o FFF é muito maior, tornando as plantas susceptíveis a estresses por luz. Essa alta radiação fornecida durante a aclimatização pode levar a fotoinibição crônica (Krause e Weis, 1991; Huylenbroeck et al., 1995).

Portanto, quando transplantadas para condições *ex vitro*, são mais susceptíveis aos estresses ambientais e passíveis de perdas mais frequentes (Preece e Sutter, 1991). Assim, a perda de vigor e a subsequente morte devido ao dessecamento são dois sérios problemas que ocorrem com plantas transferidas das condições *in vitro* para casa de vegetação (Barboza et al., 2006, Sutter e Hutzell, 1984).

Se as condições ambientais (luz, temperatura e umidade) forem desfavoráveis durante a aclimatização, o crescimento das mudas pode ser prejudicado, retardando o tempo para disponibilizá-las ao produtor (Pereira et al.,

2005). Logo, a manipulação das condições de aclimatização pode reduzir as perdas (Preece e Sutter, 1991; Desjardins, 1995), no entanto não sem custos adicionais aos produtores.

Dentre os métodos que favorecem o crescimento das mudas após a aclimatização estão incluídas técnicas como: enraizamento *ex vitro* ou *in vivo* (Biasi, 1996; Pasqual e Lopes, 1991), escolha do substrato adequado (Normah et al., 1995), uso de micorrizas (Corsato, 1993) e uso de bactérias promotoras do crescimento vegetal (Baldotto et al., 2010).

#### 2.1.6 Aspectos Fisiológicos - Metabolismo Ácido das Crassuláceas – “*Crassulacean Acid Metabolism*” (CAM)

A maioria das plantas superiores assimila o CO<sub>2</sub> atmosférico por meio do metabolismo C<sub>3</sub>. Entretanto, em condições de limitação de disponibilidade desse gás, a enzima Ribulose-bisfosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) pode utilizar o O<sub>2</sub> como substrato, processo esse conhecido como fotorrespiração, que é dispendioso e limita a fotossíntese. Como alternativas bioquímicas, as plantas desenvolveram o metabolismo C<sub>4</sub> e o metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) para reduzir a atividade oxigenase da Rubisco, por meio da concentração do CO<sub>2</sub> próximo do seu sítio de atuação (Lüttge, 2004).

A fotossíntese por meio do metabolismo CAM consiste na carboxilação noturna do fosfoenolpiruvato (PEP), utilizando o CO<sub>2</sub> atmosférico, dando origem ao oxaloacetato (OAA). Essa reação mediada pela fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC). O OAA é então reduzida a malato, pela malato desidrogenase (MDH), e conseqüentemente é transportada para o vacúolo e estocado na forma de ácido málico, gerando a acidificação noturna nas folhas. No período diurno, os estômatos se mantêm fechados e o ácido málico é remobilizado para o citoplasma e descarboxilado pela enzima do tipo málica, produzindo o CO<sub>2</sub> que é refixado no cloroplasto pela Rubisco, sendo, portanto, um mecanismo de concentração de CO<sub>2</sub>, com uma separação temporal dos eventos, que reduz a frequência com que a fotorrespiração ocorre (Dodd et al., 2002; Herrera 2009; Silveira et al., 2010).

Apesar de parecer, esse mecanismo não opera simplesmente como um ciclo dia-noite, como descrito acima. De fato, existe uma enorme plasticidade em

formas e funções, podendo ser otimizado dependendo de respostas a condições ambientais (Lüttge, 2008). A melhor maneira de se descrever essas opções é por meio da divisão do ciclo em 4 fases, de acordo com Osmond (1978): a fase I representa a abertura estomática noturna, com a captura do CO<sub>2</sub>, fixação e armazenamento como ácido málico. A fase III representa a etapa na qual os estômatos estão em sua maior parte fechados durante o dia, com a remobilização do CO<sub>2</sub> e sua assimilação. As fases II e IV são fases intermediárias, que incluem, respectivamente, o fechamento estomático progressivo no início da manhã, com início do processo de descarboxilação do malato e sua abertura no final da tarde, que, geralmente, ocorre quando as reservas de malato já estão esgotadas.

Dependendo da extensão dessas duas fases (II e IV), influenciado por fatores ambientais e endógenos, o CO<sub>2</sub> pode ser capturado e assimilado diretamente pela Rubisco, através do metabolismo C<sub>3</sub>, podendo haver uma grande contribuição na produtividade das plantas (Lüttge, 2008).

Dentre as plantas que assimilam o carbono atmosférico por meio do metabolismo CAM, o abacaxizeiro é a cultura de maior importância econômica (Zhu et al. 1997). Segundo Côte (1988), o abacaxizeiro pode atingir taxas de assimilação de CO<sub>2</sub> diurnas maiores do que no período noturno, dependendo das condições de cultivo, entretanto, esses valores são, de maneira geral, menores do que os de plantas com metabolismo C<sub>3</sub>, pois aquelas apresentam folhas com menor condutância à difusão de gás, mesmo quando os estômatos estão amplamente abertos. Além disso, a concentração de Rubisco por unidade de área de folha pode ser menor, e contribuir para tal fato (Winter et al., 1982).

No caso do abacaxizeiro, a condutância estomática e a transpiração são fortemente correlacionadas com o ritmo de captura do CO<sub>2</sub> (Côte et al., 1993). As taxas de transpiração mais baixa são encontradas nas fases I, II e III e as mais altas durante a fase IV (Malézieux et al., 2003). Portanto, Ao abrir seus estômatos, em horários de baixas taxas de evapotranspiração, como no período noturno, ocorre um aumento da eficiência do uso da água, e isso faz com que essas plantas possam sobreviver em condições com pouca disponibilidade hídrica, sendo umas das vantagens do metabolismo em questão (Lüttge, 2004).

Entretanto, dependendo da duração do período luminoso, a reserva do ácido málico pode terminar e conseqüentemente a proporção entre O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> pode aumentar, devido à liberação do O<sub>2</sub> pelo complexo de evolução do oxigênio no

fotossistema II e, portanto, a atividade oxigenase da rubisco pode ser favorecida (Lüttge, 2002). Dessa forma, ocorre uma redução na eficiência da conversão do carbono atmosférico em carboidratos, tendo uma correlação direta com o crescimento das plantas.

O abacaxizeiro é classificado como uma planta CAM constitutiva (Zhu et al. 1997, Antony et al. 2008), ou seja, plantas jovens podem fixar o carbono atmosférico por meio do metabolismo C<sub>3</sub>, na ausência de estresses abióticos, principalmente o hídrico, acelerando o desenvolvimento (Freschi et al., 2010). Outras condições de cultivo, como salinidade, temperaturas altas, intensidade ou qualidade de luz, também contribuem para o grau de alternância entre o CAM e o metabolismo C<sub>3</sub> (Neivola et al., 2005, Aragón et al., 2011). Essa regulação depende de expressão gênica em resposta a sinais de estresse (Cushman, 2001). Além disso, essa capacidade de alternância entre o CAM e C<sub>3</sub> é fortemente associada com a maturidade fotossintética do tecido. Logo, as plantas sempre atuam como CAM em tecidos maduros, independente se as condições ambientais são estressantes ou não e a definição do momento em que isso irá ocorrer está ligados a fatores ontogenéticos (Freschi et al., 2010; Winter et al. 2008).

Para ter uma ideia da influência das condições de cultivo no metabolismo, podemos citar o efeito da temperatura. De acordo com Zhu et al. (1999), o aumento da temperatura aumenta a proporção de CO<sub>2</sub> que é fixado no período noturno em relação ao total.

Da mesma maneira, a irradiância pode alterar o padrão de fixação do CO<sub>2</sub>. Por exemplo, altas irradiâncias diminuem a duração da fase III e aumentam a duração da fase IV, quando comparado a situações de baixa irradiância (Nose et al., 1986). Além disso, em altas irradiâncias, enquanto os estômatos permanecem abertos na fase III, as taxas fotossintéticas são mais elevadas do que em situações de menor intensidade de luz (Malézieux et al., 2003).

Entretanto, como dito anteriormente, o fator que é mais significativo para essas alterações na assimilação do carbono atmosférico é a disponibilidade hídrica (Freschi et al., 2010).

### 2.1.6.1 – Importância da Irrigação na Aclimatização:

A irrigação é uma prática de grande importância no processo de aclimatização, já que a água é um dos fatores que mais limita a produção das mudas, e tem como função controlar a umidade relativa do ambiente (Bomfim et al., 2011).

O manejo de irrigação, mais especificamente a frequência de aplicação da água, é essencial para o estabelecimento e para o adequado crescimento de mudas micropropagadas em condições de aclimatização, já que irrigações excessivas ou deficientes costumam afetar negativamente o desenvolvimento vegetal (Farias e Saad, 2005).

As irrigações muito frequentes e com lâminas reduzidas, como são feitas no processo de aclimatização convencional por meio da técnica de aspersão, costumam molhar somente alguns centímetros da camada superficial do substrato, o que facilita a maior perda de água pelo processo de evaporação e acaba prejudicando o desenvolvimento do sistema radicular das mudas, tendo em vista que o crescimento das raízes pode ser limitado à porção superficial do substrato (Farias e Saad, 2005; Bomfim et al., 2011; Faria et al., 2012).

Além disso, a alta frequência de irrigação com reduzida lâmina de água, por favorecer o processo de evaporação, ainda pode promover o secamento do substrato (Bomfim et al., 2011). Para Kramer e Boyer (1995), o secamento do material reduz o potencial de água e provoca a contração das raízes e do substrato, e essa contração acaba reduzindo o contato do substrato com a raiz, aumentando a resistência à absorção de água.

#### 2.1.6.1.1- Estresse Hídrico

O estresse é uma força ou condição adversa que inibe o funcionamento normal do sistema biológico do indivíduo (Jones e Jones, 1989), sendo o estresse hídrico causado tanto pelo excesso quanto pela escassez de água, porém, a primeira situação leva a uma redução na disponibilidade de oxigênio para as raízes (Mahajan e Tuteja, 2005).

Segundo Cunha (1999), em condições de seca, observa-se no abacaxizeiro um amarelecimento da planta, e uma redução na emissão de folhas,

as quais perdem a turgescência, tornam-se estreitas e eretas, adquirem uma cor arroxeadada e os bordos do limbo enrolam-se para baixo. Em casos extremos, pode haver um ressecamento também das raízes e do pedúnculo, este último causando o tombamento dos frutos (Py et al., 1984).

Tais sintomas, algumas vezes, podem ser confundidos com a murcha do abacaxizeiro causada pelo vírus do gênero *Ampelovirus* que é transmitido pela cochonilha *Dysmicoccus brevipes* (Sether et al., 2005). A planta infectada geralmente possui menor porte, apresenta folhas avermelhadas com pontas secas, poucas raízes, sendo arrancadas com facilidade, podendo morrer (Sether et al., 2002).

O estresse hídrico não afeta o abacaxizeiro apenas durante a fase adulta. Durante o processo de aclimatização, o estresse hídrico tem sido relatado como a principal causa de mortalidade de plântulas durante essa etapa da micropropagação, tendo como resultado a perda excessiva de água pelas plântulas (Barboza et al., 2006). A alta umidade relativa do recipiente de cultivo (próxima de 100%) e a baixa irradiância são os principais fatores que provocam alterações na estrutura e funcionamento dos tecidos, causando a baixa capacidade das mudas produzidas *in vitro* de controlar a perda de água, quando submetidas às condições de aclimatização, com aumento da demanda evaporativa (Albany et al., 2005; Barboza et al., 2006).

A densidade estomática, sua estrutura e funcionalidade são os principais responsáveis pela perda de água durante o processo de aclimatização (Barboza et al., 2006; Hazarika, 2006).

Liu e Zhu (1998) descrevem que a parte aérea normalmente é mais sensível à deficiência hídrica, do que as raízes, apesar de haver uma determinada relação para tal: redução na parte aérea também reduz a taxa transpiratória, e o aumento do sistema radicular visa explorar novas áreas do solo em procura de água.

Hu e Shimidahalder (1998) relatam que o estresse hídrico altera vários processos bioquímico-fisiológicos, desde a taxa fotossintética até a síntese proteica e acúmulo de solutos.

#### 2.1.6.1.1.1 - Efeitos Fisiológicos

Geralmente, a primeira resposta de todas as plantas a baixa disponibilidade hídrica é o fechamento dos estômatos. O estresse hídrico pode se tornar tão severo que até mesmo plantas CAM podem ser submetidas à situação de ter que escolher entre a dessecação ou ficar sem assimilar o CO<sub>2</sub> (Matiz et al., 2013). Em primeira instância, as fases II e IV são eliminadas e os estômatos permanecem fechados ao longo de todo período luminoso, restringindo a perda de água pela transpiração. Em casos ainda mais severos, os estômatos podem permanecer fechados até mesmo durante a noite, e o CAM irá representar uma opção de sobrevivência, por meio da reciclagem interna do CO<sub>2</sub> (Lüttge, 2008; Osmond, 1978).

O fechamento estomático pode se dar em resposta ao aumento na concentração de ácido abscísico (ABA) nas raízes, que conseqüentemente é transportado para as folhas. A partir dos vasos terminais do xilema até a epiderme, o transporte via apoplasto do ABA é influenciado, dentre outros fatores, pelo pH, pela biossíntese e pelo metabolismo deste fitormônio. O ABA é distribuído aos compartimentos celulares das folhas através da difusão pela membrana por meio de gradientes de pH. O ABA atravessa as membranas na forma protonada (ABAH) e nos compartimentos alcalinos (citosol ou estroma do cloroplasto), ele dissocia-se no ânion ABA<sup>-</sup>. Na regulação do movimento estomático, o primeiro local de ação do ABA é a membrana externa da célula-guarda. Em condições de estresse hídrico, o pH do apoplasto e a capacidade de troca do ânion (ABA<sup>-</sup>) são aumentados, favorecendo o rápido acúmulo de ABA na célula guarda, que resulta no fechamento dos estômatos (Hartung et al., 1990).

Esse fechamento estomático, apesar de aumentar a eficiência do uso da água, também limita a entrada de CO<sub>2</sub> atmosférico, restringindo a fotossíntese (Taiz e Zeiger, 2013; Faria et al., 1996).

Em *Mesembryanthemum crystallinum*, o modelo de planta CAM (facultativo) mais intensivamente estudado, aumenta o seu nível endógeno de ABA, durante a indução do metabolismo CAM em resposta a estresse hídrico (Taybi e Cushman, 2002), enquanto que a aplicação exógena desse hormônio pode induzir a expressão e atividade de muitas enzimas do metabolismo CAM,

até mesmo na ausência de restrições ambientais, o que sugere que o ABA está fortemente ligado à ativação de tal metabolismo (Taybi et al., 1995).

A taxa transpiratória, influenciada pela síntese de ABA, afeta a temperatura da folha, a qual pode ser menor que a do ar, quando a radiação incidente é baixa, ou maior que a do ar, quando a radiação é alta e, em ambos os casos, essa temperatura é reduzida pelo aumento da transpiração (Angelocci, 2002). Por isso, a medida da temperatura da folha é utilizada, como indicador da taxa de transpiração e, conseqüentemente, da disponibilidade hídrica (Idso et al., 1986).

Dessa forma, possíveis alterações na condutância estomática podem causar um aumento na temperatura foliar (Jones, 2002). De acordo com Vítolo et al., (2012), o primeiro dano imposto quando a temperatura excede a faixa ótima para fotossíntese é a perda de estabilidade e desorganização das membranas, que irão afetar a estabilidade do aparato fotossintético. No caso do abacaxizeiro, a temperatura da folha e da planta podem atingir valores muito altos, devido a baixa taxa transpiratória e a pouca circulação de ar em torno das folhas, devido a arquitetura da planta (Malézieux et al., 2003).

A deficiência hídrica não afeta apenas a funcionalidade dos estômatos, mas sim o processo fotossintético como um todo (efeitos não-estomáticos). Na fotossíntese, a luz é absorvida por pigmentos do complexo-antena, que quando excitados, transferem energia para os centros de reação dos fotossistemas I e II (PSI e PSII) (Young e Frank, 1996). Dessa forma, a redução na fixação de CO<sub>2</sub> também pode ser limitada por situações, como a redução no transporte de elétrons, que leva ao decréscimo na síntese de ATP e NADPH, ou até mesmo efeitos bioquímicos, como limitações na eficiência carboxilativa e/ou na quantidade e atividade da enzima Rubisco e outras enzimas do metabolismo de carbono (Wise et al., 1991; Lu e Zhang, 1999).

A deficiência de CO<sub>2</sub>, ATP ou RuBP, assim como a inibição da Rubisco, pode comprometer o Ciclo de Calvin e o acúmulo do primeiro acceptor dos elétrons fotossintéticos, o NADPH. Se concomitantemente ocorrerem condições de alta irradiância, haverá uma sobrecarga energética nos componentes antena e de transporte de elétrons, que assim não conseguem canalizar a energia para processos bioquímicos, o que poderá provocar danos no aparato fotossintético (Haupt-Herting e Fock, 2000).

Desta maneira, o excesso de energia necessita ser dissipado em vias alternativas. Uma possibilidade é a emissão dessa energia na forma de calor (Krause e Weiss, 1991) que está relacionada à diminuição da atividade do PSII (Faria et al., 1998).

Segundo Meyer e Genty (1999), a fluorescência da clorofila permite verificar a atividade do transporte de elétrons da fase fotoquímica, fornecendo uma análise detalhada da inibição desta fase da fotossíntese, induzida pelo estresse.

A eficiência quântica máxima do PSII ( $F_v/F_m$ ) pode variar numa faixa de 0,75 a 0,85 em plantas não submetidas a estresses, ou seja, de 100 fótons que chegam ao PSII, 75 a 85 deles são usados para reduzir Quinona a (Qa), mostrando uma ótima eficiência do PSII, que é capaz de capturar nessas condições maior quantidade de energia. (Bolhar-Nordenkampf et al., 1989).

A diminuição da relação  $F_v/F_m$  é um bom indicador de efeito foto-inibitório, quando as plantas estão submetidas a diversos tipos de estresse mesmo antes dos sintomas aparecerem (Angelopoulos et al., 1996; Yang et al., 1996; Faria et al., 1998). Sendo assim, a medição da fluorescência da clorofila a é uma técnica rápida, precisa e não-destrutiva para detectar o desequilíbrio energético e metabólico da fotossíntese (Araus et al., 1998). Para os estresses ambientais que não causam modificações na relação  $F_v/F_m$ , pode-se utilizar o índice fotossintético ou "*Photosynthetic index*" (PI).

Esta variável proposta por Strasser et al (2000) é um índice que integra três componentes independentes: densidade dos centros de reação ativos (RCs); eficiência no transporte de elétrons após Qa ter sido reduzida e a probabilidade de que um fóton absorvido seja capaz de reduzir Qa. A variável PI mostra a atividade dos fotossistema I e II e pode avaliar o desempenho da planta sob condição de estresse, sendo capaz de fornecer informações precisas do que a relação  $F_v/F_m$ , por avaliar o funcionamento dos dois fotossistemas (Strasser et al., 2004).

O metabolismo CAM parece ser também uma espécie de proteção contra a fotoinibição. Experimentos medindo a fluorescência da clorofila em *Clusia minor*, que pode atuar tanto como CAM como  $C_3$ , mostrou que a fotoinibição, quando ocorre, é mais provável de ser observado durante a fase IV do CAM, quando os estômatos estão abertos e as plantas fixam o  $CO_2$  via Rubisco, do que na fase III

(Haang-Kerwer, 1994). Resta saber, se ao longo de um estresse hídrico, o comportamento será o mesmo, já que esse tipo de comportamento parece ser contraditório com o fato de o metabolismo CAM ser expresso justamente em condições de estresse. Ou seja, se a fase IV ocorre, as plantas em tese não estão sofrendo danos abióticos, que levam a fotoinibição.

O teor de clorofila está diretamente relacionado à fase fotoquímica da fotossíntese, pois são os pigmentos responsáveis pela captura de luz, sendo essenciais na conversão da radiação luminosa em energia química, na forma de ATP e NADPH (Jesus e Marengo, 2008). A intensidade de verde, representada pelo índice SPAD pode ser utilizada nesse sentido, pois estresses abióticos podem influenciar no teor de clorofila foliar. De acordo com Torres Netto et al. (2002), em mamoeiro, os valores elevados do índice SPAD indicam bom conteúdo de nitrogênio (N) no tecido foliar, bem como pigmentos fotossintéticos, uma vez que o índice SPAD apresenta relação direta com a concentração das clorofilas e de Nitrogênio foliar.

Outra questão a ser observada, é com relação a espécies reativas de oxigênio (EROs). Plantas em condições de deficiência hídrica possuem baixa capacidade de assimilar o CO<sub>2</sub>. A contínua absorção de luz em tais condições resulta em um excesso de energia que não pode ser utilizada, e se não for dissipada, pode promover uma grande produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), incluindo superóxidos, os oxigênios singleto, hidroxilas, e peróxidos de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), e esses compostos podem ser prejudiciais a estruturas de proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucléicos (DaCosta e Huang, 2001; Smirnoff, 1993).

O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tem sido associado à indução do metabolismo do tipo CAM, ou quando aplicado de forma exógena, em concentrações relativamente altas, ou também quando aumenta seus níveis endógenos (Slesak et al., 2008).

Sistemas enzimáticos e não enzimáticos foram desenvolvidos nas plantas para proteção contra esses EROs. Alguns exemplos são as enzimas catalase e peroxidase (Asada, 1999). É exatamente o equilíbrio entre a produção de ERO e atividades antioxidante enzimática que determina se ocorrerá sinalização oxidativa ou danos, apesar disso variar entre espécies vegetais, cultivar, intensidade e duração do estresse (Da Costa e Huang, 2007).

Entretanto, a produção de enzimas responsáveis pela eliminação de EROs pode ser interrompida devido ao estresse hídrico, ou haver um desbalanceamento entre sua produção e das ERO, resultando em aumento da peroxidação de lipídeos, o que leva a danos a membrana celular, além de degradar proteínas, ácidos nucleicos e pigmentos (Chowdhury e Choudhuri 1985; Zhang e Kirkham, 1994; Jagtap e Bhargava, 1995; Bailly et al. 1996; Dat et al., 1998).

Em mudas oriundas de micropropagação, o estresse hídrico e a fotoinibição atuam em conjunto aumentando a formação de EROs em tais plantas (Smirnoff, 1988; Foyer et al., 1994).

Em plantas CAM, as alterações que ocorrem em seu metabolismo ao longo do dia requer que haja uma regulação específica para produção de uma série de enzimas. Enzimas como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase incrementam seus níveis durante o dia e reduzem a noite, como uma espécie de proteção a elevação na concentração das espécies reativas que ocorre no período diurno (Slesak et al., 2002). Portanto, a ativação do metabolismo CAM está fortemente ligado às condições ambientais.

A deficiência hídrica é tida como o fator que mais afeta esse processo (Freschi et al. 2010). Assim, a disponibilidade hídrica é um fator chave e pode influenciar no tempo de permanência e sobrevivência das mudas de abacaxizeiro nessa fase, tendo em vista a limitação desse metabolismo em assimilar o CO<sub>2</sub> atmosférico quando comparado com os metabolismos C<sub>3</sub> e C<sub>4</sub>, que apesar de permitir a sobrevivência do abacaxizeiro em condições de estresse, faz com que as plantas tenham um crescimento lento, além de poder resultar em outros efeitos como estresses por alta temperatura ou até mesmo fotoinibição (Almeida et al., 2002).

## 2.2- Discriminação Isotópica do Carbono

Existem duas formas de ocorrência natural do carbono, <sup>12</sup>C e <sup>13</sup>C. A maioria do carbono encontrado na natureza se encontra na forma de <sup>12</sup>C (98,9%). Esses isótopos estão desigualmente distribuídos entre os diferentes compostos, e essa distribuição pode revelar informações sobre a física, química e processos metabólicos envolvidos na transformação do carbono (Franquhar et al., 1989).

As propriedades químicas do  $^{13}\text{C}$  são idênticas as do  $^{12}\text{C}$ , mas devido à leve diferença de massa (2,3%), a maioria das plantas assimila menos o primeiro. Em outras palavras, as plantas discriminam contra os isótopos mais pesados de carbono e elas têm razões de  $^{13}\text{C}$  para  $^{12}\text{C}$  menores do que as encontradas no  $\text{CO}_2$  atmosférico (Taiz e Zeiger, 2013).

Em contraste com as técnicas de trocas gasosas que medem a taxa fotossintética em um dado momento, a composição isotópica do carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) integra a taxa de  $\text{CO}_2$  intercelular ( $p_i$ ) com a concentração de  $\text{CO}_2$  do ar ( $p_a$ ) a longo prazo (Osório et al., 1998).

Embora o  $\delta^{13}\text{C}$  da planta inteira seja controlado pela assimilação e difusão do  $\text{CO}_2$  nas folhas, a partição interna e o metabolismo primário dos assimilados também podem produzir diferentes  $\delta^{13}\text{C}$  entre os diferentes órgãos da planta (Ghashghaie et al., 2001; Brugnoli e Farquhar, 2000).

No sítio de carboxilação da Rubisco, o  $^{13}\text{C}$  apresenta uma baixa reatividade intrínseca, comparada com o  $^{12}\text{C}$ . Por outro lado, os estromas discriminam menos o  $^{13}\text{C}$  do que a Rubisco (Brugnoli e Farquhar, 2000; Bacon, 2004).

A presença de duas rotas de carboxilação em plantas CAM, uma mediada pela PEPC e outra pela Rubisco, determina as diferenças na  $\delta^{13}\text{C}$ . Essas diferenças são dadas pelas características de fracionamento da PEPC e Rubisco. Assim, os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  encontrados nas plantas são indicativos de quanto do  $\text{CO}_2$  é fixado pela Rubisco (durante o dia) ou PEPC (à noite). Consequentemente, crescimento dependente da fixação noturna de  $\text{CO}_2$  gera valores menos negativos de  $\delta^{13}\text{C}$  (planta CAM), enquanto que crescimento dependente de fixação de  $\text{CO}_2$  atmosférico durante o dia resulta em valores mais negativos de  $\delta^{13}\text{C}$  (planta  $\text{C}_3$ ) (Osmond et al., 1973).

Em resposta a diferentes condições ambientais, o  $^{13}\text{C}$  pode ser usado para avaliar a eficiência intrínseca do uso da água em muitas espécies de plantas (Le Roux et al., 1996; Osório et al., 1998; Robinson et al., 2000; Araus et al., 2003; Gaudillère et al., 2002). Assim, ao longo da fase de crescimento, a composição isotópica do carbono reflete o efeito do status hídrico da planta no processo fotossintético (de Souza et al., 2005).

Plantas CAM constitutiva tem valores de  $\delta^{13}\text{C}$  estáveis na faixa de 2-10% (Farquhar, et al., 1989 e Griffiths, 1992) e esses valores refletem a contribuição

relativa do CO<sub>2</sub> fixado a noite e dia em relação ao total de ganho de carbono (Griffiths, 1992). Como dito anteriormente, as condições ambientais podem alterar a quantidade relativa de CO<sub>2</sub>, fixados durante o dia e a noite, e conseqüentemente, alterar os valores da discriminação isotópica (Griffiths, 1992).

### 2.3 - Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal

Diversos processos são mediados por microrganismos do solo desempenhando papel importante na ciclagem de nutrientes. Um desses processos é a fixação biológica de nitrogênio atmosférico, que é realizada por microrganismos procarióticos conhecidos como diazotróficos, e nesse grupo está incluso uma grande quantidade de bactérias (Moreira et al., 2010).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é o processo realizado pela enzima nitrogenase, presente nas bactérias fixadoras de nitrogênio (também chamadas de diazotróficas), em que há a transformação do nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>) em amônia (NH<sub>3</sub>), forma assimilável pelos vegetais (Nunes et al., 2003; Marin et al., 1999). Exatamente por essa habilidade em converter nitrogênio atmosférico em substâncias nitrogenadas utilizáveis pelas plantas, essas bactérias também são reconhecidas como bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV). Tal processo é de suma importância visto que aproximadamente 65% de nitrogênio mineral aplicado com a adubação é perdido pela emissão de gases e/ou erosão (Bhattacharjee et al. 2008; Adesemoye e Kloepper 2009).

As bactérias fixadoras de nitrogênio de vida livre e associadas às plantas não leguminosas têm sido amplamente estudadas nas últimas décadas, desde o isolamento de *Beijerinckia fluminense* da rizosfera de cana-de-açúcar (Döbereiner e Ruschel, 1958) e com a reidentificação de *Azospirillum lipoferum* isolado de raízes de diversas gramíneas forrageiras e cereais (Döbereiner e Day, 1976).

Além do processo de FBN, as BPCV podem auxiliar o desenvolvimento de plantas por outros mecanismos, como: solubilização de fosfatos pela liberação de ácidos orgânicos (Pedraza et al., 2008. Moreira et al., 2010); oxidação de sulfatos (Banerjee e Yesmin, 2002); produção de sideróforos\* (Katiayar e Goel, 2004); inibição de organismos antagônicos (Dobbelaere et al., 2003); indução de resistência sistêmica ao patógeno pelo hospedeiro (Berg, 2009); alteração da respiração das raízes e das atividades de enzimas da via glicolítica e do ciclo dos

\*Sideróforos - Sideróforos são peptídeos de síntese não-ribossômica com altíssima afinidade por ferro produzidos por microorganismos, incluindo as bactérias presentes na rizosfera (Neilands, 1984).

ácidos tricarbóxicos e produção de nitritos (Okon e Labandera-Gonzales, 1994; Basha e Holguin, 1997); produção de antibióticos e outras moléculas bioativas (Strobel, 2002); aplicação nos processos de bioremediação (Lodewyckx et al., 2002) e nas técnicas de transgenia (Baldani et al., 2002). As BPCV podem também estar associadas a produção de hormônios, que interferem no crescimento das plantas (Bashan e Hognin, 1997; Zaied et al., 2003).

Dentre essas substâncias estão as auxinas, que podem ser produzidas por bactérias; que, quando em associação com as plantas, podem promover o crescimento vegetal (Patten e Glick, 1996; Ryu e Patten, 2008; Kochar et al., 2011; Lópezvaldez et al., 2011). Algumas bactérias também estimulam a produção de giberelinas e citocininas, tendo efeito similar (Reynders e Vlassak, 1979; Tien et al., 1979; Zimmer et al., 1988; Bottini et al., 1989).

Algumas bactérias podem interferir ainda na produção de etileno, através da degradação do 1-aminociclopropano -1-carboxilato (ACC), que é o precursor do etileno, devido atuação da enzima ACC deaminase (Glick et al., 1998). A redução dos níveis endógenos desse hormônio leva a diminuição dos efeitos inibitórios do crescimento vegetal, retarda o processo de senescência, promove um maior desenvolvimento de pelos radiculares (Arshad e Frankenberger Jr., 1998; Khalid et al., 2004; Pierik et al., 2006) e ainda permite o crescimento das plantas sobre condições de estresse (Neiverth, 2011).

De maneira geral, a produção de fitohormônios e seu balanço adequado pode alterar a morfologia das raízes, aumentando o número e o comprimento dessas, e estimulando o desenvolvimento de um maior número de raízes laterais (Sala et al., 2007; Spaepen et al., 2008). O aumento do número e volume de raiz, associado com o aumento na quantidade de H<sup>+</sup>-ATPase na parede celular das células das raízes permite que se tenha uma maior absorção de água e nutrientes (Baldani e Baldani, 2005).

Os abacaxizeiros micropropagados apresentam crescimento bastante lento na fase *ex vitro*, que depende do substrato, da nutrição das plantas e do seu metabolismo, que pode alternar entre o C<sub>3</sub> e o CAM (Côte et al., 1993), assim, devido aos mecanismos citados anteriormente, a aplicação de bactérias diazotróficas e promotoras de crescimento em mudas micropropagadas poderia vir a ser uma alternativa para reduzir o período de aclimação das mudas e os estresses que essas sofrem durante essa fase (Weber et al., 2003).

### 2.3.1- Bactérias Endofíticas

Na interação associativa, as bactérias podem ser encontradas na superfície da raiz, na camada mais interna do córtex (associação epifítica) ou no interior da raiz, colmo, e, especialmente nos espaços inter/intracelular do parênquima, vasos condutores podendo chegar à parte aérea da planta (associação endofítica) (Baldani e Baldani, 2005).

O termo endofítico inclui todos os organismos que são capazes de colonizar, em algum momento do seu ciclo de vida, o interior dos tecidos das plantas sem causar aparente dano ao hospedeiro. Os organismos endofíticos podem ser divididos em obrigatórios, que estão presentes no espaço inter/intracelular de raízes das plantas, e os facultativos, que podem também colonizar a rizosfera (Baldani et al., 1997).

As bactérias endofíticas são encontradas geralmente em maior número nas raízes, decrescendo progressivamente dos caules as folhas (Olivares et al., 1996; Roesch et al., 2006), mostrando que a raiz é a principal porta de entrada para as bactérias.

A penetração pode ocorrer por meio de aberturas naturais que surgem durante o crescimento das plantas; pelas junções das raízes secundárias com as primárias; através dos pêlos radiculares; ou ainda através dos estômatos ou tricomas danificados (James et al. 2002). Quando a entrada não é realizada pelas aberturas naturais, as bactérias utilizam pectinases e celulases para degradar a parede celular da planta hospedeira (Sala et al., 2007). Para ocorrer a colonização intercelular, a parede celular deve ser degradada (Neiverth, 2011).

O ápice das raízes é considerado uma das regiões de colonização primária, principalmente na zona de alongamento e diferenciação celular, onde as bactérias podem invadir inter/intracelularmente, penetrando nos tecidos mais centrais antes da diferenciação dos vasos condutores e da endoderme, que mais tarde irá construir um limite, devido incrustação de lignina e suberina da estria de Caspary (Reinhold-Hurek e Hurek, 1998).

De acordo com James e Olivares (1998), o espaço intracelular e o lumem do xilema são considerados os locais ideais para a localização das bactérias endofíticas devido ao suplemento de nutrientes e circulação de produtos

benéficos oriundos das bactérias associadas. Além disso, há o favorecimento da expansão da colonização das bactérias por toda planta e seu estabelecimento.

Tem sido demonstrado que estirpes isoladas de uma espécie vegetal são mais aptas a se restabelecer nas raízes, quando inoculadas na mesma espécie vegetal, sendo denominadas estirpes homólogas (Baldani e Baldani, 2005). Além disso, admite-se ser o genótipo da planta fator-chave para obtenção dos efeitos positivos da inoculação das bactérias diazotróficas endofíticas (Reis et al., 2000). Esse sucesso é devido ao fato de que o interior das plantas está protegido de outros microrganismos além de terem maior acesso aos nutrientes disponibilizados pelas plantas (Baldani e Baldani 2005; Sala et al., 2007; Wichern et al., 2008). Além disso, há ainda a competição dos microrganismos endofíticos com os demais microrganismos presentes no solo ou substrato, quando ocorre a inoculação (Baldani et al., 1986).

Os exsudados liberados pelas raízes das plantas (lisados e ácidos orgânicos) selecionam as bactérias inoculadas. Tais produtos estão envolvidos na quimiotaxia das bactérias em direção as raízes, levando a seleção das bactérias (Antonyuk e Evseeva, 2006; Sala et al., 2007).

#### 2.3.1.1 – Os gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia*

O gênero *Herbaspirillum* tem sua ocorrência um pouco mais restrita do que as demais espécies de diazotróficos atualmente conhecidas. *H. seropedicae* foi isolada primeiramente por Baldani et al. (1986), em associação com raízes de arroz (*Oryza sativa*), milho (*Zea mays*) e sorgo (*Sorghum bicolor*), e apresenta baixa sobrevivência em solo sem cultivo (Baldani et al., 1992, Baldani et al., 1996).

Esse gênero apresenta uma alta capacidade de fixação de nitrogênio. Para se ter uma ideia, dependendo da estirpe e da variedade de arroz, algumas espécies de *Herbaspirillum* podem fixar de 19 a 54% do nitrogênio requerido por esta cultura (Kennedy et al., 2004).

Espécies de *Herbaspirillum* também podem contribuir para o crescimento vegetal através de outros fatores, além da FBN. Na espécie *H. seropedicae* foi detectada a produção de ácido indol acético (AIA) e giberelinas A1 e A3 (Bastián

et al., 1998, Radwan et al., 2002). Além disso, foi detectada a presença da enzima ACC deaminase em *Herbospirillum seropedicae* (Zhu et al., 2012)

As bactérias pertencentes ao gênero *Burkholderia* podem ser patógenos humanos, animais e vegetais (Burkholder, 1950; Isles et al., 1984; Whitlock et al., 2007), e também promotores do crescimento vegetal (TrânVan et al., 2000; Peix t al., 2001) e degradadores de poluentes (Zhang et al., 2000). Diversas espécies do gênero *Burkholderia* também são capazes de fixar nitrogênio atmosférico em simbose, vida livre ou em associações com vegetais (Moreira et al., 2010).

Segundo Baldani et al. (1995) quando *Burkholderia* foi inoculada numa mistura com *H. seropedicae* em plantas de arroz foram responsáveis por 19 a 35% do N acumulado na planta via FBN. Além da fixação de nitrogênio (N), bactérias do gênero *Burkholderia* podem solubilizar fosfato e sideróforos, sintetizar AIA, além de atuar como antagonista a patógenos, como o fungo *Fusarium subglutinans f. sp. ananas* (Baldoto, 2009, Jiang e Hartung, 2008, Luvizotto, et al., 2008, Vandamme et al., 2007). Estirpes de *Burkholderia* também podem auxiliar no crescimento vegetal mantendo baixos os níveis de etileno na planta por meio da ação da enzima ACC deaminase (Glick et al., 1998).

### 2.3.1.2 – Efeitos das BPCV na tolerância de plantas a condição de estresse

Devido às características citadas anteriormente, as BPCV podem utilizar mecanismos comuns de mitigação a estresses ambientais como deficiência ou excesso de água, deficiência nutricional ou toxicidade por metais pesados (Potters et al., 2007).

Atualmente sabe-se que existe uma estreita relação entre a expressão de genes e a resposta de plantas com relação à tolerância a estresses bióticos e abióticos, fazendo com que as plantas sobrevivam a condições como, por exemplo, o estresse hídrico, sendo que a utilização de microrganismos benéficos pode ajudar na expressão de tais genes (Saravanakumar et al., 2011).

Saravanakumar et al. (2011) observaram uma maior resistência de *Vigna radiata* a estresse hídrico quando utilizou a bactéria *Pseudomonas fluorescens*, assim como uma maior atividade das enzimas catalase e peroxidase, que são responsáveis pela eliminação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado devido à indução do estresse.

Dentre os compostos exsudados pelas BPCV podemos incluir osmólitos que podem agir sinergisticamente com os osmo-tolerantes produzidos pelas plantas como glicina-betaína e prolina aumentando a tolerância ao estresse hídrico (Yuwono et al., 2005). Por isso é comum se observar aumento no conteúdo relativo de água, potencial hídrico foliar, fração apoplástica de água em plantas inoculadas com essas bactérias (Casanovas et al., 2002; Dimkpa et al., 2009).

A inoculação de bactérias endofíticas também pode aumentar a expressão de aquaporinas (Zawoznik et al., 2011), que são proteínas de canal responsáveis pelo transporte de água e pequenas moléculas neutras através da membrana celular, agindo no ajustamento do fluxo de água em condições críticas da planta (Kaldenhoff e Fischer, 2006). Essas proteínas também são fundamentais para aumentar a taxa de transporte de gases nas células, como o CO<sub>2</sub>, que é transportado por difusão (Prasad et al. 1998, Terashima e Ono 2002).

Creus et al. (2004) relataram que a inoculação de bactérias do gênero *Azospirillum* em plantas de cereais submetidas a estresses hídricos apresentaram maiores conteúdos de magnésio (Mg), potássio (K) e cálcio (Ca).

Dobbelaere et al. (1999) e Cassan et al. (2001) relatam que a influência de BPCV sobre a produção de fitohormônios que permitem alterações fisiológicas e morfológicas que conferem uma melhor tolerância ao estresse hídrico.

Segundo Pereyra et al. (2006), a inoculação de bactérias alteram a elasticidade das paredes celulares das raízes e poderia ser, segundo esse autor, um dos primeiros passos para a promoção da tolerância de plantas a deficiência de água, pois ocorre um incremento na produção de raiz e biomassa de maneira geral (Dimkpa et al., 2009).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1- Localização:

O experimento foi realizado entre os meses de junho e novembro de 2013, em condições de casa de vegetação sob estrutura telada, localizada no campus da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, em Campos dos Goytacazes-RJ, (21°44'47" S e 41°18'24" W e 10 m de altitude).

#### 3.2- Material Vegetal:

Foram utilizadas plantas de abacaxizeiro 'Vitória', oriundas de cultivo *in vitro*, cedidas pelo Laboratório de Biotecnologia BioMudas de Venda Nova do Imigrante – ES. Tais plantas foram doadas com 30 dias de aclimatização em bandejas de 200 células, como volume da célula igual 14 mL, contendo o substrato Vivatto®.

#### 3.3- Crescimento Bacteriano, Transplântio e Inoculação:

Foram utilizadas as bactérias diazotróficas endofíticas: *Burkholderia silvatlantica* UENF 117111, isoladas de plantas de abacaxizeiro (Santos, 2008) e *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC-54, isoladas de cana de açúcar (Olivares, 1997), sendo as duas bactérias endofíticas e fixadoras de nitrogênio.

Os isolados bacterianos foram provenientes da coleção de bactérias diazotróficas do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – LBCT/UENF. Estas cresceram em meio líquido DYGS (Döbereiner et al., 1995) por 24 h, em agitador a 120 rpm, a 30°C.

Aos 60 dias de aclimatização, as plantas foram transplantadas da bandeja para vasos de 1L no final da tarde, para evitar as temperaturas mais altas, que podem levar à desidratação das mudas. Suas características biométricas podem ser observadas no Quadro 1.

Quadro 1. Características Biométricas médias da mudas no dia do transplântio, aos 60 dias de aclimatização

	Altura de planta (mm)	Diâmetro da roseta (mm)	Número de Folhas
	34,9	67,26	10
Desvio Padrão	0,41	0,83	0,95
CV(%)	11,69	12,48	9,65
n = 90			

Foi utilizado o substrato comercial Vivatto®, cuja análise química, conforme recomendação da Embrapa (2009) se encontra no Quadro 2.

Quadro 2. Análise Química do substrato comercial Vivatto®

pH	P	K	Ca	Mg	Al	H+Al	Na	C	MO	S.B.	T	t	m	V	Fe	Cu	Zn	Mn
	mg/dm <sup>3</sup>		cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>				g/Kg	g/dm <sup>3</sup>	cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>			%	mg/dm <sup>3</sup>					
5,9	484	961	15,7	6,2	0,0	6,7	0,93	6,96	120,0	25,3	32,0	25,3	0	79	87,0	1,2	18,6	49,2

Conforme as recomendações Embrapa (2009): C = dicromatometria em meio ácido; P e K<sup>+</sup> = extrator Carolina do Norte; Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> e Al<sup>3+</sup> = extrator KCl 1mol L<sup>-1</sup> (Análises feitas no Laboratório de Análise de Solos e Fertilizantes da UFRRJ, Campus Leonel Miranda. Campos dos Goytacazes, RJ). Onde: C= teor de carbono orgânico; pH= potencial hidrogeniônico em água; P e K= fósforo e potássio disponível; Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>3+</sup>= cálcio e magnésio trocável; H+Al= acidez potencial; SB= soma de bases (K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>3+</sup>); T= capacidade de troca de cátions= SB+(H+Al) ; t= capacidade efetiva de troca de cátions= SB+Al<sup>3+</sup>; m= saturação de Al<sup>3+</sup> ; V= saturação por bases.

O substrato não foi autoclavado, para uma melhor representação de condições reais de cultivo. De acordo com informações retiradas da embalagem do substrato utilizado, o mesmo apresentava Capacidade de Retenção de Água (CRA) de 40% e Porosidade Total igual a 90%.

No mesmo dia em que foi feito o transplante das mudas para os vasos, foi feita a inoculação das bactérias com auxílio de pipeta automática. Para tanto, foram aplicados 10 mL do meio DYGS + bactérias, ao redor das mudas, como mostra a Figura 2.



Figura 2. Inoculação das Bactérias.

O procedimento foi o mesmo para os tratamentos sem bactérias, porém, foram aplicados 10 mL do meio de DYGS, sem crescimento bacteriano.

A inoculação de bactérias e aplicação do meio DYGS autoclavado foram feitas apenas no transplante das mudas para os vasos.

#### 3.4- Tratamentos:

O experimento foi constituído dos seguintes fatores em estudo:

- Tratamento com aplicação da bactéria *Burkholderia silvatlantica* (UENF 117111), sem restrição hídrica (B1);

- Tratamento com aplicação da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* estirpe 54 (HRC-54) sem restrição hídrica (B2);
- Tratamento com aplicação da bactéria *Burkholderia silvatlantica* (UENF 117111), com restrição hídrica (B1+RH);
- Tratamento com aplicação da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* estirpe 54 (HRC-54), com restrição hídrica (B2+RH);
- Tratamento controle, sem aplicação de bactérias (aplicação de meio DYGS autoclavado) e sem restrição hídrica (C);
- Tratamento controle sem aplicação de bactéria (aplicação de meio DYGS autoclavado) e com restrição hídrica (C+RH).

Quadro 3. Tratamentos

Bactérias	Aplicação de restrição hídrica	Nome do Tratamento
UENF 117111	Não	B1
HRC – 54	Não	B2
UENF 117111	Sim	B1RH
HRC – 54	Sim	B2RH
Sem bactéria	Não	C
Sem bactéria	Sim	CRH

### 3.5- Condições de Cultivo e Aplicação da Restrição Hídrica:

As plantas não receberam irrigação nas primeiras 16 horas após o transplântio para que as bactérias tivessem maior tempo de contato com o sistema radicular.

Após esse período, a irrigação foi feita duas vezes ao dia, dependendo do nível de umidade do substrato, até a saturação do mesmo. De acordo com a CRA do substrato, a saturação era atingida com volume de água em torno de 400 mL, que corresponde a 40% do volume do substrato presente no vaso, que era de aproximadamente 1L. A água foi aplicada diretamente ao substrato com auxílio de

mangueira. No dia 11 de outubro, após o período de adaptação, 120 dias, os tratamentos com restrição hídrica foram aplicados.

A imposição da restrição hídrica foi feita até o dia em que a taxa fotossintética líquida de tais tratamentos atingiu valores próximos a zero (estresse máximo – 24 dias). Então, as plantas foram reirrigadas por dois dias para que fosse avaliada a recuperação dos tratamentos supracitados. Os tratamentos não submetidos à restrição hídrica foram mantidos até o final do experimento.

Todos os tratamentos foram adubados, uma vez por mês com o adubo Ouro Verde<sup>®</sup> e com o formulado 14-16-18, cedidos pela BioMudas, ambos na concentração de 2 g.L<sup>-1</sup> sendo usado o volume de 10 mL por vaso. Os adubos aplicados em dias diferentes e respeitando o intervalo de dois dias entre as aplicações. A adubação foi realizada apenas antes da imposição da restrição hídrica.

As condições ambientais da casa de vegetação (temperatura (T°), fluxo de fótons fotossintético (FFF) e umidade relativa do ar (UR)) foram monitoradas pelo sensor Data Logger WatchDog<sup>®</sup> (Spectrum Technology, Illinois – Estados Unidos da América). As coletas dos dados foram feitas em intervalos de 30 minutos durante todo o experimento. A partir dos dados de T° e UR, foi obtido o déficit de pressão de vapor do ar (DPV), segundo equação proposta por Jones (1992).

$$DPV = 0,61137 * \exp (17,502 * T^{\circ} / 240,97 + T^{\circ}) * (1,0 - (UR\% / 100)),$$

onde:

*DPV*: Déficit de Pressão de Vapor;

*exp*: Exponencial;

*T°*: Temperatura em graus Celsius;

*UR%*: Umidade Relativa.

Os valores máximos, mínimos e médios desses parâmetros descritos anteriormente se encontram na Figura 3.

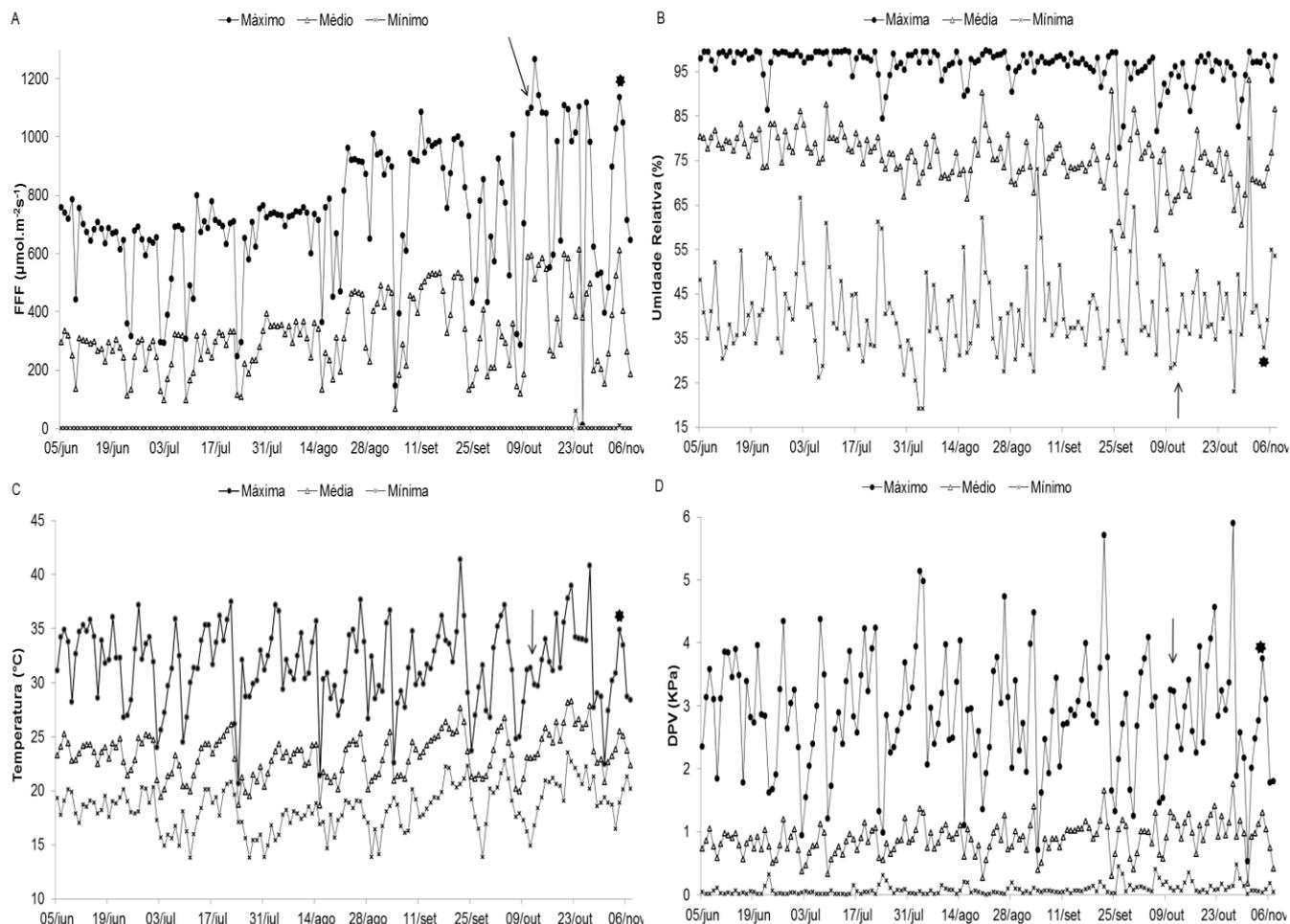


Figura 3. Fluxo de Fótons Fotossintéticos - FFF (A), Temperatura (B), Umidade relativa (C) e Déficit de Pressão de Vapor do ar - DPV (D) durante o período experimental. As setas indicam o início da imposição da restrição hídrica e os asteriscos indicam o dia em que foi feita a reirrigação.

Foi feito também, um acompanhamento da umidade do substrato, utilizando um medidor de umidade de solo, modelo MO750 – Extech, com o qual foram feitas 30 amostragens (em 15 plantas não irrigadas e 15 irrigadas) a cada 4 dias, após o início da imposição da restrição hídrica nos devidos tratamentos. O medidor fornece índices de 0 a 50, de acordo com a umidade do substrato, sendo que quanto maior o índice, maior a umidade. Dessa forma, considerou-se o valor de 50, correspondendo a 100% de umidade no substrato, e com base nos dados obtidos, fez-se a conversão dos índices para porcentagem de umidade do substrato, como apresentado na Figura 4.

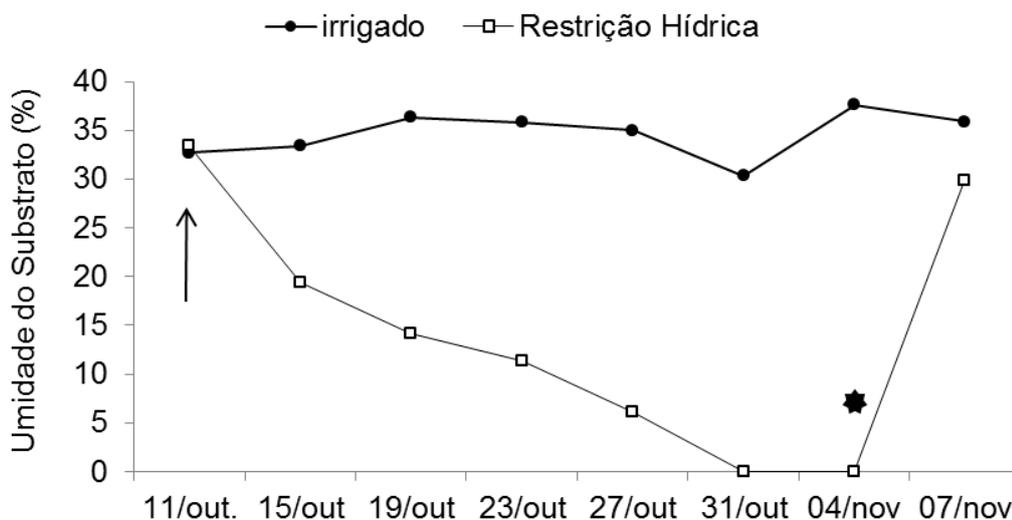


Figura 4. Percentual de Umidade do substrato irrigado e sob restrição hídrica ao longo do período de imposição do estresse. A seta indica o início da imposição da restrição hídrica e o asterisco indica o dia em que foi feita a reirrigação.

### 3.6- Contagem Bacteriana

Tal procedimento foi realizado 24 horas após a inoculação das bactérias e ao final do experimento, sendo a amostragem feita em 2 plantas. Foram adotados os procedimentos descritos por Döbereiner et al. (1995), em que amostras de raízes das plantas (1 g) foram lavadas em água corrente e posteriormente foram maceradas, diluídas serialmente e semeadas em meios semissólidos sem adição de N. Para os tratamentos contendo a bactéria *Burkholderia silvatlantica*, foi utilizado o meio JMV. Para os tratamentos contendo a bactéria *Herbaspirillum seropedicae*, foi utilizado o meio JNFb (Döbereiner et al.,1999). Para os tratamentos controle, a contagem foi realizada com uso dos dois meios. A quantificação dos níveis populacionais se deu pela expressão do número mais provável (NMP) pela consulta a Tabela de Mc Crady, sete dias após a incubação dos frascos contendo o meio de cultura a 30 °C.

3.7- Métodos empregados para caracterização da promoção do crescimento vegetal:

No dia da imposição do estresse hídrico (120 dias após a inoculação das bactérias) e no último dia do experimento, foram determinados:

#### *Altura*

A altura da base da planta até o ápice da folha mais ereta foi determinada por meio de uma régua milimétrica;

#### *Diâmetro*

O diâmetro da roseta foi determinado medindo-se o comprimento de ponta a ponta das folhas mais opostas das mudas, com auxílio de uma régua milimétrica.

#### *Número de Folhas*

O número de folhas foi determinado através da contagem desses órgãos.

#### 3.7.1- Análises destrutivas

Ao final do experimento, foram feitas análises destrutivas. Assim, as plantas tiveram parte aérea separada das raízes e, portanto, além das variáveis citadas acima, foram determinados:

#### *Área Foliar*

As folhas foram separadas e a área foliar foi determinada com o auxílio do medidor de área foliar de bancada (modelo LI-3100 - LI-COR, Lincoln, NE, USA).

### *Massa Seca de Parte Aérea e de Raiz (MSPA e MSR)*

Após a determinação da área foliar, as partes foram postas em envelopes de papel, separadamente, e colocadas para secar em estufa de ventilação forçada a 70 °C, e após 72 horas foram, então, pesadas para obtenção das medidas de massa seca (parte aérea e do sistema radicular).

### 3.8- Análise Nutricional

Após a determinação da massa da matéria seca, toda a parte aérea das mudas de abacaxizeiro foi macerada em almofariz. As avaliações foram feitas no Centro de Análises da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ - Campus Dr. Leonel Miranda, Campos dos Goytacazes - RJ.

Foram pesados 100 mg por repetição de cada tratamento. O material triturado foi submetido à oxidação por meio da digestão sulfúrica ( $H_2SO_4$  e  $H_2O_2$ ), obtendo-se um extrato onde serão determinados os teores de macronutrientes. O N foi determinado pelo método de Nessler (Jackson, 1965). O P foi determinado colorimetricamente pelo método azul de molibdato (Malavolta et al., 1997) por espectrofotometria, e o K por meio da espectrofotometria de emissão de chama. Os nutrientes Ca e Mg foram determinados pelo espectrofotômetro de absorção atômica (Zeiss, AAS4 - Alemanha).

### 3.9- Métodos empregados para determinar a capacidade fotossintética:

Após a aplicação da restrição hídrica, foram feitas as seguintes avaliações:

#### *Trocas Gasosas*

Foram feitas determinações das trocas gasosas (fotossíntese - A,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), condutância estomática ( $g_s$ ,  $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), transpiração (E,  $\text{mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar ( $DVP_{\text{folha-ar}}$ , KPa)), utilizando o analisador de gás infravermelho LI 6200 (LI-COR, Lincoln, NE, USA). Tais avaliações foram feitas a cada 4 dias, a partir do primeiro dia do início da imposição do estresse hídrico, entre 07:00 h e 09:00 h e entre 20:30h e 23:30 h,

sendo que no dia do início da aplicação da restrição hídrica (tempo zero – T0), o procedimento foi realizado apenas no período da manhã. A medição foi feita em uma parte central da folha D da muda e utilizou-se luz artificial por meio de LED's vermelhos a uma intensidade de  $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Essas avaliações foram feitas até que a taxa fotossintética líquida dos tratamentos sob restrição hídrica fosse próxima de zero (estresse máximo). Em seguida, todos os tratamentos foram irrigados e dois dias depois, esse procedimento foi repetido para avaliar a recuperação das plantas que receberam a restrição hídrica, e nesse momento o experimento foi finalizado.

#### *Intensidade de verde*

Foram feitas as avaliações para aferir a intensidade de verde, por meio do medidor portátil de clorofila SPAD-502 Chlorophyll Meter (Minolta, Japão). Foram realizadas cinco leituras em cada planta, em folhas distintas, escolhidas aleatoriamente, para obtenção da média de cada planta. Tal avaliação foi realizada logo após a determinação das trocas gasosas, sendo feitas 5 medidas por planta, para determinação da média.

#### *Rendimento quântico máximo do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) e Índice Fotossintético “photosynthetic index” (PI)*

O rendimento quântico máximo do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) e o índice fotossintético (PI) foram medidas por meio do fluorímetro não-modulado, modelo *Pocket PEA Chlorophyll Fluorimeter* (Hansatech Instruments – King's Lynn, Norfolk).

Durante as medidas, foram utilizadas pinças para adaptação dos cloroplastos ao escuro, para que todos os centros de reação do fotossistema II (PSII) adquirissem a condição de “abertos” e a perda de calor fosse mínima (Strasser et al, 2000). Após essa adaptação, um único pulso forte de luz  $1\text{s}^{-1}$  ( $3500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) foi aplicado com a ajuda de três diodos emissores de luz (650 nm).

Essas avaliações foram realizadas logo após e na mesma folha em que foram realizadas as determinações de trocas gasosas.

### 3.10 - Densidade estomática, diâmetro e comprimento do poro estomático:

Quando a fotossíntese das plantas atingiu valores próximos a zero, a parte mediana da folha “D” foi fixada em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato. Em seguida foram lavadas por três vezes em tampão fosfato e desidratadas em série etanólica crescente. Após seleção, as amostras foram transferidas para o equipamento Critical Point Drying Apparatus (Mod CPD 030, Bal-tec). Após secagem, foram metalizadas utilizando o Automatic Sputter Coater SCD 050, Bal-tec. Finalizado este processo, as amostras estavam prontas para observação no microscópio eletrônico de varredura DSEM 962 (Zeiss). As imagens foram analisadas com o objetivo de se determinar o número de estômatos por área (densidade) e o comprimento e largura central do poro estomático. Para determinação da densidade, contou-se o número de estômatos em áreas determinadas. Com relação à largura e ao comprimento do poro, as medidas foram feitas com auxílio de uma régua. Para todas as análises, levou-se em consideração o valor da escala de cada imagem e utilizou-se a parte basal das folhas.

### 3.11 - Determinação da Composição isotópica do carbono:

No dia do estresse máximo e na recuperação, a parte aérea das plantas foi coletada e colocada na estufa à 70 °C por 72h para a determinação da composição isotópica. Para tanto, as folhas secas foram moídas em moinho de Faca Tipo Willy - MSSL-031, e sub amostras de 1mg foram pesadas em cápsula de estanho e analisadas, no Laboratório de Ciências Ambientais (Grupo de Biogeoquímica de Ecossistemas Aquáticos – UENF). As razões isotópicas foram determinadas em espectrômetro de massa isotópica Thermo Delta V Advantage acoplado a analisador elementar Flash 2000 onde é feita a combustão. Os compostos orgânicos, oxidados na presença de oxigênio ultrapuro e de catalisador, são transformados em CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O. Estes gases são separados em linha por cromatografia antes da análise isotópica que também se processa em linha. Os resultados são obtidos inicialmente relativos a padrões de trabalho para depois serem expressos em relação ao carbonato da formação Pee Dee (Belemnite) para  $\delta^{13}\text{C}$  (Meyers, 1994; Cloern et al., 2002). Os resultados da composição isotópica do carbono foram expressos em termos de  $\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$ . Vale

ressaltar que a primeira coleta do material para análise foi realizada no período da manhã (estresse máximo) e a segunda foi realizada à noite (recuperação).

### 3.12 - Delineamento Estatístico:

O delineamento empregado foi o inteiramente casualizado. Foram no total seis tratamentos. As análises de altura, diâmetro, número de folha foram determinados em 15 repetições. Para área foliar e massa seca de parte aérea e de raiz, foram utilizadas 10 repetições. A fixação das amostras para microscopia foi feita em folhas de três plantas por tratamento, sendo que a largura central do poro estomático e seu comprimento foram determinados em 15 repetições (estômatos) e a densidade estomática foi medida em 5 repetições (imagens). As medições de trocas gasosas,  $F_v/F_m$ , PI, Intensidade de verde foram feitas em 4 plantas. E por fim, as avaliações de nutrientes foliar e composição isotópica do carbono foram feitas em 3 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa ASSISTAT 7.0 BETA - 2013.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 – Contagem Bacteriana

As bactérias endofíticas são encontradas geralmente em maior número nas raízes, decrescendo progressivamente do caule às folhas, o que mostra que o sistema radicular é a principal porta de entrada para esses microrganismos (Olivares et al., 1996).

Quando a bactéria diazotrófica é introduzida, por inoculação, em plantas expostas a condições que não são *in vitro*, a multiplicação e o estabelecimento na rizosfera são fatores importantes para obtenção dos benefícios propiciados por essas na associação com plantas não-leguminosas, uma vez que precisam competir tanto com os microrganismos presentes no substrato como com os existentes no interior da planta, que podem ter maior acesso aos nutrientes disponibilizados (Baldani et al., 1986; Baldani e Baldani, 2005). Dessa forma, o processo de colonização de raízes e da planta, de maneira geral, por bactérias específicas não é tarefa fácil, e sua quantificação deve ser realizada utilizando meios de cultura semiespecíficos e que sejam, de alguma forma, seletivos como é o caso dos meios JNFb e JMV. Eles não possuem nitrogênio em sua composição, e, portanto, só permitem o crescimento de microrganismos capazes de fixar o nitrogênio atmosférico (Döbereiner et al., 1999).

De acordo com Döbereiner et al. (1999), o meio de cultura JNFb é adequado para efetuar o isolamento de *Hebaspirillum spp.*, enquanto que o meio

de cultura JMV é utilizado para o isolamento e purificação de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia*. Isso explica a utilização dos dois meios de cultura para a contagem dos respectivos microrganismos e o porquê da utilização dos dois meios de cultura para os tratamentos controle. Sendo assim, as discussões nesse sentido serão sempre realizadas comparando-se os valores obtidos nas contagens (Quadro 4 e 5) dos tratamentos controle e inoculados, utilizando o mesmo meio de cultura.

O Quadro 4 representa o Número Mais Provável (NMP) de bactérias diazotróficas associadas às raízes do abacaxizeiro 'Vitória' 24 horas após a inoculação bacteriana. Podemos observar que tanto a inoculação da bactéria *Burkholderia silvatlantica* UENF 117111 (B1) quanto da *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC-54 (B2) promoveu um aumento de aproximadamente 3 vezes na população de bactérias diazotróficas em relação ao tratamento Controle.

Quadro 4. Contagem do Número Mais Provável (NMP) de bactérias diazotróficas em um grama de raiz do abacaxizeiro 'Vitória' 24 horas após a inoculação bacteriana. C – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias; B1 – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111; B2 – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54

Tratamentos	Meio de cultura	Número Mais Provável de Bactérias Diazotróficas por grama de raiz
		24 horas após inoculação
<b>C*</b>	JNFb	$1,98 \times 10^6$
<b>C *</b>	JMV	$1,75 \times 10^7$
<b>B1</b>	JMV	$4,83 \times 10^7$
<b>B2</b>	JNFb	$6,00 \times 10^6$

\* Representa a população de bactérias diazotróficas associadas naturalmente à planta hospedeira.

O aumento encontrado não foi substancial a ponto de haver alteração em escala logarítmica, como o obtido por outros autores. Marques Júnior et al. (2008) ao realizarem estudos com inoculação de *H. seropedicae* em cana-de-açúcar, evidenciaram aumentos de 5 unidades logarítmicas na população bacteriana associada à planta. Conceição et al. (2008) ao introduzirem essa mesma bactéria, porém em milho, obtiveram aumentos em 4 unidades logarítmicas decorrentes da

introdução do microrganismo em questão. Já Baldotto et al. (2010), obtiveram elevação na população bacteriana, resultante da inoculação de *Burkholderia* spp., em 3 unidades logarítmicas. Nesses três trabalhos, os tratamentos inoculados apresentavam populações bacterianas na ordem de  $10^6$  a  $10^7$ .

Como podemos observar no Quadro 4, os valores obtidos nesse experimento para todos os tratamentos (incluindo o C), 24 horas após a inoculação, também se encontravam nessa mesma ordem de grandeza ( $10^6$  a  $10^7$ ), o que mostra que o diferencial para se ter obtido um menor incremento no NMP dos tratamentos inoculados em relação aos controles foi a alta carga bacteriana associada naturalmente à planta hospedeira.

Para os tratamentos não inoculados, a constatação da presença de bactérias, ainda que em menor quantidade do que os demais tratamentos, 24 horas após a inoculação, condiz com Weber et al. (1999). Rosenblueth e Martínez-Romero (2004) também encontraram estirpes associadas naturalmente às plantas que eram igualmente competitivas para colonizar a rizosfera e os tecidos internos do sistema radicular. Além disso, a presença natural de bactérias diazotróficas associadas ao abacaxizeiro já foi relatada por Baldotto (2009).

Uma possibilidade para explicar o alto nível populacional de bactérias diazotróficas nas plantas controle é a contaminação com as bactérias provenientes das plantas inoculadas ou durante a manipulação do inóculo. Segundo Leifert e Cassells (2001) a contaminação de plantas não é rara. Além disso, as bactérias diazotróficas colonizam as mudas com muita facilidade (Weber et al., 2003a). Entretanto, essa possibilidade pode praticamente ser descartada, pois a inoculação das mudas foi feita separadamente, tratamento por tratamento, sempre trocando as ponteiras, sendo os tratamentos deixados separados uns dos outros. Além disso, havia grande cuidado com respingos durante a irrigação.

Dessa forma, a existência natural de bactérias diazotróficas pode ser atribuída ao fato de que as mudas, no presente trabalho, foram inoculadas 60 dias após a sua retirada do ambiente *in vitro* para a aclimatização. Assim, a exposição das plantas às condições de casa de vegetação aliada à presença de uma considerável carga de matéria orgânica no substrato, de  $120 \text{ g/dm}^3$  (Quadro 2), fez com que houvesse um aumento natural no número de bactérias associadas às plantas, e conseqüentemente, obteve-se um menor efeito do inoculante no incremento populacional.

O substrato é um fator primordial no processo de inoculação, principalmente quando o inoculante é disposto sobre ele. Weber et al. (2003b), destacam a importância do substrato utilizado, principalmente com relação à capacidade de formação de agregados ao redor das raízes, o que pode facilitar o processo de estabelecimento bacteriano nas mesmas. Weber et al. (2003a) ao inocularem a bactéria diazotrófica endofítica *Asaia bogorensis* em mudas micropropagadas de abacaxizeiro obtiveram valores diferenciados de NMP em função do substrato utilizado, chegando em média a um aumento de uma unidade logarítmica nos tratamentos inoculados com relação ao controle. Para alguns substratos, não houve alteração na unidade logarítmica, apesar de ter havido aumento populacional, como o que ocorreu no presente trabalho. Isso evidencia que a aplicação das bactérias via substrato, gera valores menores de incremento no NMP de bactérias diazotróficas em relação às plantas controle.

A eficiência no aumento na população bacteriana, portanto, é influenciada pelo momento, pelas condições em que as plantas se encontram e pela forma como a inoculação é realizada. Baldotto et al. (2010) por exemplo, obtiveram maiores incrementos nos valores de NMP nos tratamentos inoculados em relação ao controle, quando comparado com o presente trabalho, devido à inoculação e, conseqüentemente, à contagem do NMP terem sido realizadas no momento da retirada das plantas das condições *in vitro*. Já Marques Júnior et al. (2008), só conseguiram o grande aumento populacional, quando os toletes de cana foram previamente tratados termicamente para desinfestação. Além disso, tanto Baldotto et al. (2010) como Conceição et al. (2008), fizeram a inoculação por imersão das raízes das plantas e da semente, respectivamente, sendo o segundo trabalho realizado *in vitro*.

Os microrganismos associados naturalmente às plantas podem atuar de forma antagonica aos inoculados devido à competição, principalmente por carboidratos (Sturz e Christie 1995). Assim, a presença daqueles microrganismos pode ter influenciado para que o incremento no NMP em relação ao controle fosse baixo quando comparado com valores observados em outros trabalhos. Entretanto, ainda assim, a inoculação foi efetiva, resultando em aumentos no NMP. Além disso, de qualquer maneira, os níveis populacionais obtidos com a inoculação das duas bactérias, no presente trabalho, estão de acordo com a literatura e parecem ser satisfatórios. Baldotto (2009), por exemplo, ao inocular

*Herbaspirillum seropedicae* estirpe RAM10, em plântulas de abacaxizeiro, observou incrementos iniciais da população bacteriana e posterior decréscimo, estabilizando, após 21 dias de inoculação, em valores de aproximadamente  $10^6$  células por grama de matéria fresca, e esse valor promoveu efeitos positivos na interação planta-bactéria, no que se refere à promoção do crescimento vegetal. Esse mesmo fato foi observado por James et al. (2002).

O incremento populacional pode não ser diretamente proporcional às respostas relacionadas à promoção de crescimento vegetal. Weber et al. (2003b) encontraram respostas positivas resultantes da interação, mesmo com os valores de incremento populacional baixos. Fato é que, as bactérias diazotróficas associadas naturalmente às plantas, podem promover tantos benefícios quanto as introduzidas por inoculação, já que não se sabe suas propriedades.

O Quadro 5 apresenta os valores de NMP de bactérias diazotróficas no dia do estresse hídrico máximo. Como podemos observar, comparando os valores com o Quadro 4, houve a redução no NMP de todos os tratamentos, quando comparado com os valores obtidos 24 horas após a inoculação. Além disso, a imposição do estresse hídrico causou uma redução no NMP dos tratamentos controle (com uso do meio JNFb) e contendo B2, sendo os demais inalterados. Ainda assim, todos os tratamentos inoculados (estressados ou não) apresentavam populações bacterianas maiores do que seus respectivos controles. Isso é uma evidência de que a inoculação bacteriana, realizada no início do experimento, foi efetiva.

Quadro 5. Contagem do Número Mais Provável (NMP) de bactérias diazotróficas em um grama de raiz do abacaxizeiro 'Vitória' no dia de estresse máximo (24 dias após o início da imposição da restrição hídrica). C – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias; CRH – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias e submetido ao estresse hídrico; B1 – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111; B1RH – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111 e submetido ao estresse hídrico; B2 – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54; B2RH – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 e submetido ao estresse hídrico.

Tratamentos	Meio de cultura	Número Mais Provável de Bactérias Diazotróficas por grama de raiz
<b>C*</b>	JNFb	$3,97 \times 10^5$
<b>C *</b>	JMV	$7,12 \times 10^6$
<b>CRH*</b>	JNFb	$3,00 \times 10^5$
<b>CRH *</b>	JMV	$7,12 \times 10^6$
<b>B1</b>	JMV	$1,40 \times 10^7$
<b>B1RH</b>	JMV	$1,40 \times 10^7$
<b>B2</b>	JNFb	$4,50 \times 10^6$
<b>B2RH</b>	JNFb	$1,47 \times 10^6$

\* Representa a população de bactérias diazotróficas associadas naturalmente à planta hospedeira.

Estresses abióticos afetam o crescimento bacteriano dentro e fora da planta, como foi mostrado por Pereira et al. (2012), que obtiveram redução na população bacteriana em função do aumento da concentração salina no solo. Com relação ao estresse hídrico, especificamente, Lal e Rao (1990), já afirmavam que este contribui para a redução do NMP, fato posteriormente confirmado por Casanovas et al. (2002).

Além desses trabalhos, podemos citar Creus et al. (2004), que acompanharam uma redução na população bacteriana, embora muito pequena, com o passar do tempo e em resposta ao estresse hídrico, tanto em plantas inoculadas a campo com *Azospirillum brasilense*, como em plantas controle. Esses resultados também estão de acordo com Medeiros (2013), que obteve respostas semelhantes ao inocular *Herbaspirillum seropedicae* em tomateiro e simular o estresse hídrico com Polietileno Glicol 6000. Ao final do experimento, foram obtidos menores valores de NMP de bactérias diazotróficas endofíticas do que os encontrados no início do experimento, corroborando com o presente trabalho.

#### 4.2 - Caracterização da promoção do crescimento vegetal:

O período de aclimatização do abacaxizeiro é considerado crítico por causa das baixas taxas de crescimento do sistema radicular e da parte aérea, extremamente dependente de condições climáticas favoráveis, principalmente no que se diz respeito à disponibilidade de luz, que deve ser fornecida em qualidade e quantidade ideais (Hapton, 2003).

Nesta fase, ajustes estruturais e fisiológicos das plântulas às condições *ex vitro* são necessários para acomodar as mudas à fase subsequente de estabelecimento da cultura a campo (Barboza et al., 2006).

Tecnologias que proporcionem uma promoção do crescimento das plântulas de abacaxizeiro podem ter impactos significativos na produção e adaptação das mudas oriundas de cultura de tecidos no ambiente de produção. O uso de BPCV é uma dessas alternativas biotecnológicas que trazem benefícios como melhoria no desenvolvimento a partir da colonização, inicialmente da rizosfera pelas bactérias em questão (Kloepper et al., 2004).

A Figura 5 representa a altura e o diâmetro da roseta do abacaxizeiro 'Vitória' submetido aos respectivos tratamentos no dia que antecedeu a submissão ao estresse hídrico (tempo zero). Podemos observar que nesse dia, o tratamento B2 apresentou menor valor de altura (Figura 5 – A), diferindo estatisticamente do tratamento C. Para diâmetro da roseta (Figura 5 – B), na mesma data, o tratamento contendo B2, também apresentou menor média, diferindo estatisticamente do tratamento B1. No tempo zero, não houve diferença estatística tanto para altura como para diâmetro entre o tratamento inoculado com B1 e o tratamento C.

Nessa data, não houve diferença estatística entre os tratamentos para número de folhas (dados não apresentados).

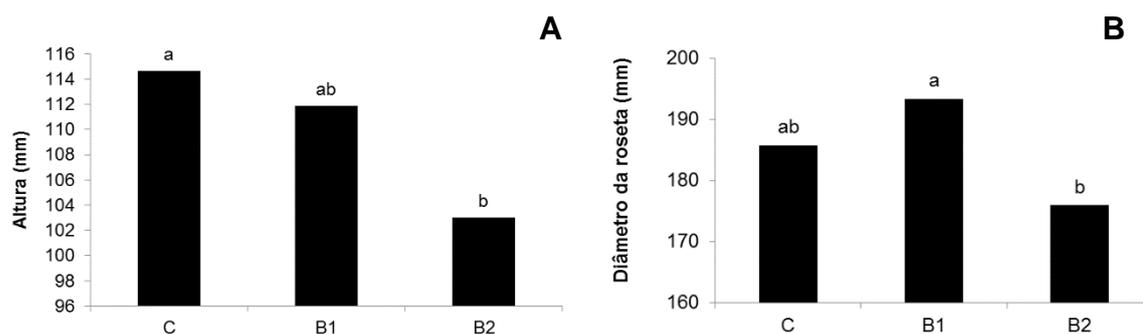


Figura 5. Altura (A) e Diâmetro da roseta (B) do abacaxizeiro ‘Vitória’ submetido aos respectivos tratamentos no tempo zero (antes da submissão ao estresse hídrico), 120 dias após a inoculação. Cada coluna representa média de 15 repetições. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente na mesma data, segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade. C – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias; B1 – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111; B2 – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54.

O gênero *Herbaspirillum* tem sido utilizado com frequência no sentido de tentar melhorar o desenvolvimento e produção de diversas culturas. Canellas et al. (2012) aumentaram a produção de grãos de milho em 20% devido ao uso individualizado da bactéria *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z67. Weber et al. (2000) obtiveram maior acúmulo de matéria fresca em bananeira ‘Prata-anã’ durante a aclimatização em resposta a inoculação de bactérias do tipo *Herbaspirillum*. Conceição et al. (2008), ao utilizarem a *Herbaspirillum seropedicae* (Z67) induziram o crescimento radicular de plântulas de milho. Resultados semelhantes foram obtidos por Radwan et al. (2004) ao inocularem bactérias do mesmo gênero em arroz e trigo. Por fim, Baldani et al. (2000) obtiveram incrementos no crescimento de plantas de arroz, devido à inoculação também da bactéria *Herbaspirillum seropedicae*.

Da mesma forma, as bactérias do gênero *Burkholderia* são potencialmente usadas na formulação de biofertilizantes, devido aos muitos mecanismos envolvidos na promoção do crescimento das plantas (Anandham et al., 2007). Baldotto et al. (2010) obtiveram para a aplicação de *Burkholderia spp.* em abacaxizeiro ‘Vitória’, incrementos significativos sobre as plantas controle nos parâmetros de crescimento de parte aérea e sistema radicular. Weber et al. (2003b) constataram que plantas micropropagadas de abacaxizeiros das

cultivares Perolera, Primavera, Pérola e Smooth Cayenne beneficiam-se da associação com bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia*. Outras espécies, tais como tomateiro (Jiang e Hartung, 2008), arroz (Baldani et al., 2000), milho (Jiang e Hartung, 2008) e videira (Ait Barka et al., 2000) também se beneficiaram com a interação com a *Burkholderia*.

Entretanto, nem sempre os resultados são consistentes ou simplesmente não se observam incrementos significativos no crescimento de plantas, como observado no presente trabalho (Figura 5). Aumentos significativos no crescimento de abacaxizeiro 'Cayenne Champac' em resposta a inoculação da bactéria *Asaia bogorensis* também não foram obtidos por Weber et al. (2003a).

Belimov et al. (2009) apesar de obterem respostas positivas resultantes da interação planta-bactéria, não obtiveram uma constância de resultados nos seus experimentos, sendo atribuídas às mudanças de metodologias e às condições de crescimento das plantas. Ou seja, os tratamentos utilizados nesse tipo de experimento são muito sutis e, portanto, vários fatores podem interferir nos resultados.

Giro (2011) obteve resultados semelhantes ao do presente trabalho, no qual a inoculação da bactéria *Burkholderia silvatlantica* não promoveu efeito significativo na promoção do crescimento das plantas de abacaxizeiro 'Vitória', sendo esse fato atribuído pelo autor, dentre outros fatores, pela presença de microrganismos no substrato, que continha vermicomposto, que podem ter competido com as bactérias introduzidas. Dessa forma, a ordem em que populações endofíticas são inoculadas e se estabelecem na planta pode afetar os efeitos da promoção de crescimento, devido, por exemplo, à competição por carboidratos (Sturz e Christie 1995, Marques Júnior et al., 2008).

Portanto, parece existir um equilíbrio entre os microrganismos endofíticos e a planta, que em certas condições pode ser desbalanceado, ou seja, reduz-se a capacidade de estabelecimento das bactérias no hospedeiro, e conseqüentemente, os efeitos benéficos da interação (Rosenblueth e Martínez-Romero, 2004). De fato, a presença de bactérias associadas naturalmente às plantas nesse experimento, como discutido no tópico anterior, pode ter contribuído para a não observação de maior crescimento das plantas bioinoculadas em comparação com as plantas que continham apenas a população de bactérias associadas naturalmente às plantas.

Com relação a B2 (*Herbaspirillum seropedicae* HRC54), a sua inoculação causou efeitos negativos no crescimento das plantas. Alguns microrganismos endofíticos que são benéficos podem atuar de maneira contrária, dependendo do estágio de desenvolvimento do hospedeiro e suas respostas de defesa, além das condições ambientais (Schulz e Boyle, 2005). Van Peer et al. (1990) destacam que, com frequência, são encontradas algumas bactérias endofíticas isoladas de plantas saudáveis que inibem o crescimento de tomate. Olivares et al. (1997) observaram que a presença de bactérias do gênero *Herbaspirillum* podem levar à formação de mosqueados em folhas de algumas variedades de cana-de-açúcar, mas em muitos hospedeiros não tem aparecimento de qualquer tipo de sintoma. Dessa forma, a bactéria pode se comportar de diversas maneiras dependendo da planta, e como foi observado no presente trabalho, a presença de B2 levou a redução na altura e diâmetro do abacaxizeiro.

Vale a pena destacar que B2 não é uma estirpe nativa do abacaxizeiro como B1, e foi isolada de cana-de-açúcar. Isso pode ter contribuído para a obtenção dos resultados observados (Figura 5) já que esse tipo de situação aumenta a competição com os microrganismos nativos e dificulta o estabelecimento e, conseqüentemente, a observação dos efeitos benéficos resultantes da interação simbiótica (Sturz e Christie 1995).

Se as bactérias, além de promoverem o crescimento das mudas, forem eficientes para reduzir estresses abióticos como o estresse hídrico, que é um dos problemas enfrentados por plantas micropropagadas durante a aclimatização e que também limita o crescimento e a produtividade de culturas no campo, será um grande avanço e terá validade para muitas situações, permitindo o melhor desenvolvimento vegetal (Barboza et al., 2006, Itzigsohn et al., 2000, Kramer e Boyer, 1995).

A Figura 6 representa a altura e o diâmetro da roseta do abacaxizeiro 'Vitória' submetido aos respectivos tratamentos no dia do estresse máximo, 24 dias após o início da imposição da restrição hídrica. Com relação a essa data, o mesmo que foi dito para o tempo zero pôde ser observado com relação aos tratamentos contendo B1 e os tratamentos controle (não diferiram estatisticamente para altura e diâmetro). Ou seja, nem a imposição da restrição hídrica e nem a inoculação de B1, causou mudanças nesses parâmetros biométricos.

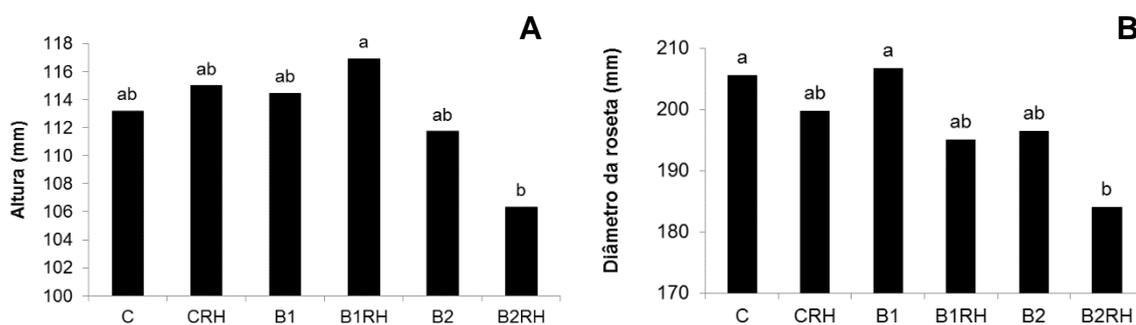


Figura 6. Altura (A) e Diâmetro da roseta (B) do abacaxizeiro 'Vitória' submetido aos respectivos tratamentos, no estresse máximo (24 dias após a suspensão da irrigação). Cada coluna representa média de 15 repetições. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente na mesma data, segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade. C – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias; CRH – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias e submetido ao estresse hídrico; B1 – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111; B1RH – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111 e submetido ao estresse hídrico; B2 – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54; B2RH – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 e submetido ao estresse hídrico.

Ainda observando a altura e o diâmetro da roseta (Figura 6), podemos notar que embora o tratamento B2 não tenha diferido estatisticamente dos demais tratamentos no estresse máximo, o tratamento B2RH apresentou as menores médias, diferindo estatisticamente em altura do tratamento B1RH em diâmetro dos tratamentos C e B1, reforçando o que foi dito anteriormente com relação à influência da inoculação da bactéria B2, em relação à resposta de crescimento, além de mostrar o efeito do estresse nas plantas com a presença dessa bactéria.

O tratamento B1RH não diferiu estatisticamente de nenhum dos tratamentos irrigados (Figura 6), assim como o tratamento CRH. Dessa forma, não podemos dizer que isso tenha ocorrido devido à inoculação da bactéria, e provavelmente, se deve ao crescimento lento do abacaxizeiro e das suas características morfológicas e anatômicas que conferem naturalmente a essa planta tolerância a condições de falta de água (Cunha, 1999) e, portanto, o período de estresse hídrico (24 dias) pode não ter sido suficiente para se observar diferenças significativas entre os tratamentos. O mesmo ocorreu para os parâmetros área foliar, massa seca de parte aérea e número de folhas (também

no estresse máximo), e, portanto, os dados dessas variáveis não serão apresentados e não foi possível realizar melhores discussões nesse sentido.

Segundo Yang et al. (2009), o termo “Tolerância Sistêmica Induzida” designa as mudanças físicas e químicas em plantas, resultantes da interação com BPCV, que resultam em aumento na tolerância a doenças, porém, pouco se sabe a respeito desse processo com relação a estresses abióticos. Pereyra et al. (2006), realizaram estudos nesse sentido, e obtiveram resultados em seu trabalho que mostravam esse fato, no qual a inoculação de *Azospirillum* pode contribuir para a proteção de trigo contra o estresse hídrico. Saravanakumar et al. (2011) observaram uma maior tolerância ao estresse hídrico nas plantas inoculadas com BPCV, representado pelo retardamento no aparecimento de sintomas visuais resultantes do estresse. Resultados semelhantes foram encontrados em *Arabidopsis* (Timmusk e Wagner, 1999) e em pimenta e tomate (Mayak et al., 2004). Além disso, Egamberdiyeva (2007) relata que os efeitos benéficos da interação com BPCV podem ser maximizados em condições desfavoráveis para o desenvolvimento das plantas.

No presente trabalho, os resultados referentes aos parâmetros relativos ao crescimento de parte aérea (Figura 6) não traduziram que a presença das bactérias induziu algum tipo de tolerância ao estresse hídrico em relação às plantas controle, como nos trabalhos dos autores citados no parágrafo anterior. Entretanto, resultados interessantes nesse sentido foram observados no sistema radicular.

Na figura 7, têm-se as médias dos valores, coletados no dia do estresse máximo de massa seca de raiz (MSR). Pode-se observar que os tratamentos contendo B2 e o tratamento C apresentaram os menores valores. Além disso, pode-se notar que não houve diferença significativa entre os dois tratamentos contendo B1, assim como entre os tratamentos contendo B2. Também pode-se ver que o tratamento CRH apresentou a maior média dentre os tratamentos, sendo significativamente diferente do tratamento C e dos tratamentos B2 e B2RH.

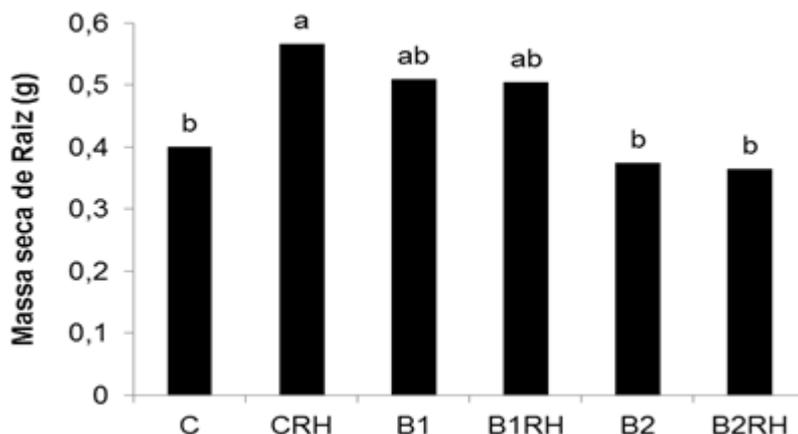


Figura 7. Massa Seca de Raiz (MSR) do abacaxizeiro 'Vitória' submetido aos respectivos tratamentos no dia do estresse máximo (24 dias após a suspensão da irrigação). Cada coluna representa média de 10 repetições. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente, segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade. C – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias; CRH – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias e submetido ao estresse hídrico; B1 – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111; B1RH – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111 e submetido ao estresse hídrico; B2 – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54; B2RH – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 e submetido ao estresse hídrico.

Quando as plantas estão sob estresse, o desenvolvimento das raízes é fundamental para a sobrevivência da planta (Burkart et al., 2004). O ABA produzido nas raízes, em decorrência do estresse, inibe a síntese de etileno, permitindo o maior crescimento radicular em condições de baixa disponibilidade hídrica, sendo uma estratégia de defesa da planta que permite explorar maior área de solo em busca de água (Sharp e Lenoble, 2002), o que explica a maior média de MSR observada para o tratamento CRH (Figura 7).

As raízes podem ter o seu padrão de crescimento alterado pela colonização bacteriana, podendo ocorrer, por exemplo, um estímulo ao seu crescimento, aumentando o número de raízes laterais (Belimov et al., 2007, Long et al., 2008). Segundo Cassan et al. (2001), esse processo ocorre por meio de modificações no balanço hormonal.

Alterações no crescimento radicular podem aumentar a absorção de água, refletindo no crescimento da parte aérea, fazendo com que as BPCV sejam responsáveis pela redução dos efeitos deletérios do estresse hídrico (Casanova

et al., 2002). Um mecanismo que pode promover a tolerância a estresses abióticos é a presença da ACC deaminase bacteriana, que impede que haja a produção de etileno nas raízes, mantendo o crescimento radicular (Belimov et al., 2009, Glick et al., 1998), sendo esse processo já relatado para a bactéria *B. silvatlantica* (Onofre-Lemus et al., 2009, Perin et al., 2006). Também já foi relatada a presença de genes que codificam ACC deaminase em bactérias *Herbaspirillum seropedicae* (Zhu et al., 2012). Além disso, o crescimento das raízes e o estímulo à produção de raízes laterais podem ser estimulados pela produção de ácido indol acético – AIA, algo já observado para bactérias do gênero *Herbaspirillum* e *Burkholderia* (Adesemoye, et al., 2008, Bastián et al., 1998, Gyaneshwar, et al., 2002, Mantelin e Touraine, 2004, Luvizotto, et al., 2008).

Dessa forma, esperava-se que os tratamentos B1 e B2 apresentassem maior MSR do que o tratamento C, devido às propriedades listadas no parágrafo anterior. Por meio da Figura 7, vemos que isso não ocorreu com relação a B2, entretanto, pode-se observar que os tratamentos contendo B1, apresentaram essa tendência, tendo maiores médias do que o tratamento C e B2, apesar de não existir diferença estatística entre eles. Ou seja, pode ter havido ou maior produção de auxinas ou alguma redução na síntese do etileno, devido à presença de B1 e da ACC deaminase bacteriana, culminando no maior crescimento radicular.

Além disso, a inoculação das duas bactérias alterou o padrão de crescimento das raízes em resposta ao estresse hídrico, pois a presença de ambas não levou a um aumento nos valores de MSR nos tratamentos B1RH e B2RH, em relação a B1 e B2, respectivamente, como ocorreu para o tratamento CRH em comparação com C (Figura 7). Portanto, o tratamento CRH respondeu mais prontamente e de maneira esperada aos efeitos do estresse imposto nesse experimento, culminando no maior crescimento radicular, provavelmente pela inibição da síntese de etileno devido ao aumento na concentração de ABA pela ocasião do estresse hídrico. Como os tratamentos inoculados e submetidos ao déficit hídrico apresentaram médias estatisticamente iguais aos respectivos tratamentos irrigados, sugere-se que essas plantas tenham apresentado tolerância ao estresse ou sofrido menos aos efeitos deletérios do estresse. No caso do tratamento B1RH, isso se deve ao maior crescimento radicular pela

presença da bactéria, reduzindo o efeito prejudicial da ausência de água. O tratamento B2RH, da mesma forma, teve o seu padrão de crescimento em resposta ao estresse alterado, também provavelmente devido a mudanças hormonais, entretanto, nesse caso, o desenvolvimento do sistema radicular foi menor.

Outro fator que deve ser destacado é que a presença de BPCV induz a produção de raízes laterais (Belimov et al., 2007, Long et al., 2008) que, conseqüentemente, são mais finas e têm menor contribuição para a MSR. Dessa forma, pode-se supor que as plantas inoculadas, principalmente com B2, podem ter investido mais na produção de raízes laterais, pela alteração no padrão de crescimento radicular e, portanto, foram observados menores valores de MSR. Além disso, a presença de pelos radiculares pode ter facilitado a absorção de água, deixando as plantas menos suscetíveis ao estresse.

Portanto, B1 apresenta potencial para ser utilizada para melhorar a adaptação de mudas de abacaxizeiro micropropagadas durante a aclimatização, pois, como se sabe, mudas micropropagadas possuem reduzido desenvolvimento do sistema radicular, e esse se apresenta com poucos pelos (Preece e Sutter, 1991). Assim, apesar de não ter promovido incrementos significativos no crescimento da parte aérea, há a tendência a uma maior produção de raízes, o que pode facilitar o estabelecimento das mudas a condição *ex vitro* e facilitar a absorção de água e nutrientes.

Por fim, quando se fala em aclimatização de mudas, deseja-se que as plantas atinjam o mais rápido possível o tamanho ideal para que sejam levadas a campo, reduzindo os custos da técnica (Fuentes et al., 2007, González-Olmedo et al., 2005, Read e Fellman, 1985). Desse ponto de vista, o retardamento do crescimento observado devido à utilização de B2 pode ser um ponto negativo para a sua utilização em mudas de abacaxizeiro. Entretanto, sendo comprovada a sua atuação no sentido de amenizar os efeitos deletérios do estresse hídrico, sua utilização pode ter papel importante na aclimatização de mudas de abacaxizeiro, reduzindo inclusive a mortalidade de plantas pela perda excessiva de água (Barboza et al., 2006).

### 4.3 – Teores de Nutrientes Minerais

Algumas propriedades, além da FBN, fazem com que as BPCV mantenham a nutrição da planta em níveis adequados, como por exemplo, a solubilização e aumento na absorção de fosfato, produção de sideróforos, aumento de absorção de nitratos pelas plantas e estímulo à produção de pelos radiculares (Gyaneshwar et al., 2002, Kloepper et al., 2007, Mantelin e Touraine, 2004, Yang et al., 2009).

A alteração no padrão de absorção de nutrientes pode se dar tanto pelo estímulo ao crescimento das raízes e o maior surgimento de pelos radiculares, pela produção de fitohormônios (Kloepper, et al., 2007) como devido à ativação da bomba de prótons ATPase (Mantelin e Touraine, 2004).

A preocupação em se obter maiores informações a respeito se deve a necessidade de se buscar alternativas a utilização de adubação mineral, tanto do ponto de vista ambiental, como econômico e também devido à importância que esses nutrientes têm para o desenvolvimento das culturas.

O nitrogênio (N) é um dos nutrientes minerais mais importantes para as plantas, e é considerado o principal componente de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, clorofilas e coenzimas, sendo um nutriente fundamental no processo de aclimatização de abacaxizeiro (Raven et al., 2007, Ribeiro et al., 2011).

De acordo com Raven et al. (2007), o fósforo (P) faz parte de compostos fosfatados (ATP e ADP), ácidos nucleicos, coenzimas e fosfolipídios. Malézieux e Bartholomew (2003) relatam que o abacaxizeiro é pouco exigente em fósforo, e a importância deste nutriente para a planta é principalmente na fase de diferenciação floral e no desenvolvimento do fruto.

O potássio (K) é um nutriente que está envolvido na abertura e fechamento dos estômatos, regula a osmose e balanço iônico, além de ser um ativador de enzimas (Raven et al., 2007). Paula et al. (1991) relatam que a deficiência de potássio pode levar a perdas na produção e qualidade do fruto, devido à grande importância desse elemento ao abacaxizeiro. Segundo Malézieux e Bartolomeu (2003) a deficiência de  $K^+$  pode reduzir a fotossíntese, o crescimento da planta e o rendimento do fruto.

O cálcio (Ca) é o principal componente da parede celular e o movimento deste nutriente para a parte aérea é favorecido pela transpiração (Raven et al., 2007). Durante a fase de aclimatização, a absorção de Ca é feita pelas raízes novas, daí a importância de se ter um bom espaço físico no recipiente de cultivo para que haja um bom volume radicular. Como a maior parte do Ca está na estrutura da parede celular, este nutriente tem uma baixa mobilidade, por isso quando em deficiência, os sintomas aparecem nas folhas novas (Raven et al., 2007).

O magnésio (Mg) é componente presente na molécula de clorofila. Esse nutriente ativa um grande número de enzimas, e facilita a absorção de outros nutrientes, principalmente o P. Quanto maior a concentração de Mg próxima à raiz, maior será a sua absorção (Raven et al., 2007). Por ser componente da clorofila, a deficiência de Mg poderá reduzir a concentração deste pigmento fotossintético, reduzindo a fotossíntese e, possivelmente, o crescimento da planta (Malézieux e Bartholomew, 2003).

Diversos trabalhos foram realizados no sentido de estudar a influência da presença de bactérias endofíticas em relação à nutrição mineral de plantas. A utilização de BPCV em associação com *Triticum aestivum* permitiu a redução em 25% na quantidade de fertilizante do tipo NPK usualmente utilizado para a cultura (Shaharoon et al., 2008). Resultados similares foram encontrados para tomate por Hernandez e Chailloux (2004), para trigo por Sala et al. (2007), e para cereais em condição de estresse hídrico por Creus et al. (2004) e em alface nas mesmas condições por Vivas et al. (2003). Baldotto et al. (2010) observaram incrementos no teor do nutrientes minerais em abacaxizeiro 'Vitória' inoculado com bactérias do gênero *Burkholderia*. O gênero *Herbaspirillum* também é conhecido pela sua capacidade de promover incrementos no teor de nutrientes minerais (Kennedy et al., 2004). Silva (2013) obteve incrementos nos teores de N, S e K em abacaxizeiro 'Vitória' em resposta à aplicação conjunta de *Burkholderia silvatlantica* e *Herbaspirillum seropedicae*.

Apesar das bactérias utilizadas no presente trabalho apresentarem características como a fixação biológica de nitrogênio (FBN) e solubilização de fosfato (Bastían, et al, 1998, Jiang e Hartung, 2008), esse incremento nutricional não foi obtido, como pode ser observado na Figura 8, que representa o teor de nutrientes foliar no abacaxizeiro 'Vitória' submetido aos diferentes tratamentos.

Não houve influência dos tratamentos (inoculação das bactérias e imposição do estresse hídrico) no teor dos nutrientes avaliados (N, P, K, Ca e Mg).

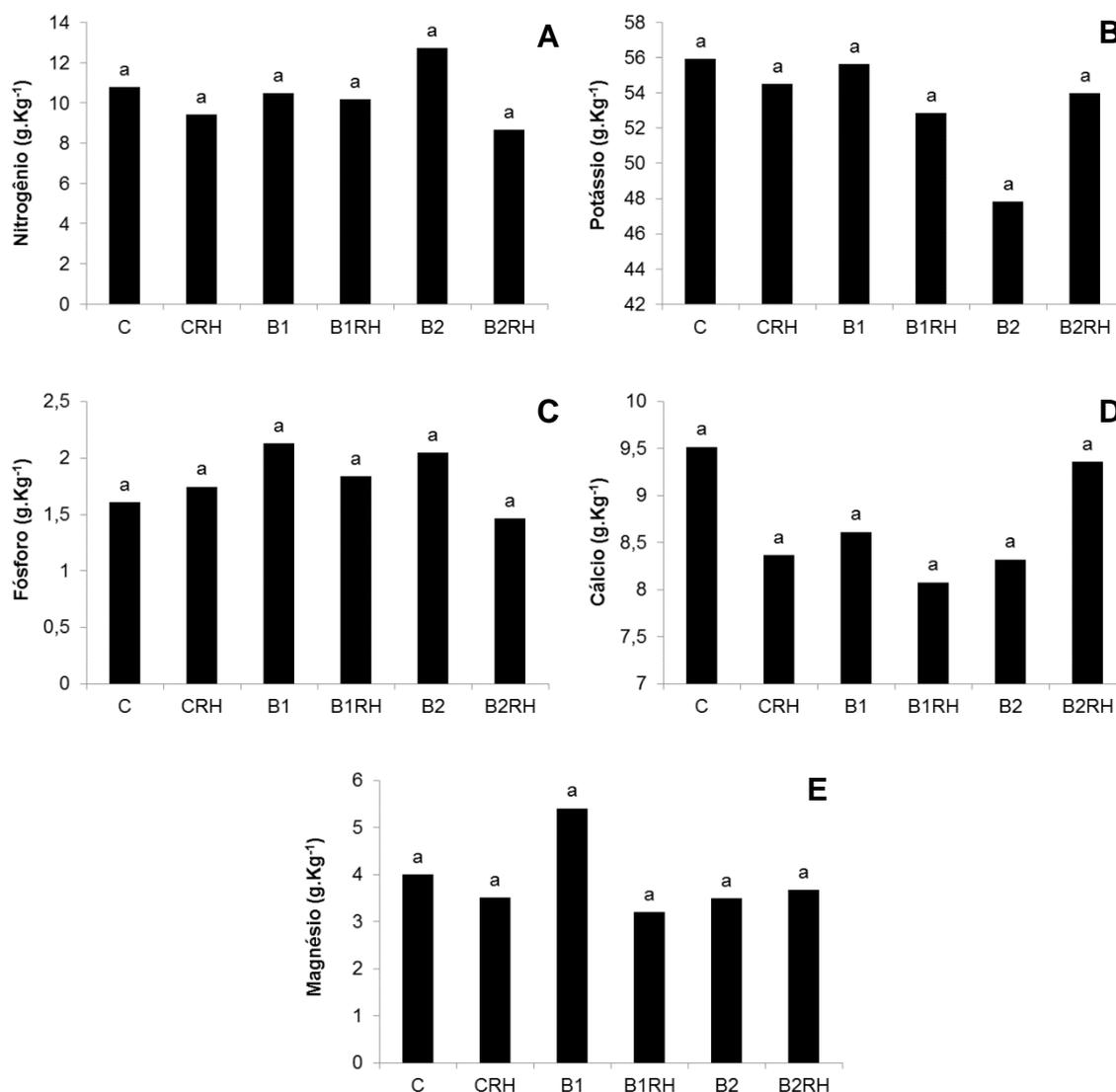


Figura 8. Teores foliar de Nitrogênio (A), Potássio (B), Fósforo (C), Cálcio (D) e Magnésio (E) do abacaxizeiro 'Vitória' submetidos aos respectivos tratamentos, no dia do estresse máximo (24 dias após a suspensão da irrigação). Cada coluna representa média de 3 repetições. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente, segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade. C – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias; CRH – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias e submetido ao estresse hídrico; B1 – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111; B1RH – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111 e submetido ao estresse hídrico; B2 – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54; B2RH – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 e submetido ao estresse hídrico.

Os resultados encontrados podem ser explicados com base na literatura existente. Engamberdiyeva (2011) observou aumentos significativos nos teores de nutrientes foliares em milho em resposta à inoculação de BPCV apenas em solos pobres do ponto de vista nutricional. Sala et al. (2008) ao trabalharem com trigo inoculado com BPCV no campo obtiveram resultados menos expressivos com relação ao *status* nutricional das plantas, quando comparado com o trabalho realizado com substrato autoclavado em casa de vegetação que, conseqüentemente, apresentava uma carga menor de microrganismos nativos. Assim, a realização das adubações, o fato do substrato utilizado no presente experimento não ser inerte, e apresentar consideráveis quantidades de nutrientes (Quadro 2) e a presença de BPCV diazotróficas endofíticas associadas naturalmente às plantas controle que podem ter auxiliado em processos como a FBN, contribuíram para a não obtenção de diferenças significativas nos teores de nutrientes foliares avaliados (Figura 8).

Pouco se sabe a respeito dos teores de macronutrientes que são satisfatórios para o desenvolvimento de mudas de abacaxizeiro durante a aclimatização. Couto (2011) obteve rápido crescimento de mudas de abacaxizeiro 'Vitória' durante a aclimatização, com mudas que apresentavam os seguintes teores (em g.Kg<sup>-1</sup>) de N, P, K, Ca e Mg, respectivamente: 10,80; 2,55; 30,55; 5,94; 4,83. Obviamente, existem diversos fatores que impedem comparações mais precisas, como por exemplo, a idade das plantas e condições de cultivo. Entretanto, podemos notar que com exceção do K, os valores não são discrepantes dos obtidos neste trabalho (Figura 8).

Somando-se o fato de que os tratamentos não diferiram estatisticamente nos teores de nutrientes avaliados, podemos então dizer que os resultados descritos até aqui e os que estão por serem discutidos nos tópicos subsequentes não se devem à influência de disponibilidade de nutrientes no substrato e absorção pelas plantas.

#### 4.4 - Capacidade fotossintética:

##### 4.4.1 - Trocas Gasosas:

O metabolismo CAM envolve uma separação temporal entre a absorção noturna do  $\text{CO}_2$  e sua fixação pela PEPC no citosol. Nesse processo ocorre a formação do malato e seu armazenamento no vacúolo à noite, e durante o dia, há a descarboxilação desse ácido para a liberação do  $\text{CO}_2$ , que é refixado pela Rubisco no cloroplasto para a produção de carboidratos (Drennan e Nobel, 2000).

A Figura 9 representa os valores das medições realizadas no período da manhã da taxa fotossintética líquida ( $A_{\text{manhã}}$ ), condutância estomática ( $g_{s \text{ manhã}}$ ), transpiração ( $E_{\text{manhã}}$ ) e déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar ( $\text{DPV}_{\text{folha-ar manhã}}$ ) ao longo do período de estresse hídrico. Podemos notar que houve muita alternância entre os valores e tratamentos ao longo do tempo. Isso se deve à grande oscilação nas condições climáticas ao longo do período de avaliação das trocas gasosas, como podemos observar na Figura 3. Como foi destacado por Malézieux et al. (2003), Neivola et al. (2005) e Zhu et al. (2005), a resposta em relação à assimilação de  $\text{CO}_2$  e, conseqüentemente, os valores obtidos nas medições de trocas gasosas em plantas de abacaxizeiro são extremamente influenciadas pelas condições ambientais.

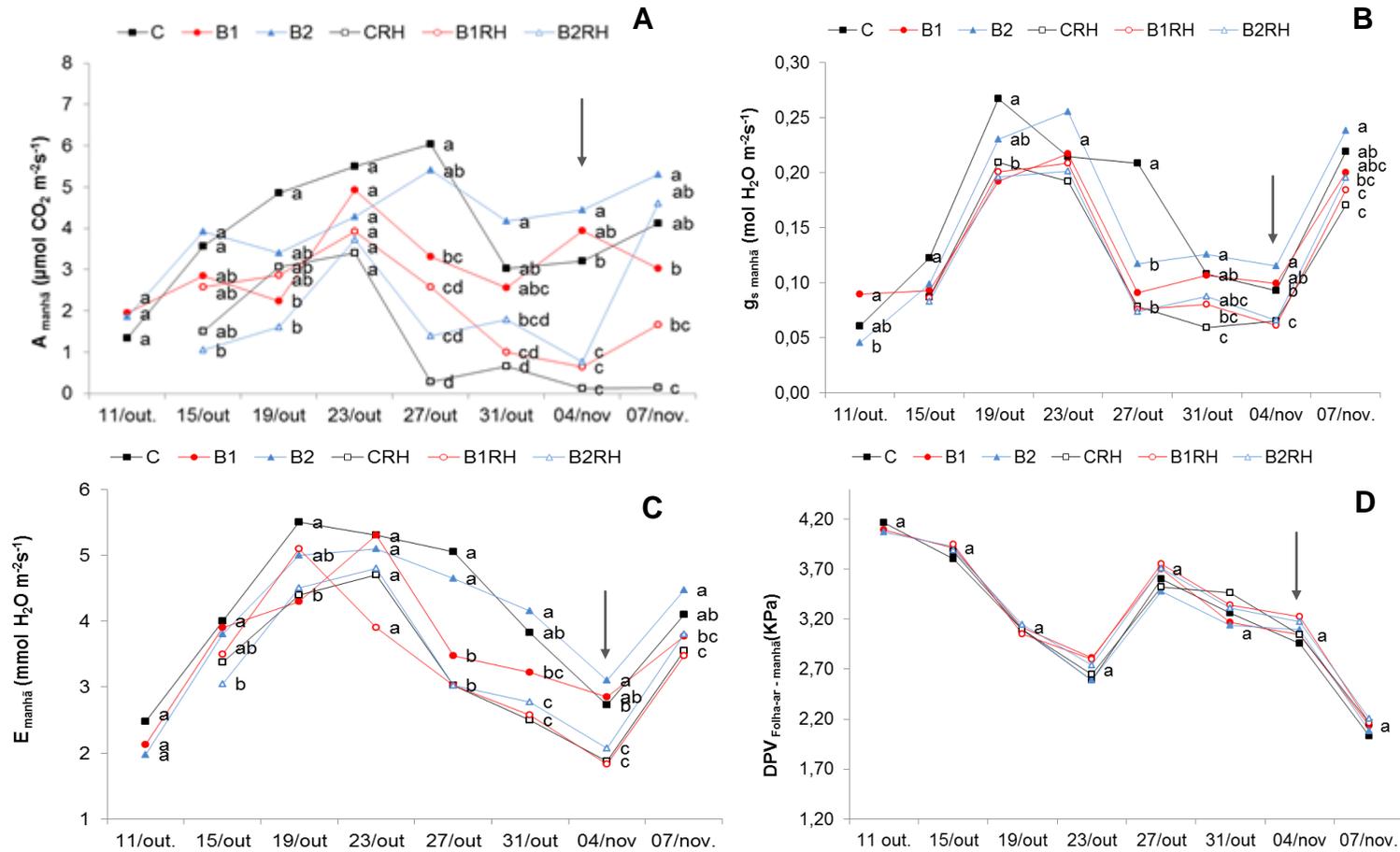


Figura 9. Valores matinais da: taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (B), transpiração (C) e déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar (D) do abacaxizeiro ‘Vitória’ submetido aos respectivos tratamentos. Cada símbolo representa média de 4 repetições. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente na mesma data, segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade. As setas indicam o momento da irrigação. C – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias; CRH – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias e submetido ao estresse hídrico; B1 – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111; B1RH – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111 e submetido ao estresse hídrico; B2 – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54; B2RH – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 e submetido ao estresse hídrico.

A influência das BPCV nas trocas gasosas em plantas vem sendo estudada em diversas culturas, e resultados promissores foram encontrados, no sentido dessas aumentarem a fotossíntese líquida. Zhang et al. (2008) observaram incrementos na atividade fotossintética em *Arabidopsis* em resposta à inoculação bacteriana. Canellas et al. (2012) obtiveram incrementos na taxa fotossintética em resposta à inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* em plantas de milho. Resultados semelhantes não foram vistos no presente trabalho, como se pode observar no gráfico referente à  $A_{\text{manhã}}$  (Figura 9-A), no qual nota-se que, com excessão de alguns poucos dias, não houve diferença significativa entre os tratamentos irrigados. O mesmo pode ser dito para os tratamentos não-irrigados.

Osmond (1978) afirma que a contribuição da fase II para a fixação do carbono atmosférico é muito baixa, variando de 1 a 3% do total em plantas de abacaxi mantidas em condições controladas. Entretanto, o trabalho de Couto (2012) mostra que esses valores podem ser mais substanciais para o desenvolvimento da planta do que afirma o primeiro autor. Ao avaliar as trocas gasosas em abacaxizeiro 'Vitória' e 'IAC Fantástico', Couto (2012) obteve valores de taxa de A significativamente maiores para a cultivar 'Vitória', e isso refletiu no maior crescimento das mudas durante a aclimatização. Além disso, segundo Malézieux et al. (2003), as condições ambientais podem alternar a extensão e a duração das 4 fases do metabolismo CAM, tendo efeito direto na contribuição da fase II para a assimilação do carbono atmosférico para as plantas.

Os resultados de  $A_{\text{manhã}}$  obtidos no presente experimento (Figura 9 A) para os tratamentos irrigados são superiores aos obtidos para abacaxizeiro por Keller e Luttge (2005), por Aragón et al. (2012) e por Couto (2012), provavelmente devido ao fato das mudas serem mais velhas, sendo que quando as avaliações iniciaram, as mudas tinham cerca de 120 dias de aclimatização, enquanto que os demais autores avaliaram no máximo até 75 dias. Entretanto, os valores não se compararam aos obtidos por plantas  $C_3$ , que podem chegar a  $25 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , como destacado por Aragón et al. (2012). De acordo com Côte (1988), isso se deve ao fato da difusão de gás nas folhas de abacaxizeiro ser baixa, mesmo quando os estômatos estão amplamente abertos.

Plantas CAM quando submetidas a estresse hídrico, tem a sua fotossíntese líquida diurna cessada (Kluge e Ting, 1978, Malézieux et al., 2003). A velocidade com que a fotossíntese diurna cessa em plantas de abacaxizeiro, em

decorrência ao estresse hídrico, muda com a idade da planta, sendo que de acordo com Côte et al. (1993), isso pode variar de 4 a 15 dias, sendo maior a persistência da assimilação quanto maior for a planta. Observando a Figura 9 (A), notamos que o tratamento CRH foi o que primeiro apresentou valores médios significativamente menores do que todos os tratamentos irrigados, algo que ocorreu a partir dos 16 dias de estresse, sendo que os valores de  $A_{manhã}$  estavam bem próximos de zero, corroborando, portanto, com Côte et al. (1993). Porém, não havia diferença significativa entre esse tratamento e os demais tratamentos não-irrigados.

Muitos trabalhos mostraram em diferentes culturas os efeitos benéficos da presença das BPCV na tolerância ao estresse hídrico, como em trigo (Creus et al., 2004, Pereyra et al., 2006, Chakraborty et al., 2013), envilha (Saravanakumar et al., 2011), *Arabidopsis* (Timmusk e Wagner, 1999), pimenta e tomate (Mayak et al., 2004), alface (Kohler et al., 2008), milho (Casanovas et al., 2002) e feijão (Figueiredo et al., 2008). Essa tolerância reflete nos valores de trocas gasosas. Han e Lee (2005) observaram aumentos na taxa fotossintética devido à inoculação de BPCV em alface submetida a estresse hídrico. Resultados semelhantes foram obtidos por Vivas et al. (2003), para mesma cultura. Por fim, as BPCV parecem conferir tolerância também a outros estresses abióticos, refletindo nos valores de trocas gasosas. Amor e Cuadra-Crespo (2012) observaram maiores taxas fotossintéticas em plantas de pimenta inoculadas com BPCV submetidas a estresse salino.

Como pode-se observar na Figura 9 (A), após a reirrigação,  $A_{manhã}$  do tratamento B2RH aumentou consideravelmente, apresentando média estatisticamente igual aos tratamentos irrigados e maior que o tratamento CRH, que por sua vez não mostrou tal recuperação. O tratamento B1RH também mostrou uma pequena recuperação em virtude da reirrigação, apresentando média estatisticamente igual ao tratamento B1. O resultado dois dias após a reirrigação mostra que, apesar de não ter ficado evidente nas demais avaliações, a inoculação das duas bactérias, principalmente B2, induziu tolerância ao estresse hídrico, como os trabalhos citados no parágrafo anterior.

Além disso, a fixação diurna do carbono é comumente reduzida por alguns dias de déficit hídrico, mas ela rapidamente é retomada com a reirrigação (Herrera et al., 1991; Zotz e Winter, 1993), algo não observado para o tratamento

CRH. Este fato mostra que o nível de estresse experimentado pelas plantas do tratamento CRH causou efeitos deletérios mais relevantes, já que as plantas não retomaram os valores de  $A_{\text{manhã}}$ , diferente do que ocorreu com as plantas inoculadas, principalmente com B2RH, reforçando os efeitos benéficos da inoculação bacteriana.

Na discussão a respeito dos valores de MSR feitas no tópico 4.2, conclui-se que a presença das duas bactérias pode ter conferido algum tipo de tolerância ao estresse hídrico. Porém, ficou claro que o mecanismo utilizado por B2 foi diferente do apresentado por B1, já que as raízes daquelas tinham as menores médias de MSR, assim como outros parâmetros, como altura e diâmetro da roseta (Figuras 5 e 6). Portanto, resta elucidar os motivos que fizeram com que a inoculação, principalmente de B2, resultasse em uma pronta recuperação devido à reirrigação, já que B1 parece ter atuado no sentido de aumentar o crescimento radicular, facilitando a absorção de água.

Sabe-se que o estresse hídrico pode causar prejuízos metabólicos como a redução na atividade da Rubisco (Bota et al., 2004). Entretanto, esse evento não necessariamente ocorre de maneira proporcional à redução da taxa fotossintética. De acordo com Flexas et al. (2006), o decréscimo na fotossíntese durante o estresse hídrico provavelmente não ocorre em decorrência de queda na atividade da Rubisco. Além disso, segundo Ennahli e Earl (2005) a manutenção da atividade dessa enzima pode ser importante para a recuperação da fotossíntese em decorrência da reirrigação. Dessa forma, a rápida e acentuada recuperação das plantas inoculadas com B2 pode se dever a esse fato. Ou seja, pode-se supor que a presença de B2, e até mesmo de B1 (que também apresentou uma pequena recuperação), evitou maiores danos a níveis bioquímicos. Consequentemente, quando as plantas foram reirrigadas apresentaram uma rápida retomada na taxa de assimilação de  $\text{CO}_2$ , a valores estatisticamente iguais aos tratamentos irrigados, devido à maior integridade da Rubisco.

Entretanto, parecem haver mais fatores envolvidos no processo, pois existem diversos outros mecanismos descritos que fazem com que as BPCV tenham a capacidade de conferir tolerância ao estresse hídrico e que mostram a necessidade de realização de novos estudos para melhores explicações. Para Creu et al. (2004) esse fato está relacionado a incrementos no conteúdo de água,

no teor relativo de água, no potencial hídrico e fração de água no apoplasto. Conrath et al. (2006) associam a um acúmulo de proteínas de sinalização, produzidas devido à presença da bactéria, que se tornam ativas quando a planta é exposta a algum tipo de estresse hídrico.

Outras duas situações que são importantes na proteção de plantas contra estresse hídrico e que já foram associadas com a presença de BPCV são: a produção de enzimas antioxidantes como a catalase e a consequente remoção de radicais livres que previnem danos às membranas (Chakraborty et al., 2013, Dimpka et al., 2009, Gururani et al., 2012, Kasim, et al., 2013, Kohler et al., 2008, Saravanakuma et al., 2011); e o acúmulo de prolina, glicina betaina e outros osmólitos, que podem atuar no ajuste osmótico e manter o potencial hídrico das plantas sobre situações de estresse (Bowler et al., 1992, Gururani et al., 2012, Hanson et al., 1979).

De acordo com Belimov et al. (2009), a presença da ACC-deaminase bacteriana e a consequente redução na produção de etileno, além de permitirem um maior crescimento em plantas, podem proporcionar tolerância a estresses abióticos em plantas hospedeiras. Por fim, de acordo com Kasim et al. (2013), a presença das BPCV pode aumentar a produção de genes relacionados com o estresse hídrico e, conseqüentemente, promover tolerância às condições de estresse.

Apesar de todas essas possibilidades, fica claro que ocorreram alterações de ordem física, química e/ou biológica desconhecidas nas plantas devido à interação com a bactéria (B2), causando uma “Tolerância Sistêmica Induzida” (Barriuso et al., 2008, Yang et al., 2009). A introdução de B2, que não é nativa do abacaxizeiro, pode ter causado algum efeito negativo brando nas plantas, como relatado na literatura, que pode ocorrer com bactérias endofíticas que são benéficas para algumas culturas (Schulz e Boyle, 2005). Isso pode ter desencadeado reações no abacaxizeiro, como uma espécie de rustificação que, embora tenha causado efeitos negativos no crescimento, o deixou menos susceptível a intempéries, como o estresse hídrico.

Na Figura 9 (B e C), pode-se notar que, de maneira geral,  $g_s$  manhã e  $E$  manhã acompanharam o mesmo padrão observado para  $A$  manhã. Ou seja, com poucas exceções, não houve diferença significativa entre os valores dos tratamentos irrigados. O mesmo pode ser dito para os tratamentos não-irrigados. Como

esperado, a redução em  $A_{\text{manhã}}$  dos tratamentos estressados, foi acompanhada pela redução na  $g_s$  manhã e na  $E_{\text{manhã}}$ . Resultados semelhantes foram encontrados por Zhu et al. (2005), que observaram em seu trabalho uma grande redução na condutância estomática em função do estresse hídrico, que resultou na acentuada queda na fotossíntese no período diurno. Esse processo é algo comum em plantas CAM e bastante relatado por diversos autores (Kluge e Ting, 1978; Winter, 1985; Winter et al., 1992; Côte et al., 1993).

Em situações de estresse, talvez o primeiro evento que possa ocorrer na planta é a síntese de ABA nas raízes e conseqüente transporte para as folhas que resulta em fechamento estomático (Hartung et al., 1990). Esse fechamento estomático, apesar de aumentar a eficiência do uso da água, pois reduz a transpiração, também limita a entrada de  $\text{CO}_2$  atmosférico, restringindo a fotossíntese (Taiz e Zeiger, 2013; Faria et al., 1996).

Segundo Côte et al. (1993), no abacaxizeiro os ritmos da condutância estomática e da transpiração estão fortemente relacionados com o ritmo de absorção do  $\text{CO}_2$  atmosférico. Alguns trabalhos mostraram que o aumento na fotossíntese é acompanhado por aumentos nos valores de condutância estomática e transpiração em resposta à inoculação de BPCV como, por exemplo, em milho (Canellas et al., 2012), em pimenta (Amor e Cuadra-Crespo, 2012) e em alface (Han e Lee, 2005, Vivas et al, 2003). No presente trabalho, como dito anteriormente, isso não ficou nítido ao longo do período de estresse.

Com relação aos dados de recuperação (Figura 9 A, B e C), houve uma tendência a um aumento em  $g_s$  manhã e na  $E_{\text{manhã}}$  de todos os tratamentos, inclusive os irrigados, porém, apenas o tratamento B2RH apresentou o notável incremento na média dos valores de  $A_{\text{manhã}}$  em resposta à maior  $g_s$  manhã, o que reforça ainda mais a sua recuperação em resposta à retomada do fornecimento de água. O tratamento CRH, apesar de ter apresentado maiores valores de  $g_s$  manhã e de  $E_{\text{manhã}}$ , não alterou  $A_{\text{manhã}}$  na mesma proporção, o que torna mais destacada a sua ineficiência na recuperação, e o fato de que a recuperação de B2RH não está associada apenas a efeitos estomáticos e pode sim estar relacionado a eventos bioquímicos, como a atividade da Rubisco, pois do contrário, todos os tratamentos deveriam ter mostrado tal incremento em  $A_{\text{manhã}}$ , como B2RH.

É sabido que o fechamento estomático leva à redução na transpiração foliar e, conseqüentemente, ocorre um aumento na temperatura das folhas e no

$DPV_{\text{folha-ar}}$  (Nobel, 1991). Tal relação não foi observada no presente trabalho, como pode-se notar por meio da Figura 9 (D), na qual se vê que não foi observada diferença estatística entre os tratamentos durante todo o período de avaliação. Entretanto, a tendência ao aumento na  $g_s$  manhã e na  $E_{\text{manhã}}$  dois dias após a reirrigação, resultou em uma tendência à redução no  $DPV_{\text{folha-ar manhã}}$  em todos os tratamentos.

A ausência de resposta do  $DPV_{\text{folha-ar manhã}}$  em relação à imposição do estresse ou aplicação das bactérias, pode ser explicada pelas características anatômicas das folhas, com grandes quantidades de tricomas granulares e escamiformes, que permitem a temperatura foliar constante com o tempo (Aubert, 1973, Barboza et al., 2006, Batagin et al., 2009, Malézieux et al., 2003).

Desde que as reações bioquímicas do metabolismo CAM foram elucidadas, as suas consequências fisiológicas em plantas terrestres têm sido reconhecidas como uma melhoria do desempenho fotossintético em ambientes com limitações hídricas (Ranson e Thomas, 1960). Uma das características de plantas CAM é a sua plasticidade metabólica que é afetada pelas condições ambientais (Cushman e Bohnert, 1999). Dessa forma, plantas CAM podem maximizar o seu crescimento utilizando o metabolismo  $C_3$  em períodos de maior suplemento hídrico, mas podem também alternar para o CAM para reduzirem as perdas de água pela transpiração, enquanto mantêm a integridade fotossintética durante dias de baixa disponibilidade de água, resultando em maior eficiência no uso da água, já que essa é duas vezes maior na fase noturna do que no período diurno (Côte et al., 1993, Cushman et al., 2002). Ou seja, como resultado da assimilação noturna do  $CO_2$  atmosférico ocorre uma maior manutenção da água em relação a plantas  $C_3$ , ao passo que o primeiro processo ocorre em horários de menor demanda evaporativa e maior gradiente de concentração de  $CO_2$  entre o ar e a folha (Winter e Smith, 1996).

A Figura 10 representa os valores das trocas gasosas mensuradas no período noturno. Como pode-se ver, de maneira geral, não houve diferença estatística para esses parâmetros ao longo do tempo, na maioria dos dias avaliados. Assim, pode-se dizer que a aplicação dos tratamentos (aplicação de bactérias e estresse hídrico) não alterou esses parâmetros.

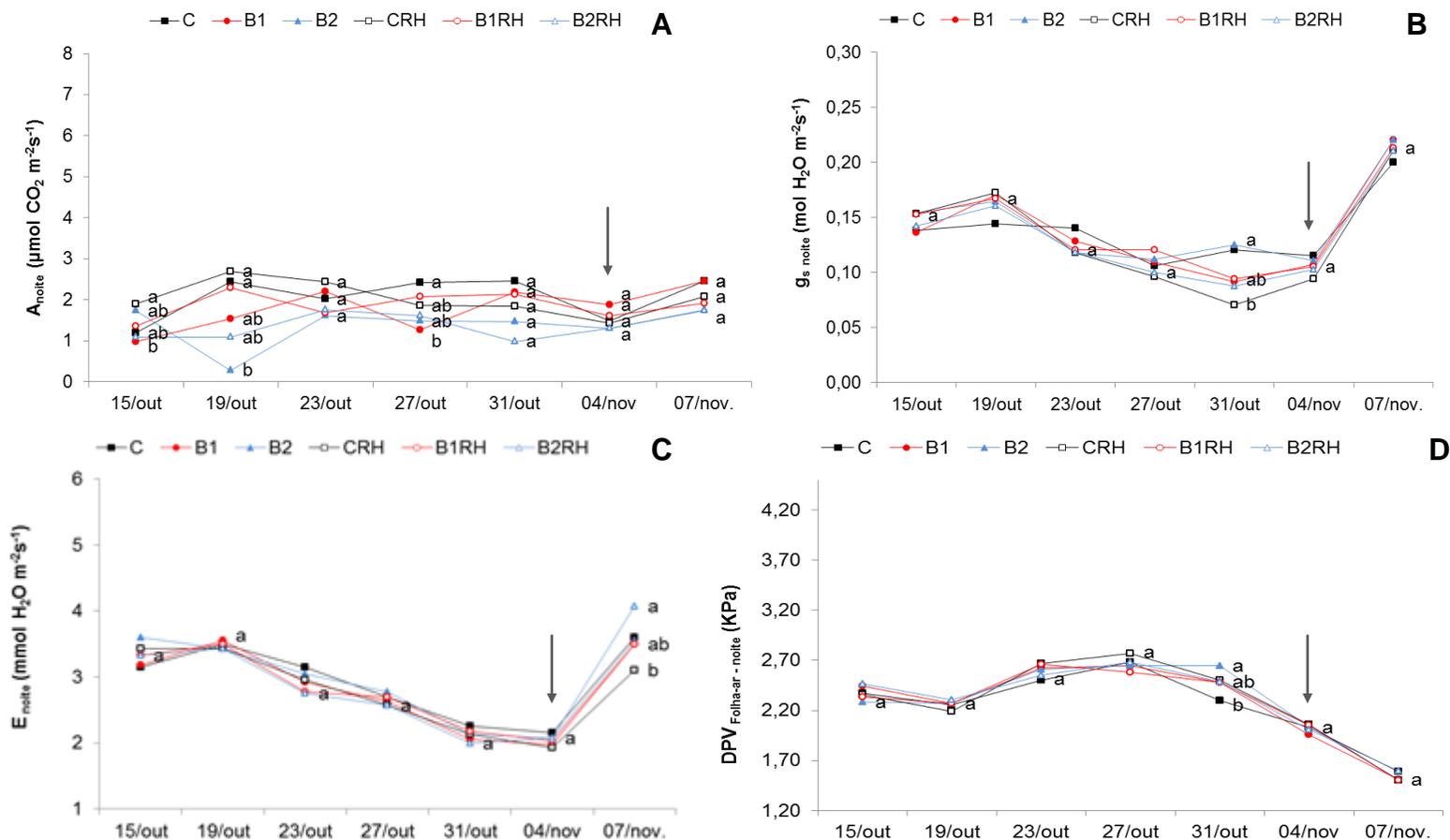


Figura 10. Valores noturnos da: taxa fotossintética líquida (A), condutância estomática (B), transpiração (C) e déficit de pressão de vapor entre a folha e o ar (D) do abacaxizeiro ‘Vitória’ submetido os respectivos tratamentos. Cada símbolo representa média de 4 repetições. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente na mesma data, segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade. As setas indicam o momento da reirrigação. C – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias; CRH – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias e submetido ao estresse hídrico; B1 – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111; B1RH – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111 e submetido ao estresse hídrico; B2 – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54; B2RH – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 e submetido ao estresse hídrico.

A ausência de diferenças significativas em  $A$  mensurada nos dois períodos, em parte explica os parâmetros de crescimento que não diferiram estatisticamente, principalmente em relação aos tratamentos contendo B1 e os não-inoculados, como discutido no tópico 4.2. Entretanto, os valores significativamente menores dos tratamentos contendo B2 para alguns parâmetros de crescimento como, altura, diâmetro da roseta e MSR, não podem ser atribuídos à menor assimilação do carbono.

Zhu et al. (2005) observaram as 4 fases típicas de plantas CAM constitutiva em seus experimentos com abacaxizeiro. Quando os mesmos autores impuseram estresse hídrico nas plantas, puderam notar que houve uma redução muito mais lenta na assimilação noturna do  $\text{CO}_2$  do que na diurna, sendo que passados 15 dias da aplicação do estresse hídrico, a condutância estomática estava próxima de zero no período diurno, e o máximo de abertura era encontrado ao final do período noturno. Zhu et al., (2005) notaram também, após 30 dias do início do estresse hídrico, que ainda existia considerável assimilação noturna de  $\text{CO}_2$ , mostrando que a fase I do metabolismo CAM em abacaxi é menos sensível ao estresse hídrico. Resultados semelhantes foram observados no presente trabalho. Ou seja, a imposição do estresse reduziu  $g_{s \text{ manhã}}$  e, conseqüentemente,  $A_{\text{manhã}}$  e  $E_{\text{manhã}}$  dos tratamentos não-irrigados (Figura 9), porém o estresse não causou alterações nos parâmetros mensurados à noite (Figura 10).

De fato, a taxa de assimilação do carbono noturna não é afetada no início do estresse hídrico, podendo ocorrer inclusive um aumento nesse valor no começo da fase I nos primeiros dias de imposição da restrição hídrica (Zhu, 1996). Porém, esse fato não foi observado no presente trabalho, já que não existiu diferença estatística entre os tratamentos irrigados e não-irrigados.

Todavia, sendo o estresse prolongado pode haver sim uma redução nos valores de trocas gasosas noturnas, até chegar ao ponto em que a fixação noturna do carbono cessa totalmente, podendo as plantas continuarem fixando o  $\text{CO}_2$  proveniente da respiração (Malézieux et al., 2003). A fixação noturna do  $\text{CO}_2$  e/ou a reciclagem do  $\text{CO}_2$  proveniente da respiração pode ajudar a manter um balanço de carbono positivo (ou pelo menos evitar a perda de C) em condições de estresse (Herrera, 2009). Zhu et al (1995) observaram que o estresse hídrico prolongado resultou em pronunciada queda na condutância estomática e,

consequentemente, na fotossíntese líquida no período noturno. Dessa forma, o período de estresse hídrico imposto no presente trabalho não foi suficiente para observar semelhantes reduções.

Geralmente, a proporção de CO<sub>2</sub> que é fixado à noite por plantas de abacaxizeiro propagadas *in vitro* aumenta progressivamente à medida em que a planta vai aumentando o seu peso fresco durante a aclimatização, sendo que esse valor pode corresponder a 2/3 do total do carbono fixado (Côte, 1988, Côte et al., 1993).

Em condições de estresse, essa proporção pode ser ainda maior. De acordo com Côte et al. (1993), sob estresse hídrico, a maior parte do CO<sub>2</sub> é fixado durante à noite em plantas CAM. Esse detalhe foi observado no presente trabalho (Figuras 10 e 11), pois apesar dos valores de  $A_{\text{noite}}$  terem permanecido constantes ao longo do estresse, houve a redução nos valores diurnos, consequentemente aumentando a proporção com que  $A_{\text{noite}}$  contribuía para o processo. O dia do estresse máximo mostra bem essa questão, no qual a média de  $A_{\text{noite}}$  para os tratamentos não-irrigados ficaram em torno de  $1,43 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , enquanto que os valores de  $A_{\text{manhã}}$  estavam em torno de  $0,46 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Além disso, vale lembrar que de acordo com Osmond (1978), a extensão da fase I é muito maior do que a fase II, principalmente em condições de estresse hídrico, aumentando a sua contribuição para a fotossíntese (Malézieux et al., 2003).

A reirrigação dos tratamentos reduziu essa maior contribuição de  $A_{\text{noite}}$  do tratamento B2RH, principalmente quando comparado com CRH, que por sua vez aumentou suas taxas transpiratórias, apresentando consequentemente, uma redução na eficiência no uso da água.

Em suma, os resultados de recuperação das trocas gasosas, principalmente da fotossíntese líquida após a reirrigação (Figura 9 e 10), aliados às alterações na MSR (Figura 7, ítem 4.1), mostram o potencial das duas bactérias em induzir tolerância ao estresse hídrico em abacaxizeiro. Em se tratando de aclimatização de plantas, as dúvidas que se tinham em relação à utilização de B2 nessa situação, devido a efeitos negativos em alguns parâmetros de crescimento, podem ser amenizadas, pois ela pode ter papel importante quando se fala em redução do estresse hídrico no qual as mudas são submetidas durante a aclimatização, podendo resultar em benefícios como uma redução na

taxa de mortalidade de mudas, que é um grande problema da micropropagação (Barboza et al., 2006, Sutter e Hutzell, 1984).

#### 4.4.2 - Determinação da Composição Isotópica do Carbono

Um dos critérios para avaliar a operação do metabolismo CAM é o valor da composição isotópica do  $^{13}\text{C}$  da massa seca de órgãos fotossintetizantes (Winter e Holtum, 2002). As plantas CAM podem ter valores de  $\delta^{13}\text{C}$  intermediários entre os de plantas  $\text{C}_3$  e  $\text{C}_4$ . Em plantas CAM que fixam o  $\text{CO}_2$  à noite via PEPC, o  $\delta^{13}\text{C}$  é semelhante ao de plantas  $\text{C}_4$  (menos negativos). Entretanto, quando algumas plantas CAM são bem hidratadas, elas podem fixar o carbono diretamente via Rubisco, e sob tais condições, a composição isotópica desloca-se mais na direção de plantas  $\text{C}_3$  (mais negativos) (Taiz e Zeiger, 2013). Isso se deve ao fato de que a Rubisco tem um valor de discriminação intrínseco contra  $^{13}\text{C}$  muito maior do que a PEPC (Farquhar et al., 1989).

A Figura 11 representa os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  do abacaxizeiro 'Vitória' sob os diferentes tratamentos no dia do estresse máximo. Esperava-se que, devido às reduções em resposta ao estresse em  $A_{\text{manhã}}$  dos tratamentos não-irrigados (Figura 9-A), que os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  desses estivessem menos negativos do que os obtidos para os tratamentos irrigados, devido à redução da contribuição do metabolismo  $\text{C}_3$  nos tratamentos com estresse para a assimilação total do carbono. Assim, as plantas não-irrigadas, por estarem utilizando em maior proporção a rota via PEPC, discriminariam menos o  $^{13}\text{C}$  em relação aos tratamentos irrigados, que por sua vez estariam assimilando o carbono em maior quantidade via metabolismo  $\text{C}_3$  (maior discriminação), mas isso não foi observado, como podemos ver pela Figura 11, na qual nota-se que não existiu diferença estatística entre os tratamentos. Embora, numericamente, o tratamento B2RH e CRH mostrem uma tendência a serem mais negativos do que B2 e C.

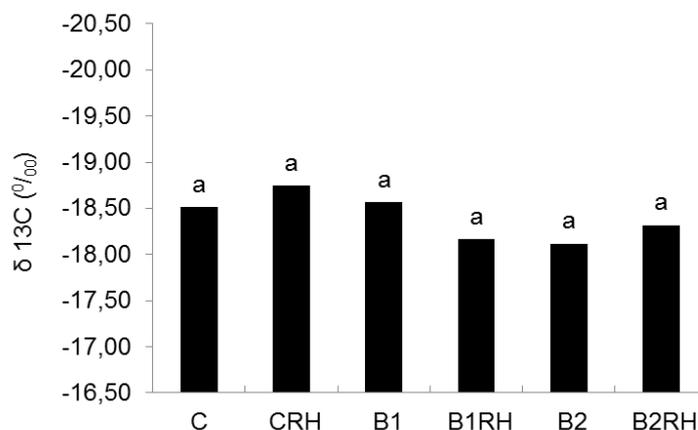


Figura 11. Composição isotópica do carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) do abacaxizeiro 'Vitória' submetido aos respectivos tratamentos no dia do estresse máximo (24 dias após a suspensão da irrigação), com material coletado pela manhã. Cada coluna representa a média de 3 repetições. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente na mesma data, segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade. C – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias; CRH – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias e submetido ao estresse hídrico; B1 – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111; B1RH – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111 e submetido ao estresse hídrico; B2 – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54; B2RH – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 e submetido ao estresse hídrico.

Em contraste com as técnicas de trocas gasosas que medem a taxa fotossintética em um dado momento, a  $\delta^{13}\text{C}$  integra a taxa de  $\text{CO}_2$  intercelular ( $\rho_i$ ) com a concentração de  $\text{CO}_2$  do ar ( $\rho_a$ ) a longo prazo (Bacon, 2004, Osório et al., 1998). É sabido que a carboxilação noturna, por meio da PEPC, leva a formação do ácido málico que é estocado nos vacúolos, sendo essa reserva degradada apenas durante o dia (Herrera 2009; Silveira et al., 2010). Conseqüentemente, todo o  $^{13}\text{C}$  proveniente da assimilação noturna, que é menos discriminado pela PEPC, permanece estocado, e isso parece ter influenciado nessa avaliação, pois, como já mencionado no item 3.11, o material utilizado foi coletado no período da manhã, ou seja, após todo o período de acúmulo de ácido málico. Portanto, a coleta realizada nesse horário, com conseqüente conteúdo de ácido málico existente no vacúolo (mais rico em  $^{13}\text{C}$ ), parece ter influenciado os valores obtidos.

De fato, esse resultado (Figura 11) está de acordo com o observado para  $A_{\text{noite}}$  nessa data (Figura 10-A), no qual também não existia diferença significativa entre os tratamentos. Sendo assim, os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  reforçam que o estresse imposto não alterou a fotossíntese líquida noturna e a aplicação das bactérias também não promoveu tal mudança.

Alguns trabalhos reportam a influência do estresse sobre os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  em plantas CAM. De acordo com Zhu et al. (1999), plantas submetidas a estresse por altas temperaturas apresentaram menores valores de  $\delta^{13}\text{C}$ . Consequentemente, quanto mais baixos os valores de  $\delta^{13}\text{C}$ , menor a contribuição do metabolismo CAM para a produção de biomassa (Herrera, 2009). Em *M. Crystallinum* (planta CAM constitutiva), foi observada uma progressiva mudança nos valores de  $\delta^{13}\text{C}$  em folhas, indo de 26 para 16‰ ao longo de 4 meses de transição de disponibilidade hídrica para seca, indicando o aumento na importância do CAM na contribuição direta no ganho de carbono (Winter et al., 1978).

A Figura 12 representa os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  do abacaxizeiro 'Vitória' após a reirrigação. Nessa avaliação, que foi feita com o material coletado no início da noite, ficou mais clara a diferença entre os tratamentos, sendo mais um indício da interferência do horário de coleta do material nos resultados do estresse máximo (Figura 11).

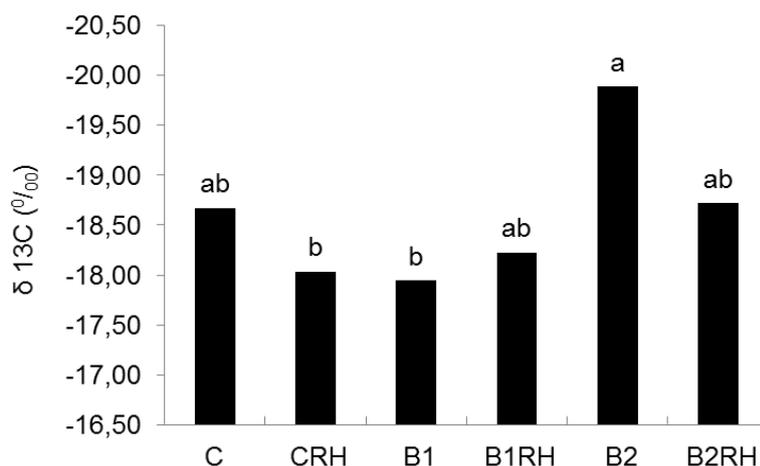


Figura 12. Composição isotópica do carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) do abacaxizeiro 'Vitória' submetido aos respectivos tratamentos dois dias após a reirrigação, com material coletado à noite. Cada coluna representa a média de 3 repetições. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente na mesma data, segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade. C – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias; CRH – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias e submetido ao estresse hídrico; B1 – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111; B1RH – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111 e submetido ao estresse hídrico; B2 – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54; B2RH – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 e submetido ao estresse hídrico.

Com relação aos resultados obtidos após a reirrigação (Figura 12), pode-se notar que estes estão de acordo com o observado para  $A_{\text{manhã}}$  nessa data (Figura 9-A, item anterior). Como a  $\delta^{13}\text{C}$  em plantas reflete a relação entre a fotossíntese e a condutância estomática em um determinado intervalo (de Souza et al., 2005), pode-se ver que o tratamento B2RH, ao aumentar os valores de  $A_{\text{manhã}}$  em resposta à reirrigação e, conseqüentemente, aumentar à proporção com que o  $\text{CO}_2$  metabolizado via  $\text{C}_3$  elevou a discriminação contra o  $^{13}\text{C}$ , atingindo valores de  $\delta^{13}\text{C}$  mais negativos e estatisticamente iguais aos tratamentos com maiores médias de discriminação, como dos tratamentos B2 e C (irrigados). Ou seja, esse resultado exalta ainda mais e comprova o que foi dito em relação à recuperação de  $A_{\text{manhã}}$  após a reirrigação do tratamento B2RH. Essa recuperação também foi observada para o tratamento B1RH, mas não foi vista para o tratamento CRH, que apresentou a menor média de discriminação, mostrando que a reirrigação não elevou as taxas fotossintéticas diurnas desse

tratamento, mantendo a maior proporção de assimilação do carbono via PEPC, da mesma forma como ocorreu para os valores de  $A_{\text{manhã}}$  (Figura 9-A), que não apresentaram elevações, e, portanto, os efeitos do estresse hídrico foram mais prejudiciais para esse tratamento.

Dessa forma, os dados observados na Figura 12 constituem um indício fortíssimo de que a utilização das bactérias, principalmente B2 é benéfica para o aumento à tolerância de plantas ao estresse hídrico. Além disso, segundo Taiz e Zeiger (2013) a maior discriminação do  $^{13}\text{C}$  significa que está ocorrendo maior participação direta da Rubisco no processo de fixação do  $\text{CO}_2$ . Portanto, o aumento na discriminação contra o  $^{13}\text{C}$  é mais um indicativo de que a utilização das bactérias, principalmente de B2 manteve a maior integridade da Rubisco, favorecendo a rápida retomada da fotossíntese líquida diurna em resposta à reirrigação. Como destacado por Ennahli e Earl (2005), isso é um fator primordial para a pronta recuperação das taxas fotossintéticas em decorrência da reirrigação.

#### 4.4.3 - Rendimento quântico máximo do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) e Índice Fotossintético “photosynthetic index” (PI):

A relação  $F_v/F_m$  baseia-se nos níveis de fluorescência variável ( $F_v$ ) e fluorescência máxima ( $F_m$ ) da clorofila para caracterizar a eficiência quântica máxima das reações fotoquímicas primárias em folhas adaptadas ao escuro (Bolhàr-Nordenkampf et al., 1989)

Nos últimos anos, muitos autores têm demonstrado que o status do aparato fotossintético é um indicador fisiológico muito útil para estudar a sensibilidade de plantas ao estresse hídrico (Strasser et al., 2010, Shao et al., 2010). Sob condições de seca, a análise da fluorescência da clorofila a tem sido amplamente utilizada em ensaios que mostram as respostas fisiológicas de plantas devido à sua alta sensibilidade para identificar alterações no sistema fotossintético, especialmente no PSII (Mehta et al., 2010). Além disso, por ser um método não destrutivo é largamente aplicado na avaliação de espécies e genótipos com relação à tolerância ao estresse hídrico (Oukarroum et al., 2007, Redillas et al., 2011). Na figura 13 temos a relação  $F_v/F_m$  do abacaxizeiro submetido aos diferentes tratamentos, ao longo do período de avaliação.

Podemos notar que até o dia 23 de outubro, os valores de todos os tratamentos se mantiveram estatisticamente iguais. Isso significa que até essa data, o estresse não havia afetado a funcionalidade do PSII dos tratamentos.

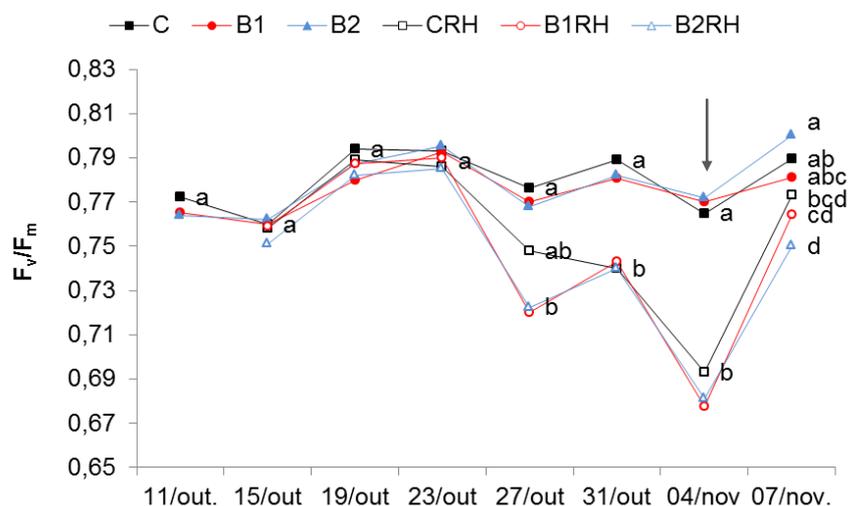


Figura 13. Eficiência quântica máxima do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ) do abacaxizeiro 'Vitória' submetido aos respectivos tratamentos. Cada símbolo representa média de 4 repetições. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente na mesma data, segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade. A seta indica o momento da reirrigação. C – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias; CRH – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias e submetido ao estresse hídrico; B1 – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111; B1RH – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111 e submetido ao estresse hídrico; B2 – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54; B2RH – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 e submetido ao estresse hídrico.

Essa resistência à redução na relação  $F_v/F_m$  em resposta ao estresse hídrico é uma característica do abacaxizeiro. Aragón et al. (2012) encontraram valores da relação  $F_v/F_m$  estatisticamente iguais após 8 semanas de avaliação em plantas de abacaxizeiro submetidas a estresse hídrico e plantas irrigadas. Obviamente, o fato dos autores terem trabalhado com plantas em ambiente com luz, temperatura e umidade relativa controlada favoreceram a essa maior persistência.

Segundo Bolhàr-Nordenkamp et al. (1989) quando uma planta não está sob estresse, os valores de  $F_v/F_m$  considerados ideais devem permanecer entre

0,75 a 0,85, o que representa a probabilidade de 75 a 85% dos elétrons absorvidos pelos pigmentos fotossintéticos efetuarem a redução da quinona A (Qa) no PSII. Os tratamentos irrigados apresentaram valores dentro dessa faixa ótima durante todo o experimento (Figura 13). A partir do dia 27 de outubro (Figura 13), percebe-se uma redução nos valores dos tratamentos com estresse, atingindo níveis abaixo do limite de 0,75 no dia do estresse máximo (4 de novembro), ou seja, a partir do dia 27 de outubro, os efeitos do estresse puderam ser visualizados por esse parâmetro, resultando em uma menor eficiência na utilização da energia luminosa no processo fotossintético. Contudo, as possíveis reduções nos valores de  $F_v/F_m$  podem representar tanto uma regulação fotoprotetora reversível como uma inativação irreversível do PSII (Long et al., 1994; Araus e Hogan, 1994). Como a reirrigação promoveu uma recuperação nesses valores, voltando a ficar acima de 0,75 em todos os tratamentos, pode-se então dizer que a redução nos valores da relação  $F_v/F_m$  foi uma resposta fotoprotetora reversível.

Em condições de baixas taxas de assimilação de  $CO_2$  devido aos efeitos do estresse hídrico, o equilíbrio entre a atividade fotoquímica no PSII e a exigência de elétrons para a fotossíntese é afetada, resultando em uma superexcitação no sistema fotossintético e danos fotoinibitórios no centro de reação do PSII (Souza et al., 2004, Santos et al., 2006). Em plantas submetidas à deficiência hídrica, quando ocorre uma redução da fotossíntese e não se atribui essa redução aos fatores estomáticos, uma possível causa é a redução da atividade fotoquímica (Torres Netto, 2005). Como pode-se observar no presente trabalho, a redução nas trocas gasosas mensuradas pela manhã nos tratamentos não-irrigados (Figura 9) foi acompanhada pelas reduções nos valores da relação  $F_v/F_m$  (Figura 13), e portanto, foram observados tanto efeitos estomáticos quanto não-estomáticos em resposta ao estresse.

Trabalhos que avaliam os efeitos da inoculação de BPCV na fluorescência da clorofila são escassos na literatura. De acordo com Zhang et al. (2008), a inoculação de BPCV em *Arabidopsis* promoveu aumento na eficiência do PSII, traduzidos pelos maiores valores da relação  $F_v/F_m$  em relação às plantas controle, o que implica no incremento de energia para esse fotossistema. O mesmo foi obtido por Gururani et al. (2012) em batata. Amor e Cuadra-Crespo (2012) mostraram que a presença de BPCV pode reduzir os impactos de estresse

salino sobre a relação  $F_v/F_m$  em plantas de pimenta. Resultados diferentes foram obtidos no presente trabalho, no qual não foi obtida diferença significativa na relação  $F_v/F_m$  entre os tratamentos irrigados. O mesmo ocorreu para os tratamentos não irrigados, mostrando a ausência de interferência da inoculação das duas bactérias nesse parâmetro.

Em geral, a relação  $F_v/F_m$  é muito utilizada como um indicador de estresse em um grande número de estudos sobre a eficiência fotoquímica da planta. No entanto, em função das situações de estresse impostas, esta variável, que é calculada com base em  $F_v$  e em  $F_m$ , nem sempre é sensível, o suficiente, para observar as diferenças entre diversos tratamentos (Stirbet e Govindje, 2011, Živčák et al., 2008).

Uma vez que nem sempre a variável  $F_v/F_m$  apresenta sensibilidade a um determinado estresse, Strasser et al, (2000) e (2004) criaram um índice mais sensível aos efeitos dos fatores do ambiente denominado índice fotossintético, ou *photosynthetic index* (PI). O PI é uma variável derivada do JIP-teste calculada a partir de três componentes que envolvem a densidade de centros de reação, a eficiência de captura e a eficiência do transporte de elétrons. Conseqüentemente, se qualquer um desses componentes for afetado, o efeito será percebido na planta, dando uma maior sensibilidade à variável quando comparada àquelas que baseiam-se em somente um componente na avaliação dos efeitos de diferentes estresses ambientais, como a relação  $F_v/F_m$  (Strasser et al., 2000, Jiang et al., 2006, Christen et al., 2007, Oukarroum et al., 2007; Živčák et al., 2008).

Embora os danos no aparato fotoquímico sejam tidos como resistentes ao estresse hídrico moderado (Cornic e Briantais, 1991; Havaux 1992; Živčák et al., 2008) encontraram uma diminuição contínua do índice fotossintético como resultado da deficiência hídrica, enquanto que a relação  $F_v/F_m$  não foi praticamente afetada até o período mais severo de desidratação. Isto está de acordo com as descobertas de Genty et al., (1987); Christen et al., (2007) e Oukarroum et al., (2007), que consideram esse parâmetro ( $F_v/F_m$ ) insensível às alterações iniciais da fotossíntese em decorrência do estresse hídrico. Resultados semelhantes não foram observados no presente trabalho, pois por meio da Figura 14 que representa o PI do abacaxizeiro 'Vitória' submetidos aos diferentes tratamentos, pode-se notar que os resultados estão de acordo e similares com o

que foi observado para a relação  $F_v/F_m$ . Dessa forma, a aplicação de bactérias não causou alterações perceptíveis na variável PI.

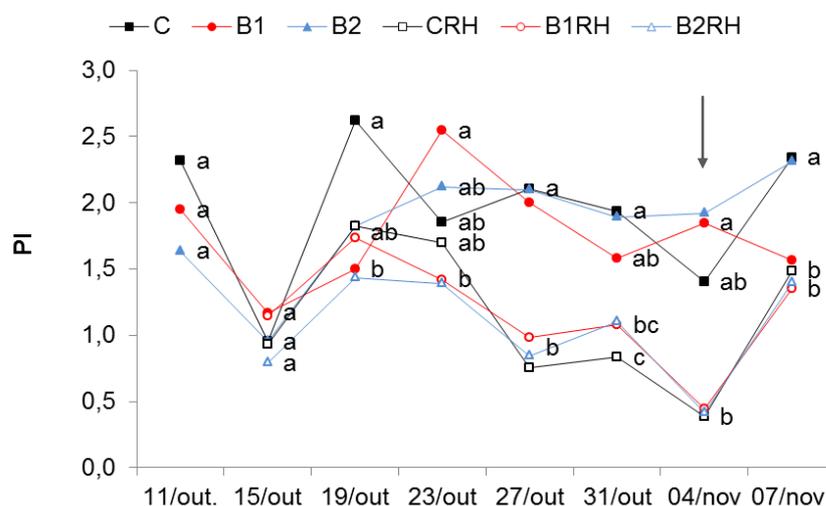


Figura 14. Índice Fotossintético “photosynthetic index” (PI) do abacaxizeiro ‘Vitória’ submetido aos respectivos tratamentos. Cada símbolo representa média de 4 repetições. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente na mesma data, segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade. A seta indica o momento da reirrigação. C – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias; CRH – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias e submetido ao estresse hídrico; B1 – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111; B1RH – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111 e submetido ao estresse hídrico; B2 – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54; B2RH – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 e submetido ao estresse hídrico.

A grande oscilação nos valores de PI pode estar relacionada às condições ambientais, já que essa variável, assim como a relação  $F_v/F_m$  é extremamente sensível às variações nas características ambientais (Valentini et al., 1994, Campostrini, 2002). De maneira geral, os valores observados para PI dos tratamentos irrigados ao longo do período de avaliação estão de acordo com os resultados obtidos por Couto (2012) para abacaxizeiro ‘Vitória’.

A imposição do estresse hídrico promoveu reduções nesse índice (Figura 14) em relação aos tratamentos irrigados, de maneira igual ao que ocorreu com a relação  $F_v/F_m$  (Figura 13), comprovando a existência de efeitos não-estomáticos em resposta ao estresse imposto. Em decorrência da reirrigação, houve também

uma recuperação nos valores de PI, reforçando a ideia de que tais efeitos não-estomáticos foram apenas uma estratégia de proteção e não foi causada uma inativação irreversível dos fotossistemas. Além disso, como todos os tratamentos não-irrigados mostraram uma rápida recuperação tanto na relação  $F_v/F_m$  como no PI após a reirrigação (Figura 13 e 14), fica claro que a pronta retomada do tratamento B2RH, no que diz respeito a fotossíntese líquida, como viu-se na Figura 9-A não se deveu a melhoria nos parâmetros relacionados com a fluorescência da clorofila, pois se assim fosse, o tratamento CRH também teria apresentado tal aumento em  $A_{manhã}$ , algo não observado.

#### 4.4.4 - Intensidade de verde:

As clorofilas estão relacionadas com a eficiência fotossintética das plantas e, conseqüentemente, com o crescimento e adaptabilidade das mesmas aos diferentes ambientes (Jesus e Marengo, 2008).

Segundo Hendry e Price (1993), o conteúdo de pigmentos fotossintéticos, principalmente as clorofilas, pode ser afetado devido à ação de fatores do ambiente como deficiências minerais, estresse hídrico, poluição industrial e temperatura infra ou supra-ótima. De acordo com Torres Netto et al. (2002 e 2005), avaliações utilizando o Medidor Portátil de Clorofila, que fornecem resultados de intensidade de verde das folhas, apresentam uma boa correlação com os teores de N e clorofila. Portanto, sua determinação permite a realização de inferências a cerca do conteúdo de pigmentos fotossintéticos, sendo bastante útil no diagnóstico do nível de estresse que possa estar atuando sobre plantas.

A intensidade de verde vem sendo estudada como uma das respostas à presença de BPCV e alguns resultados com incremento de teores de clorofila vêm sendo obtidos. A aplicação de BPCV elevou a intensidade de verde em plantas de pimenta (Amor e Cuadra-Crespo, 2012), alface (Han e Lee, 2005), e *Arabidopsis* (Zhang et al. 2008).

A Figura 15 representa a Intensidade de Verde do abacaxizeiro 'Vitória' sob os diferentes tratamentos. De maneira geral, não foi obtida diferença estatística entre os tratamentos irrigados, com algumas exceções, como no primeiro dia, no qual o tratamento B2 apresentava média significativamente maior, porém, como não houve uma constância nos resultados nos dias subsequentes,

não se pode afirmar que essa diferença foi devido ao tratamento (inoculação de B2). Resultados semelhantes foram obtidos em milho inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* (Canellas et al., 2012). Silva (2012), ao inocular as mesmas bactérias utilizadas no presente experimento em abacaxizeiro 'Vitória' observou também a ausência de efeito da aplicação na intensidade de verde.

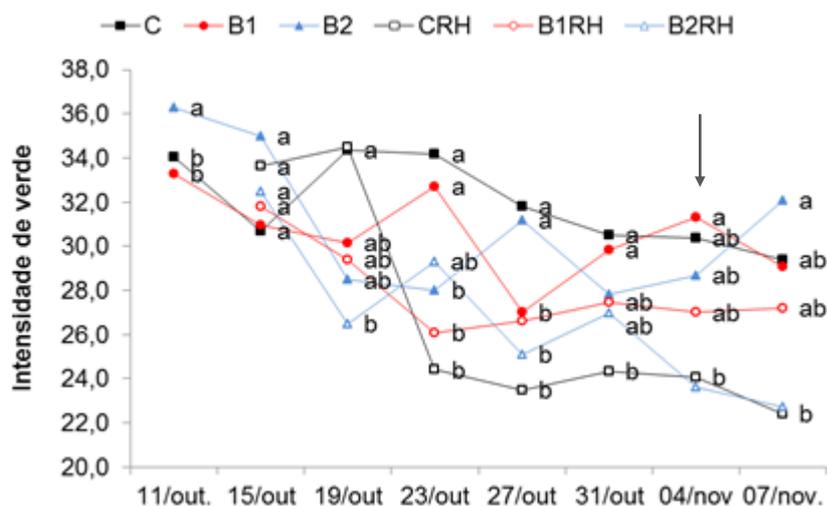


Figura 15. Intensidade de Verde do abacaxizeiro 'Vitória' submetido aos respectivos tratamentos. Cada símbolo representa média de 4 repetições. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente na mesma data, segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade. A seta indica o momento da reirrigação. C – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias; CRH – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias e submetido ao estresse hídrico; B1 – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111; B1RH – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111 e submetido ao estresse hídrico; B2 – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54; B2RH – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 e submetido ao estresse hídrico.

Com relação aos tratamentos inoculados, o tratamento CRH apresentou as menores médias com relação a esse parâmetro a partir do dia 23 de outubro, não sendo, entretanto, estatisticamente diferente dos demais tratamentos submetidos ao estresse hídrico. Reduções nos valores de intensidade de verde em resposta ao estresse hídrico foram relatadas por Aragón et al. (2012). O decréscimo da concentração de pigmentos fotossintéticos em resposta ao

estresse hídrico, pode também ter uma função adaptativa, diminuindo a captação de luz nessas plantas (Chaves, 2003).

Pode-se observar que houve muita oscilação entre os valores ao longo do período de estresse (Figura 15). Tem sido demonstrado que a posição do cloroplasto pode variar durante o dia, de acordo com variações naturais das condições de luz e que a resposta do movimento dos cloroplastos à luz pode ser bastante rápida (Williams e Barkan, 2003). Dessa forma, os valores de intensidade de verde obtidos no presente experimento podem ter sido influenciados pelas condições de luz, antes e durante as medições, algo também observado por Hoel e Solhaug, (1998) e por Martínez e Guiamet (2004).

Também houve uma redução nos valores da intensidade de verde dos tratamentos não-irrigados em relação aos irrigados com o desenvolvimento do estresse. Entretanto, o tratamento B1RH, a partir do dia 31 de outubro apresentou médias estatisticamente iguais aos tratamentos irrigados, algo não observado para os demais tratamentos em restrição hídrica (Figura 15). Isso mostra certa tolerância conferida às plantas devido à inoculação da *Burkholderia silvatlantica* UENF11711, que pode conferir vantagens nesse sentido durante a aclimatização do abacaxizeiro. Os menores valores de intensidade de verde dos tratamentos não-irrigados em relação aos demais foram observados até o último dia de avaliação, sendo que esta resposta pode ter ocorrido devido à degradação de pigmentos fotossintéticos, como clorofila (em mais intensidade) e até mesmo de carotenoides, o que geralmente é relatado como consequência da deficiência hídrica (Azevedo, 2006, Colom e Vazzana, 2002).

#### 4.5 - Densidade estomática, diâmetro e comprimento do poro estomático:

Os estômatos são estruturas fundamentais para as plantas, pois através deles ocorrem os processos de trocas gasosas e, portanto, qualquer variação em número e/ou tamanho pode acarretar maior ou menor eficiência da planta quanto à taxa fotossintética (Batagin et al., 2009). O aumento ou diminuição no número de estômatos interfere na resistência ao fluxo de CO<sub>2</sub> e de água, ou seja, tem efeito direto na fotossíntese e transpiração (Silva et al., 1999). Nesse sentido, a superfície foliar propociona uma interfase importante entre a planta e seu meio, contribuindo significativamente para o balanço energético. A sobrevivência de

plantas em condições de estresse pode, portanto, depender das características de sua superfície e do espaço entre as duas epidermes (Silva et al. (1999).

Nas folhas do abacaxizeiro, existem relativamente poucos estômatos por área ( $70-85 \text{ mm}^{-2}$ ) com poros pequenos (Bartholomew e Kadzimin, 1977; Krauss, 1949; Py, 1969). Essas e outras características anatômicas, como a presença de tricomas granulares (Aubert, 1973, Malézieux et al., 2003) e escamiformes (Barboza et al., 2006, Batagin et al., 2009), reduzem a taxa transpiratória da planta e conferem uma grande tolerância a condições de seca (Ekern, 1965, Larcher 2000).

No presente trabalho, a inoculação bacteriana e o estresse hídrico promoveram alterações na densidade estomática, no comprimento e na largura do poro estomático no dia do estresse máximo, como pode-se observar no Quadro 6.

Quadro 6. Densidade Estomática, Comprimento do Poro Estomático e Largura Central do Poro Estomático nas folhas de abacaxizeiro 'Vitória' submetido aos respectivos tratamentos no dia do estresse máximo, 24 dias após o início da imposição da restrição hídrica. Cada valor de Densidade Estomática representa a média de 5 repetições. Para os dois outros parâmetros, os valores representam a média de 15 repetições. Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente, segundo o teste de Tukey a 5% de probabilidade. C – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias; CRH – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias e submetido ao estresse hídrico; B1 – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111; B1RH – Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111 e submetido ao estresse hídrico; B2 – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54; B2RH – Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 e submetido ao estresse hídrico.

Tratamento	Densidade estomática (estômato/mm <sup>2</sup> )	Comprimento do poro estomático (µm)	Largura central do Poro estomático (µm)
<b>C</b>	70 <sup>bc</sup>	7,31 <sup>abc</sup>	1,17 <sup>ab</sup>
<b>CRH</b>	134 <sup>a</sup>	5,54 <sup>d</sup>	0,77 <sup>c</sup>
<b>B1</b>	112 <sup>ab</sup>	6,22 <sup>bcd</sup>	1,27 <sup>ab</sup>
<b>B1RH</b>	28 <sup>c</sup>	6,14 <sup>cd</sup>	1,16 <sup>ab</sup>
<b>B2</b>	86 <sup>ab</sup>	7,44 <sup>a</sup>	1,22 <sup>a</sup>
<b>B2RH</b>	87 <sup>ab</sup>	7,41 <sup>ab</sup>	0,83 <sup>bc</sup>
<b>CV (%)</b>	<b>21,71</b>	<b>16,91</b>	<b>33,04</b>

Com relação à densidade estomática, o tratamento CRH apresentou a maior média, diferindo do tratamento C e B1RH, que por sua vez apresentaram a menor média, diferindo estatisticamente do tratamento B1. Sabe-se que o aumento na densidade estomática é uma das respostas das plantas ao estresse hídrico (Silva et al., 1999, Zagdanska e kodzdój, 1994), como observado para o tratamento CRH. Ou seja, a presença da bactéria B1 fez com que a densidade estomática reduzisse em decorrência do estresse hídrico, algo não esperado. O comportamento das plantas devido à inoculação de B2 também foi controverso, já que a densidade estomática dos tratamentos contendo B2 não foi alterada pelo estresse.

De acordo com Barboza et al. (2006) folhas de abacaxizeiro durante a aclimatização possuem em média 62 estômatos mm<sup>-2</sup>. Com exceção do tratamento B1RH, os valores de densidade estomática observados no presente trabalho (Quadro 6) foram superiores àqueles.

De acordo com Silva et al. (1999), o estresse hídrico promove um aumento na densidade estomática e uma redução na abertura dos poros, como foi observado para o tratamento CRH, que apresentou menor valor do comprimento do poro estomático, sendo a diferença significativa em relação ao C. Os tratamentos contendo B2 não diferiram entre si novamente, e apresentaram as maiores médias, mostrando novamente a influência da bactéria. Com relação à largura central do poro estomático, novamente o tratamento CRH apresentou a menor média, não diferindo apenas do tratamento B2RH. Da mesma forma com que para o comprimento, o tratamento B2 apresentou maior média, não diferindo dos outros dois tratamentos irrigados e do tratamento B1RH.

Como já foi visto para as trocas gasosas, no dia do estresse máximo, as plantas dos tratamentos não-irrigados apresentavam valores significativamente iguais de  $A_{\text{manhã}}$  e  $g_{\text{s manhã}}$  (Figura 9). Esse fato está de acordo com os resultados obtidos por Jones (1976), que encontrou condutâncias similares entre genótipos de cevada com diferentes densidades estomáticas. O autor atribuiu os resultados ao fato de que os genótipos com mais estômatos, possuíam aberturas dos poros menores do que o genótipo com menor densidade. Portanto, a maior densidade estomática do tratamento CRH foi compensada por menores valores no comprimento e largura do poro estomático, e, portanto, os valores de trocas gasosas foram os mesmos.

Apesar das limitações dessa técnica, principalmente no que se refere a pequena área analisada, podemos dizer que a inoculação das duas bactérias alterou a densidade e abertura dos estômatos em resposta à deficiência hídrica, e isso pode ter tido influência direta na recuperação das plantas estressadas em virtude da reirrigação (principalmente em relação a B2RH), atuando de maneira conjunta com outros fatores, sejam eles de ordem bioquímica ou não, como observado para as trocas gasosas.

Devido a esse fato e por ter ocorrido, também, mudanças em relação aos tratamentos irrigados, a utilização de BPCV pode vir a ser uma alternativa para a adaptação de mudas a condições de aclimatização, já que a dificuldade de adaptação das mudas oriundas de cultura de tecidos ao ambiente da casa de vegetação se deve à baixa eficiência estomática que pode levar à perda excessiva de água (Barboza et al., 2006, Silva et al., 2012). Portanto, fica clara a

necessidade de se realizar estudos mais avançados e específicos em relação a essa questão para maiores esclarecimentos.

Nas Figuras 16 e 17, apresentam-se imagens de microscopia eletrônica de varredura representativas, respectivamente, da densidade e abertura estomática em folhas do abacaxizeiro 'Vitória' sob os diferentes tratamentos, nas quais podemos observar, por exemplo, a grande densidade estomática do tratamento CRH (Figura 16-B) em contraste com as menores densidades dos tratamentos B1RH e B2RH (Figura 16 - D e F), realçando o efeito da inoculação das bactérias; assim como veem-se as diferenças existentes entre os tratamentos irrigados e entre todos de maneira geral. Da mesma forma, pode-se notar a reduzida abertura estomática do tratamento CRH em relação aos demais tratamentos (Figura 17).

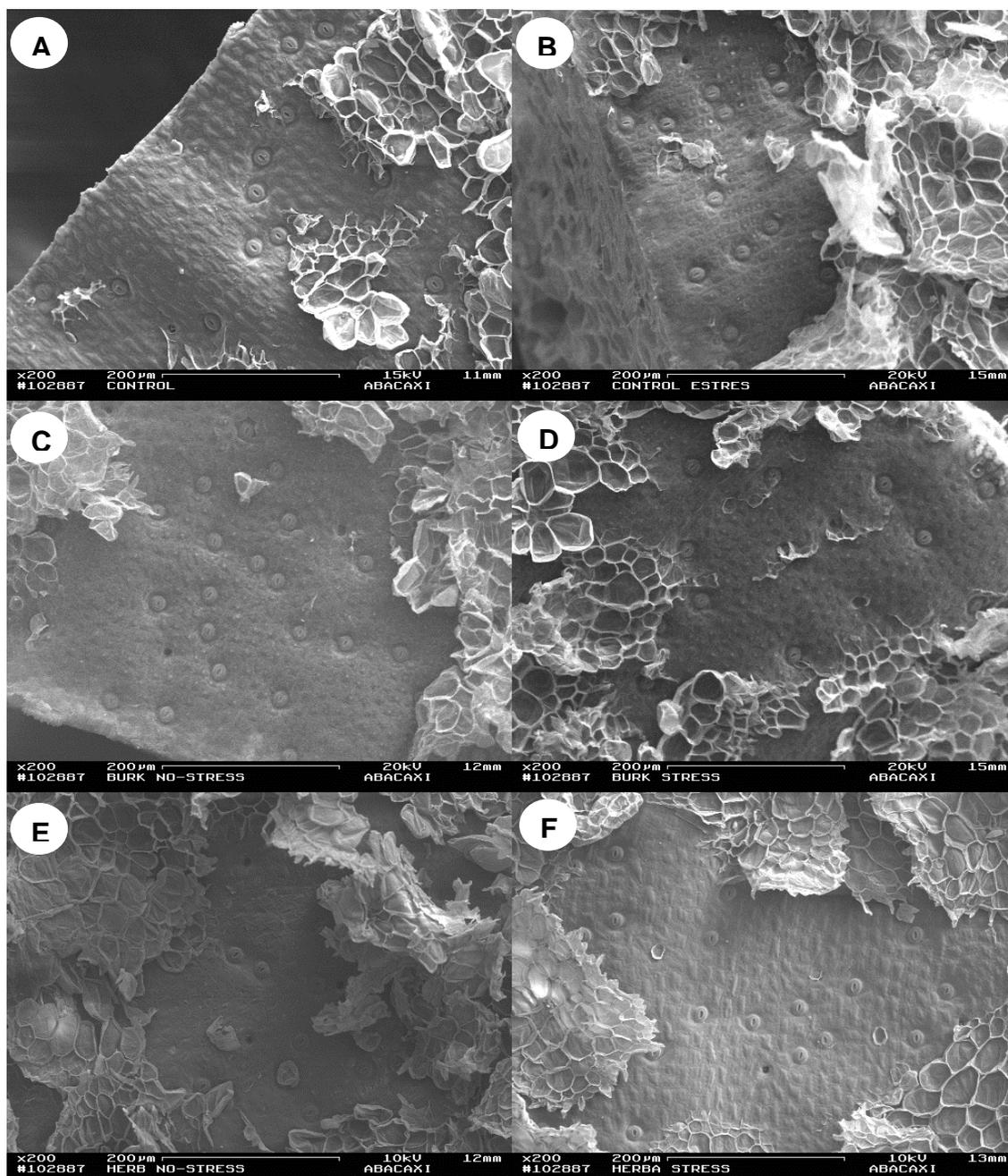


Figura 16. Microscopia Eletrônica de Varredura, ilustrando a densidade estomática em abacaxizeiro 'Vitória' submetido aos diferentes tratamentos. (A) Tratamento C - Tratamento controle, sem aplicação de bactérias, (B) Tratamento CRH; - Tratamento controle, sem aplicação de bactérias e submetido ao estresse hídrico (C) Tratamento B1 - Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111; (D) Tratamento B1RH - Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111 e submetido ao estresse hídrico; (E) Tratamento B2 - Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54e (F) Tratamento B2RH - Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 e submetido ao estresse hídrico.

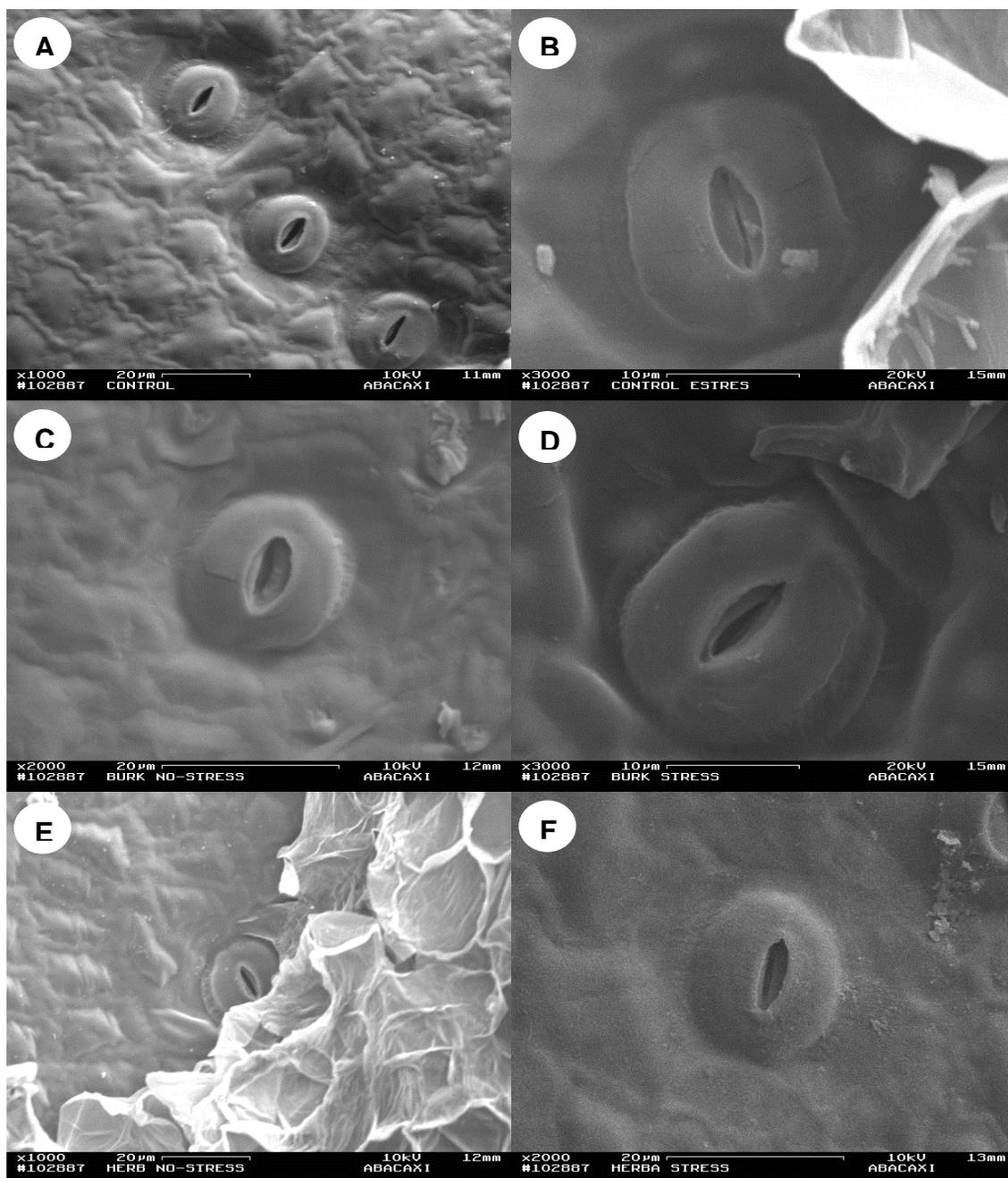


Figura 17. Microscopia eletrônica de Varredura, ilustrando a abertura estomática em abacaxizeiro 'Vitória' submetido aos diferentes tratamentos. . (A) Tratamento C - Tratamento controle, sem aplicação de bactérias, (B) Tratamento CRH; – Tratamento controle, sem aplicação de bactérias e submetido ao estresse hídrico (C) Tratamento B1 - Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111; (D) Tratamento B1RH - Tratamento com inoculação de *Burkholderia silvatlantica* UENF117111 e submetido ao estresse hídrico; (E) Tratamento B2 - Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54e (F) Tratamento B2RH - Tratamento com inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 e submetido ao estresse hídrico.

## 5 - RESUMO E CONCLUSÕES

O trabalho teve como objetivo estudar as respostas: ecofisiológicas (trocas gasosas; fluorescência da clorofila a, estimativa do conteúdo de clorofila, composição isotópica do carbono, densidade, comprimento e largura dos estômatos), nutricionais e de promoção de crescimento em plantas de abacaxizeiro 'Vitória' micropropagadas, submetidas ao estresse hídrico e inoculadas com as bactérias promotoras do crescimento vegetal *Burkholderia silvatlantica* UENF117111 e *Herbaspirillum seropedicae* HRC54 isoladamente.

Pode-se observar que a inoculação tanto da bactéria *Burkholderia silvatlantica* UENF 117111 (B1) quanto da *Herbaspirillum seropedicae* estirpe HRC-54 (B2) promoveu um aumento de aproximadamente 3 vezes na população de bactérias diazotróficas em relação ao tratamento C. Além disso, existia de uma grande população de bactérias diazotróficas associadas naturalmente às plantas, que está relacionada a características do substrato, que apresentavam considerável carga de matéria orgânica, e pelo fato de que as mudas já estavam por 60 dias sendo aclimatizadas. Dessa forma, o incremento na população das bactérias em resposta a inoculação não foi maior, devido à competição com os microrganismos já existentes e pela própria característica da inoculação, que foi via substrato, entretanto, ainda assim, a inoculação foi efetiva. Prova disso foi que ao final do experimento, as plantas dos tratamentos inoculados apresentaram maior NMP em comparação com os respectivos controles. O estresse hídrico levou a uma redução no NMP dos tratamentos controle (com uso de JNFb) e contendo B2.

Com relação ao teor de nutrientes foliares, nem a presença das bactérias, que têm características como a FBN, nem a imposição do estresse hídrico causaram alterações nesses parâmetros. Esse fato deve-se a características de cultivo, como a realização de adubações, utilização de um substrato rico do ponto de vista nutricional, e a existência das bactérias diazotróficas associadas naturalmente às plantas, que também podem ter auxiliado em processos como a FBN.

O tratamento B1 não alterou o padrão de crescimento da parte aérea em relação ao controle, ou seja, com base nos resultados de crescimento da parte aérea, pode-se dizer que a introdução de B1 não causou efeitos negativos nas plantas, e na ocasião da imposição da restrição hídrica, as plantas mantiveram seu crescimento.

Em relação à MSR, o tratamento CRH apresentou um incremento nesse valor em relação ao tratamento C, provavelmente pela inibição da síntese de etileno devido ao aumento na concentração de ABA pela ocasião do estresse hídrico, sendo este um mecanismo de defesa da planta a situações de estresse hídrico. A inoculação de B1 alterou esse padrão de crescimento radicular, pois houve uma tendência a uma maior produção de raiz, de B1 em relação ao tratamento C. Com a imposição do estresse, viu-se que os valores de MSR de B1 e B1RH estavam iguais. Logo, a tendência a um maior crescimento do sistema radicular pela presença de B1, seja ela pela presença da ACC deaminase ou pela síntese de auxinas fez com que as plantas respondessem de forma diferente ao estresse.

Assim, B1 apresenta potencial para ser utilizada para facilitar a adaptação de mudas de abacaxizeiro micropropagadas durante a aclimatização, pois, apesar de não ter promovido incrementos significativos no crescimento da parte aérea, a tendência a uma maior produção de raízes pode facilitar o estabelecimento das mudas a condição *ex vitro*, deixando as plantas menos susceptíveis ao estresse hídrico.

Por sua vez, a bactéria B2 apesar de ter promovido efeito negativo no crescimento, os resultados de MSR mostram que, de alguma forma, houve indução à tolerância contra o estresse hídrico, pelo fato da média do tratamento B2RH ter permanecido praticamente inalterada em relação a B2, apesar das médias desses tratamentos terem sido menores. Ou seja, as plantas não

responderam ao estresse da mesma forma que CRH, e o não incremento em MRS pode ser interpretado como uma menor suscetibilidade ao estresse.

Essa provável indução à tolerância ao estresse hídrico promovido por B2 ficou mais evidenciado com as medidas de trocas gasosas no período da manhã. Com a reirrigação, podemos observar que o tratamento B2RH retomou rapidamente a sua taxa fotossintética líquida, a valores estatisticamente iguais aos tratamentos irrigados. O tratamento CRH não mostrou essa recuperação, evidenciando que as plantas do tratamento B2RH apresentavam uma tolerância induzida pela presença da bactéria B2 ao estresse hídrico.

Supõe-se que, o fato de B2 não ser nativa do abacaxizeiro, pode ter desencadeado uma série de reações no hospedeiro, deixando-o mais preparado às intempéries ambientais, como uma espécie de rustificação. Dessa forma, B2 pode ter atuado de diversas maneiras como na manutenção da atividade da Rubisco, mesmo em condições de ausência de água, resultando na pronta recuperação das taxas fotossintéticas. Entretanto, como existem outras diversas teorias a respeito de como as bactérias atuam na indução à tolerância ao estresse, é necessário a realização de novos estudos, mais específicos, para se elucidar essa questão.

Fato é que a utilização de B2 na aclimatização do abacaxizeiro pode ser uma alternativa para reduzir o estresse hídrico a que as mudas são submetidas, devido às suas características anatômicas e fisiológicas inerentes das condições de cultivo *in vitro*.

O tratamento B1RH apresentou uma leve recuperação em  $A_{\text{manhã}}$  em resposta a reirrigação, devido a maior tendência ao crescimento radicular, que facilitou a absorção de água. A não recuperação de CRH mostra que os efeitos do estresse nesse tratamento foram mais severos do que nos tratamentos inoculados e que, a inoculação bacteriana é uma alternativa para reduzir os efeitos deletérios do estresse hídrico.

Os tratamentos não-irrigados mostraram uma certa tolerância à imposição do estresse hídrico, pois de maneira geral, até 12 dias após o início da restrição de água, não existia diferença significativa entre os tratamentos para  $A_{\text{manhã}}$ , sendo essa tolerância uma característica de plantas CAM. Após essa data, foi observada uma redução em  $g_s$  manhã, com consequentes diminuições na  $E_{\text{manhã}}$  e  $A_{\text{manhã}}$  e, portanto, foram observados efeitos estomáticos em resposta ao

estresse. Os valores de  $DPV_{\text{folha-ar manhã}}$  não responderam ao estresse da mesma forma, provavelmente pelas características anatômicas e morfológicas das folhas que mantêm a temperatura das mesmas, de maneira inalterada, mesmo com a ausência de água.

Houve uma tendência a um aumento na  $g_{s \text{ manhã}}$  e na  $E_{\text{manhã}}$  de todos os tratamentos, após a reirrigação, porém, o tratamento CRH não apresentou incremento na média dos valores de  $A_{\text{manhã}}$  em resposta a maior  $g_{s \text{ manhã}}$ . Portanto, a recuperação dos tratamentos inoculados não está associada a efeitos estomáticos e pode sim estar relacionada a eventos bioquímicos, como a atividade da Rubisco, pois ao contrário, todos os tratamentos deveriam ter mostrado tal incremento em  $A_{\text{manhã}}$ , como B2RH.

O estresse hídrico e a aplicação das bactérias não causaram alterações nas trocas gasosas no período noturno.

Embora não tenha existido diferença significativa entre os tratamentos no dia do estresse máximo para  $\delta^{13}\text{C}$ , que pode ter sido influenciado pelo horário de coleta do material, os resultados após a reirrigação mostram que a presença de B2 aumentou a discriminação contra o  $^{13}\text{C}$  em virtude da retomada da atividade fotossintética diurna. O mesmo foi observado para o tratamento B1RH e não foi observado para CRH. Ou seja, os tratamentos inoculados (principalmente B2RH) assimilaram o  $\text{CO}_2$  em maior proporção pelo metabolismo  $\text{C}_3$ , em relação ao CRH, após a reirrigação, com atuação direta da Rubisco, aumentando assim a discriminação contra o  $^{13}\text{C}$ , sendo mais um indício da manutenção da integridade dessa enzima pela presença das bactérias, e do efeito benéfico desses micro-organismos na indução de tolerância ao estresse.

Com relação a  $F_v/F_m$  e ao PI, pode-se perceber que não houve influência das bactérias nesses parâmetros. Também foi observada uma redução nesses valores em resposta ao estresse, quando comparado com os tratamentos irrigados, e com a reirrigação houve uma recuperação das médias, ficando a relação  $F_v/F_m$ , por exemplo, igual ou superior a 0,75 para todos os tratamentos nesse dia. Esses fatos mostram que, apesar do estresse ter promovido também efeitos não-estomáticos, esses foram respostas apenas fotoprotetoras e não uma inativação irreversível dos fotossistemas.

Apesar das oscilações nos valores de intensidade de verde ao longo do experimento, pode-se observar que também existiu uma redução nos valores da

intensidade de verde dos tratamentos não-irrigados em relação aos irrigados com o desenvolvimento do estresse. Entretanto, o tratamento B1RH, a partir do dia 31 de outubro apresentou médias estatisticamente iguais aos tratamentos irrigados, algo não observado para os demais tratamentos estressados. Isso mostra certa tolerância conferida às plantas devido à inoculação de B2, que pode conferir vantagens nesse sentido durante a aclimatização do abacaxizeiro. Como os menores valores de intensidade de verde dos tratamentos não-irrigados em relação aos demais foram observados até o último dia de avaliação, conclui-se que pode ter ocorrido degradação dos pigmentos fotossintéticos devido à ausência de água.

Esperava-se que com o estresse hídrico houvesse um aumento na densidade estomática e redução na abertura do poro. Como vimos esse padrão só foi seguido pelo tratamento CRH. Essas alterações em resposta à aplicação bacteriana, mostram que a utilização de BPCV pode vir a ser uma alternativa para a adaptação de mudas a condições de aclimatização, no sentido de melhorar a eficiência estomática. Entretanto, fica clara a necessidade de se realizar estudos mais avançados e específicos em relação a essa questão para maiores esclarecimentos dessa questão específica.

Em suma, a aplicação das duas bactérias, causam efeitos diversos no desenvolvimento do abacaxizeiro. Entretanto, pode-se concluir que, tanto a *Burkholderia silvatlantica* UENF117111 como a *Herbaspirillum seropedicae* possuem potencial para uso durante a aclimatização de mudas de abacaxizeiro no sentido de amenizar estresses abióticos.

Extrapolando os resultados para outras situações, as bactérias constituem uma opção importante para regiões que tem como característica possuir períodos de seca constante. Obviamente, novos estudos são necessários, pois como visto durante o trabalho, vários são os fatores que influenciam no sucesso da interação planta-bactéria, não podendo essa biotecnologia ser simplesmente transferida de uma situação para a outra.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adesemoye, A. O., Kloepper, J. W. (2009) Plant–microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Appl Microbiol Biotechnol*, 85: 1–12.
- Adesemoye, A.O. Torbert, H. A., Kloepper, J.W. (2008) Enhanced plant nutrient use efficiency with PGPR and AMF in an integrated nutrient management system. *Can. J. Microbiol.* 54: 876–886
- Ait Barka, E., Belarbi, A., Hachet, C., Nowak, J., Audran, J. C. (2000) Enhancement of *in vitro* growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* L. co cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 186:91-95.
- Albany, N. R., Vilchez, J. A., Garcia, L., Jimenez E (2005) Comparative study of morphological parameters of Grand Nain banana (*Musa AAA*) after *in vitro* multiplication with growth retardants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 83: 357-361.
- Almeida, O. A., Souza, L. F. S., Reinhardt, D. H., Caldas, R. C. (2002) Influence of the irrigation on the cycle of 'Pérola' pineapple in coastal tableland area of Bahia, Brazil. *Revista Brasileira de Fruticultura* 24(2):431-435.
- Amor, F. M., Cuadra-Crespo, P. (2012) Plant growth-promoting bacteria as a tool to improve salinity tolerance in sweet pepper. *Functional Plant Biology*, 39: 82–90.
- Anandham, R., Choi, K. H., Ganndhi, P. I., Yin, W. J., Kim, K. A., Madhaiyan, M., As, T. M. (2007) Evaluation of shelf life and rock phosphate solubilization of *Burkholderia* sp. In nutrient-amended clay, rice bran and rock phosphate-based granular formulation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23:1121-1129.
- Angelocci, L. R. (2002) *Água na planta e trocas gasosas/energéticas com a atmosfera: introdução ao tratamento biofísico*. Piracicaba, SP: O autor, 268 p.

- Angelopoulos, K., Dichio, B., Xiloyannis, C. (1996) Inhibition of photosynthesis in olive trees (*Olea europaea* L.) during water stress and rewatering. *Journal of Experimental Botany* 47: 1093-1100.
- Antony, E., Taybi, T., Courbot, M. I. C., Smith, J. A. C., Borland, A. M. (2008) Cloning, localization and expression analysis of vacuolar sugar transporters in the CAM plant *Ananas comosus* (pineapple). *Journal of Experimental Botany* 59(7):1895-1908.
- Antonyuk, L., Evseeva, N. (2006) Wheat lectin as a factor in plant-microbial communication and a stress response protein. *Microbiology*, 75: 470-475.
- Aragón, C., Carvalho, L., González, J., Escalona, M., Amancio, S. (2012) The physiology of ex vitro pineapple (*Ananas comosus* L. Merr. var MD-2) as CAM or C3 is regulated by the environmental conditions. *Plant Cell Rep* 31: 757–769
- Araus, J. L., Amaro, T., Voltas, J., Natkoul, H., Nachit, M. M. (1998) Chlorophyll fluorescence as a selection criterion for grain yield in durum wheat under mediterranean conditions. *Field Crops Research*, 55: 209-223.
- Araus, J. L., Hogan, K. P. (1994) Comparative leaf structure and patterns of photoinhibition of the neotropical palms. *Scheelea zonensis* and *Socratea durissima* growing in clearing and forest understory during the dry season in Panama. *Am. J. Bot.*, v. 81, n. 6, p. 726-738.
- Araus, J. L., Villegas, D., Aparicio, N., García del Moral, L. F., El Hani, S., Rharrabti, Y., Ferrio, J.P., Royo, C. (2003). Environmental factors determining carbon isotope discrimination and yield in durum wheat under Mediterranean conditions. *Crop Science* 43: 170–180.
- Arshad, M., Frankenberger Jr. W. T. (1998) Plant growth-regulating substances in the rhizosphere: microbial production and functions. *Advances in Agronomy*, 62: 45-151.
- Asada, K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50: 601–639.
- Aubert, B. (1973) *Ecologie de l'ananas*. Documento interno, IRFA, Montpellier, França, 57 p.
- Azevedo, L. C. (2006) *Secagem parcial do sistema radicular: um estudo relacionado às trocas gasosas, eficiência fotoquímica e às medidas biométricas em plantas de milho*. Monografia (Graduação em Engenharia Agrônômica) Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes – RJ, 56p.
- Azevedo, R. A., Alas, R.M., Smith, R.J., Lea, P.J. (1998) Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiologia Plantarum*, 104: 280-292.

- Bacon, M. A. (2004) Water use efficiency in plant biology. In: Bacon, M.A. (Ed) *Water use efficiency in plant biology*. Blackwell Publishing, p.1 -26.
- Bailly, C., Benamar, A., Corbineau, F., Dome, D. (1996) Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seed as related to deterioration during accelerated aging. *Physiol Plant*, 97: 104–110.
- Baldani, J. I., Baldani, V. L. D., Selsin, L. et al. (1986) Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. Nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *International journal of systematic bacteriology*, 36: 86-93.
- Baldani, J. I., Baldani, V. L. D. (2005) History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: Special emphasis on the Brazilian experience. *An. Acad. Bras. Ci.*, 77: 549-579.
- Baldani, V. L. D., Baldani, J. I., Doberëiner, J. (2000) Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia spp.* *Biology and Fertility of Soils*, 30 (5): 485-491.
- Baldani, J. I. , Caruso, L., baldani, V. L. D., Goi, S. R., Döbereiner, J. (1997) Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, 29: 911-922.
- Baldani, V.L.D., Goi, S.R., Baldani, J.I., Döbereiner, J. (1995) Localization of *Herbaspirillum spp* and *Burkholderia sp.* in rice root system. In: *International Symposium on Microbiol Ecology*. Santos, Brasil. p.133.
- Baldani, J. I., Salles, J. F., Olivares, F. L. (2002) Bactérias endofíticas como vetores de genes de resistência a insetos. In: Nass, L. L., Valois, A. C. C., de Melo, I. S., Valadares-Inglis, M. C.. (org.) *Recursos Genéticos e Melhoramento - Microrganismos*. 1ed. Brasília, 1: 589-602.
- Baldotto, L. E. B, Baldotto, M. A, Canellas, L. P., Bressan-Smith, R., Olivares, F. L. (2010) Growth promotion of pineapple 'Vitória' by humic acids and *Burkholderia spp.* during acclimatization. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*. 34:1593-1600.
- Baldotto, L. E. B. (2009) Estrutura e Fisiologia da Interação entre Bactérias diazotróficas endofíticas e eifíticas com abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – Campos dos Goytacazes – RJ, 137 p.
- Banerjee, M., Yesmin, L. (2002) Sulfur-oxidizing plant growth promoting *Rhizobacteria* for enhanced canola performance. *US Patent*.
- Barboza, S. B. S. C., Graciano-Ribeiro D., Teixeira J. B., Portes T. A., Souza LAC (2006) Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. *Pesq. Agropec. Bras.*, 41: 185-194.

- Barriuso J., Solano B.R., Fray R.G., Camara M., Hartmann A., Manero F.J.G. (2008) Transgenic tomato plants alter quorum sensing in plant growth-promoting rhizobacteria. *Plant Biotechnology Journal*, 6: 442–452.
- Bartholomew, D. P., Kadzimin, S. B. (1977) Pineapple. In: Alvim, P. T., Kozłowski, T. T. (eds) *Ecophysiology of tropical crops*. Academic Press, Nova Iorque, 113-156 pp.
- Bashan, Y., Holguin, G. (1997) Azospirillum-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Canadian Journal of Microbiology*, 43: 103-121.
- Bastián, F., Cohen, A., Piccoli, P., Luna, V., Baraldi, R., Bottini, R. (1998) Production of indol-3-acetic acid and gibberellins A(1) and A(3) by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regulation* 24: 7-11.
- Batagin, K. D., Almeida, C. V., Tanaka, F. A. O., Almeida, M. (2009) Alterações morfológicas foliares em abacaxizeiro cv. IAC Gomo de Mel micropropagados e aclimatizados em diferentes condições luminosas. *Acta Botânica Brasileira*, 23:85-92.
- Belimov A.A., Dodd I.C., Safronova V.I., Hontzeas N., Davies W.J. (2007) *Pseudomonas brassicacearum* strain Am3 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase can show both pathogenic and growth-promoting properties in its interaction with tomato. *Journal of Experimental Botany* 58, 1485–1495.
- Belimov A.A., Dodd I.C., Hontzeas N., Theobald J.C., Safronova V.I., Davies W.J. (2009) Rhizosphere bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase increase yield of plants grown in drying soil via both local and systemic hormone signalling. *New Phytologist* 181, 413–423.
- Bengozi, F. J. *Procedência, sazonalidade e qualidade físico-química do abacaxi comercializado na CEAGESP – São Paulo* (2006). Tese (Mestrado em Agronomia – Horticultura) – Botucatu – SP, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 151p.
- Berg, G. (2009) Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84 (1): 11-18.
- Bhattacharjee, R. B., Singh, A., Mukhopadhyay, S. N. (2008) Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. *Applied Microbiological and Biotechnology*, 80: 199-209.
- Biasi, L. A. (1996) *Avaliação do desenvolvimento inicial de portaenxerto e de mudas de videira obtidos através de diferentes métodos de propagação*. 1996. Tese (Doutorado em Agronomia) – Piracicaba – SP, Escola Superior de Agricultura de Luiz de Queiroz, 177p.

- Bolhàr-Nordenkamp, H.R., Long, S.P., Baker, N.R., Öquist, G., Schreiber, U., Lechner, E.G. (1989) Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. *Functional Ecology* 3: 497-514.
- Bomfim, G.V., Azevedo, B.M., Viana, T.V.A., Furlan, R.A., Carvalho, A.C.P.P. (2011) Aclimatização *ex vitro* de abacaxizeiro ornamental com diferentes frequências de irrigação. *Irriga*, Botucatu, 16(1):104-114.
- Borland, A. M., Griffiths, H. (1989) The regulation of citric acid accumulation and carbon recycling during CAM in *Ananas comosus*. *J. Exp. Bot.* 40: 53–60.
- Bota, J., Medrano, H., Flexas, J. (2004) Is photosynthesis limited by decreased Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress? *New Phytologist* 162: 671–681.
- Bottini, R., Richard, P. P., Fulchieri, M., Pearce, D. (1989) Identification of gibberellins A1, A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. *Plant Physiology*, 90: 45-47.
- Bowler C, van Montagu M, Inze D (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 43:83– 116.
- Brugnoli, E., Farquhar, G. D. (2000). Photosynthetic fractionation of carbon isotopes. In: Leegood, R. C., Sharkey, T. D., von Caemmerer, S. (eds.) *Advances in photosynthesis: physiology and metabolism*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 399–434.
- Buddendorf-Joosten, J.M.C., Woltering, E.J. (1994) Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development *in vitro*. *Plant Growth Regulation*, 15: 1-16.
- Burkart, S., Manderscheid, R., Weigel, H. J. (2004) Interactive effects of elevated atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations and plant available soil water content on canopy evapotranspiration and conductance of spring wheat. *Eur. J. Agron.* 21, p. 401-417.
- Burkholder, W. (1950) Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopathology* 40: 115-118.
- Cabral, J.R.S., Souza, A.S., Matos, A.P., Caldas, R.C. (2003) Efeito da autofecundação em cultivares de abacaxi. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal*, 25: 184-185.
- Carvalho, V. D. de, Cunha, G. A. P. (1989) Produtos e usos. In: *O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia*. EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, Brasília, p.389-402.
- Campostrini, E. (2002) *Fluorescência da Clorofila a: Considerações Teóricas e Aplicações Práticas*. 34 p. (Apostila).

- Campostrini, E., Otoni, W.C. (1996) *Aclimatização de plantas: abordagens recentes*. Brasília: Embrapa-CNPq. 12p. (ABCTP notícias, 25).
- Canellas, L. P., Balmori, D. M., Médici, L. O., Aguiar, N. O., Campostrini, E., Rosa, R. C. C., Façanha, A. R., Olivares, F. L. (2012) A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). *Plant Soil*, Springer Science, 14p.
- Casanovas E.M., Barassi C.A., Sueldo R.J. (2002) *Azospirillum* inoculation mitigates water stress effects in maize seedlings. *Cereal Research Communications*, 30: 343–350.
- Cassan, F., Bottini, R., Schneider, G., Piccoli P. (2001) *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* hydrolyze conjugates of GA(20) and metabolize the resultant aglycones to GA(1) in seedlings of rice dwarf mutants. *Plant Physiology*, 125: 2053–2058.
- Cassells, A.C., Walsh, C. (1994) The influence of gas permeability of the culture lid on calcium uptake and stomatal function in *Dianthus* microplants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 37: 171-178.
- Chaves, M.M., Maroco, J., Pereira, J.S. (2003) Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. *Functional plant Biology*. 30: 239-264.
- Chakraborty, U., Chakraborty, B. N., Chakraborty, A. P., Dey, P. L. (2013) Water stress amelioration and plant growth promotion in wheat plants by osmotic stress tolerant bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29 (5): 789-803.
- Chowdhury, S. R., Choudhuri, M. A. (1985) Hydrogen peroxide Kruger, 1994, Gong et al., 1997). The dramatic increase metabolism as an index of water stress tolerance in jute. Physiol. in MDA content was related to reductions in SOD, *Plant*. 65: 503–507.
- Christen, D., Schönmann, S., Jermini, M., Strasser, R. J., Défago, G. (2007) Characterization and early detection of grapevine (*Vitis vinifera*) stress responses to esca disease by *in situ* chlorophyll fluorescence and comparison with drought stress. *Environ. Exp. Bot.* 60. p. 504–514.
- Cloern, J. E., Canuel, E. A., Harris, D. (2002) Stable carbon and nitrogen isotope composition of aquatic and terrestrial plants of the San Francisco Bay estuarine system. *Limnol Oceanogr*, 47: 713–729
- Collins, J. L. (1960) *The pineapple: botany, cultivation and utilization*. London: Leonard Hill. 240 p.
- Colom, M. R., Vazzana, C. (2002) Photosynthesis and PSII functionality of drought-resistant and drought-sensitive weeping lovegrass plants. *Environmental and Experimental Botany*. p. 1-10.

- Conceição, P. M., Vieira, H. D., Canellas, L. P., Marques Júnior, R. B., Olivares, F. L. (2008) Recobrimento de sementes de milho com ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas. Nota Científica. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43:545-548.
- Conrath, U., Conrath, G.J.M., Flors, V., García-Agustín, P., Jakab, G., Mauch, F., Newman, M. A., Pieterse, C. M., Poinssot, B., Pozo, M. J., Pugin, A., Schahrath, U., Ton, J., Wendehenne, D., Zimmerli, L., Mauch-Mani, B. (2006) Priming: getting ready for battle. *Molecular Plant–Microbe Interactions*, 19: 1062–1071.
- Coppens d'Eeckenbrugge, G., Leal, F. (2003) Morphology, anatomy and taxonomy. In: Bartholomew, D.P. (org) *The pineapple - botany, production and uses*. Oxon: CABI, p.13-32.
- Corsato, C. E. (1993) *Comportamento fisiológico do morangueiro (Fragaria x ananassa Duch.) micropropagado e aclimatado na presença de fungos endomicorrízicos*. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura de Luiz de Queiroz, Piracicaba, 49p.
- Costa, M da., Huang, B. (2007) Changes in Antioxidant Enzyme Activities and Lipid Peroxidation for Bentgrass Species in Response to Drought Stress. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 132: 319–326.
- Côte, F. X. (1988) *Photosynthèse et photorespiration d'une plante à metabolisme crassulacéen: Ananas comosus (L.) Merr. Etude des échanges gazeux*. Tese (Doutorado) – Toulouse- Universidade de Toulouse.
- Côte, F. X., Folliot, M. Andre, M. (1993) Photosynthetic crassulacean acid metabolism in pineapple: diel rhythm of CO<sub>2</sub> fixation, water use, and effect of water stress. *Acta Horticulturae*, 334: 113 – 129.
- Cowan, A.K., Cairns, A. L. P., Bartels-Rham, B. (1999) Regulation of abscisic acid metabolism: towards a metabolic basis for abscisic acid-cytokinin antagonism. *J. Exp. Bot.* 50: 595–603.
- Creus, C. M., Sueldo, R. J., Barassi, C.A. (2004) Water relations and yield in Azospirillum-inoculated wheat exposed to drought in the field. *Canadian Journal of Botany*, 82: 273–281.
- Cui, Y.Y., Hahn, E.J., Kozai, T., Paek, K.Y. (2000) Number of air exchanges, sucrose concentration, photosynthetic photon flux, and differences in photoperiod and dark period temperatures affect growth of *Rehmannia glutinosa* plantlets in vitro. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, Dordrecht, 62: 219-226.
- Cunha, G A. P., cabral, J. R. S. (1999) Taxonomia, espécies, cultivares e morfologia. In: Cunha, G. A. P., Cabral, J. R. S., Souza, L. F. S. *O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia*. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, p. 17-28.

- Cunha, G. A. P. (1999) Aspectos Agroclimáticos. In: *O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia*. EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, Brasília, p.53-66.
- Cunha, G.A.P. (2007) *Equipe técnica de abacaxi comemora 30 anos de atividades e realizações*. Documentos, 170. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical. 20 p.
- Cushman, J. C. (2001) Crassulacean acid metabolism plastic photosynthetic adaptation to arid environments. *Plant Physiol.* 127: 1439-1448.
- Cushman, J.C., Bohnert, H.J. (1999) Crassulacean acid metabolism: molecular genetics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* 50, 305–332.
- Dary, S., Desjardins, Y., Le, V. (2001) Sucrose enhances phosphoenol pyruvate conditions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology, Plant*, 37:130-139.
- Dat, J. F., Lopez-Delgado, H., Foyer, C. H. Scott, I. M. (1998) Parallel changes in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiol.* 116: 1351–1357.
- Deng, R., Donnelly, D.J. (1993) *In vitro* hardening of red raspberry through CO<sub>2</sub> enrichment and relative humidity reduction on sugar-free medium. *Can. J. Plant Sci.* 73: 1105-1113. FAO. FAOSTAT. Disponível em: < <http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 20 maio. 2012.
- Desjardins, Y., Hdider, C., Riek, J. (1995) Carbon nutrition *in vitro*: regulation and manipulation of carbon assimilation in micropropagated systems. In: Akten-Christie, J., Kozai, T., Smith, M.L. (eds.) *Automation and environmental control in plant tissue culture*. Kluwer Academic Publishers, A.A. Dordrecht, The Netherlands, p. 441-471.
- Dimkpa, C., Weinand, T., Asch, F. (2009) Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant, Cell and Environment*, 32: 1682–1694.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Vande Broek, A., Vanderleyden, J. (1999) Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil*, 212: 155–164.
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., Okon, Y. (2003) Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Review in Plant Sciences*, 22: 107-149.
- Döbereiner, J., Andrade, V. O., Baldani, V. L. D. (1999) *Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia*. Documento Nº 110. Embrapa Agrobiologia – Seropédica – RJ. 39p.

- Döbereiner, J., Day, J. M. (1995) Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and nitrogen-fixing sites. In: *International Symposium On Nitrogen Fixation*, 1., Pullman. Proceedings. Pullman.
- Döbereiner, J., Ruschel, A.P. (1958) Uma nova espécie de *Beijerinckia*. *Revista de Biologia*, Lisboa, 1: 261-272.
- Dodd, A. N, Griffiths, H, Taybi, T, Cushman, J. C., Borland, A. M. (2003) Integrating Diel Starch Metabolism with the Circadian and Environmental Regulation of Crassulacean Acid Metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Planta* 216(5), 789-797.
- Drennan, P.M., Nobel, P.S. (2000) Responses of CAM species to increasing atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations. *Plant, Cell and Environment*. 23, 767–781.
- EMBRAPA (2009) Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. 2<sup>o</sup> edição, revista e ampliada. Brasília, 627 p.
- Ekern, P. C. (1965) Evapotranspiration of pineapple in Hawaii. *Plant Physiology*. 40: 736-739.
- Ennahli, S., Earl, H. J. (2005) Physiological limitations to photosynthetic carbon assimilation in cotton under water stress. *Crop Science*. 45: 2374–2382.
- FAO. FAOSTAT (2013) *Agricultural statistics database*. Home: World Agricultural Information Center. Disponível em: <http://apps.fao.org>. Acesso em: 25/02/2014.
- Faria, R.T., Assis, A.M., Unemoto, L.K., Carvalho, J.F.R.P. (2012) Aclimatização. In: Faria, R.T., Assis, A.M., Unemoto, L.K., Carvalho, J.F.R.P. (orgs.) *Produção de Orquídeas em Laboratório*, Londrina: Mecenias, p. 95-102.
- Farias, M.F., Saad, J.C.C. (2005) Crescimento e qualidade de crisântemo cultivado em vaso sob ambiente protegido. *Horticultura Brasileira*, Brasília, 23(3):740-742.
- Faria, T., Garcia-Plazaola, J.I., Abadia, A., Cerasoli, S., Pereira, J.S., Chaves, M.M. (1996) Diurnal changes in photoprotective mechanisms in leaves of cork oak (*Quercus suber*) during summer. *Tree Physiology* 16: 115-123
- Faria, T., Silverio, D., Breia, E., Cabral, R., Abadia, A., Abadia, J., Pereira, J.S., Chaves, M.M. (1998) Differences in the response of carbon assimilation to summer stress (water deficits, high light and temperature) in four Mediterranean tree species. *Physiologia Plantarum*, 102 (3): 419-428
- Farquhar G. D., Ehleringer, J. R., Hubick, K. T. (1989) Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review of Plant and Plant Molecular Biology*. 14: 503-537.

- Figueiredo, V.B. Burity, H. A., Martínez, C. R., Chanway, C. P. (2008) Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. *Appl. Soil Ecol*, 40: 182–188.
- Flexas, J., Ribas-Carbó, M., Bota, J., Galmés, J., Henkle, M., Martínez-Cañellas, S., Medrano, H. (2006) Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO<sub>2</sub> concentration. *New Phytologist*. 172: 73–82.
- Folliot, M., Marchal, J. (1990) Influence du support de culture sur la vitesse de croissance in vitro des plantes d'ananas en phase d'acclimatation. *Fruits*, Paris, 45: 367-376.
- Foyer, C. H., Lelandais, M., Kunert, K. J. (1994) Photooxidative stress in plants, *Physiol. Plant*, 92: 696–717.
- Franquhar, G. D., Ehleringer, J. R., Hubick, K. T. (1989) Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annual Review of plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40: 503-537.
- Freschi, L., Rodrigues, M. A., Domingues, D. S., Purgatto, E., Sluys, M. A., Magalhães, J. R., Kaiser, W. M., Mercier, H. (2010) Nitric oxide mediates the hormonal control of crassulacean acid metabolism expression in young pineapple plants. *Plant Physiology* 154(4):1971-1985.
- Fuentes, G., Talavera, C., Desjardins, Y., Santamaría, J.M. (2007) Low exogenous sucrose improves ex vitro growth and photosynthesis in coconut *in vitro* plantlets if grown in vitro under high light. *Acta Horticulturae*, 748: 151-156.
- Fuchigami, L.H., Cheng, T.Y., Soeldner, A. (1981) Abaxial transpiration and water loss in aseptically cultured plum. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 106: 519-522.
- Gaudillère, J.P., Van Leeuwen, C., Ollat, N. (2002). Carbon isotope composition of sugars in grapevines, an integrated indicator of vineyard water status. *Journal of Experimental Botany*, 53: 757–763.
- Genty, B., Briantais, J., da Silva, J. B. V. (1987) Effects of drought on primary photosynthetic process of cotton leaves. *Plant Physiology* 83: p. 360-364.
- Ghashghaie, J., Duranceau, M., Badeck, F. W., Cornic, G., Adeline, M. T., Deleens, E. (2001).  $\delta^{13}\text{C}$  of CO<sub>2</sub> respired in the dark in relation to  $\delta^{13}\text{C}$  of leaf metabolites: comparison between *Nicotiana glauca* and *Helianthus annuus* under drought. *Plant, Cell and Environment*, 24: 505–515.
- Giro, V. B (2011) *Crescimento do abacaxizeiro 'vitória' em resposta à aplicação de vermicomposto, ácidos húmicos e bactérias promotoras de crescimento*. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 96p.

- Glick, B. B., Penrose, D. M., Li, J. (1998) A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting rhizobacteria. *Journal of Theoretical Biology*, 190: 63-68.
- Gonçalves, N. B., Carvalho, V. D. (2000) Características da Fruta. In: Gonçalves, N. B. *Abacaxi. Pós-colheita*. Brasília: Embrapa, 45 p.
- González-Olmedo, J.L., Fundora, Z., Molina, L.A., Abdulnor, J., Desjardins, Y., Escalona, M. (2005) New contributions to propagation of pineapple (*Ananas comosus* L. Merr.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 47: 87-90.
- Grattapaglia, D., Machado, M.A. (1990) Micropropagação. In: Torres, A.C., Caldas, L.S. (Eds), *Técnicas e Aplicações da Cultura de Tecidos de Plantas*. Brasília, Embrapa, p. 99-169.
- Green, G. C. (1963) The pineapple plant. In: *World Meteorological Organization, Geneva*. The effect of weather and climate upon the keeping quality of fruit. Geneva: WMO, p. 136-180.
- Griffiths H. (1992) Carbon isotope discrimination and the integration of carbon assimilation pathway in terrestrial CAM plants. *Plant, Cell and Environment* 15:1051-1062.
- Gururani, M. A., Upadhyaya, C. P., Baskar, V., Venkatesh, J., Nookaraju, A., Park, S. W. (2012) Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Enhance Abiotic Stress Tolerance in *Solanum tuberosum* Through Inducing Changes in the Expression of ROS-Scavenging Enzymes and Improved Photosynthetic Performance. *J Plant Growth Regul.* 14p.
- Gyaneshwar, P., Kumar, G. N., Parekh, L. J., Poole, P. L. (2002) Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil* 245: 83–93
- Haang-Kerwer, A (1994) Photosynthetische Plastizität bei *Clusia* und *Oedematopus*. Tese de Doutorado, Darmstadt. 99 p.
- Han, H. S., Lee, K. D. (2005) Plant Growth Promoting Rhizobacteria Effect on Antioxidant Status, Photosynthesis, Mineral Uptake and Growth of Lettuce under Soil Salinity. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 1(3): 210-215.
- Hanson, A. D., Nelsen, C. E., Pedersen, A. R., Everson, E. H. (1979) Capacity for proline accumulation during water stress in barley and its implications for breeding for drought resistance. *Crop Sci*, 19: 489–493.
- Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies, F.T. (1990) *Plant propagation*. Singapore, Prentice-Hall, 647p.
- Hartung, W., Slovik, S. (1990) Tansley review No.35. Physicochemical properties of plant growth regulators and plant tissues determine their distribution and redistribution by abscisic acid in leaves. *New Phytologist*, 119: 361-382.

- Haupt-Herting, S., Fock, H.P. (2000) Exchange of oxygen and its role in energy dissipation during drought stress in tomato plants. *Physiologia plantarum*, 110: 489-495.
- Hazarika, B. N. (2006) Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Sci. Hort.* 108: 105-120.
- Hendry, G.A.F., Price, A.H. (1993) Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. In: Hendry, G.A.F., Grime, J.P. (eds). *Methods in comparative plant ecology*. London: Chapman e Hall, p. 148 -152.
- Hepton, A. (2003) Cultural System. In: Bartholomew, D., Rohrback, K., Paull, R. E. *The pineapple: Botany, Production e Uses*. International CAB, Australia, p. 109-142.
- Herrera, A. (2009) Crassulacean Acid Metabolism and Fitness under Water Deficit Stress: If Not for Carbon Gain, What Is Facultative CAM Good for? *Annals of Botany* 103(4): 645-653.
- Herrera A, Delgado J, Paraguatey I. 1991. Occurrence of Crassulacean acid metabolism in *Talinum triangulare* (Portulacaceae). *Journal of Experimental Botany*, 42: 493–499.
- Hoel, B. O., Solhaug, K. A. (1998) Effect of irradiance on chlorophyll estimation with the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. *Ann Bot* 82: p. 389-392.
- Houllou-Kido, L.M., Silva, K.S., Rivas, R., Dias, A.L.F., Alves, G.D. (2009) Viability of *Noppalea cochenilifera* (cv. IPA Sertania) photoautotrophic micropropagation. *Acta Horticulturae*, 811: 309-313.
- Hu, Y., Schimidahalter, U.I. (1998) Spatial distribution of inorganics ions and carbohydrates contributing to osmotic adjustment in the elongation wheat leaf under saline conditions. *Australian Journal Plant Physiology*, 25 : 591-597.
- Van Huylbroeck, J. M., Huygens, H., Debergh, P. C. (1995) Photoinhibition during acclimatization of micropropagated *Spathiphyllum* 'Petite' plantlets, *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 31: 160–164.
- IBGE – Sistema IBGE de recuperação automática – SIDRA. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 18 de dez. 2012.
- Idso, S.B. (1988). Comment on "Biotic changes consistent with increased seasonal amplitude of atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations" by R. A. Houghton. *Journal of Geophysical Research*, 93p.
- Isles, A., Maclusky, I., Corey, M., Gold, R., Prober, C., Fleming, P., Levison, H. (1984) *Pseudomonas cepacia* infection in cystic fibrosis: an emerging problem. *Journal of Pediatrics* 104: 206-210.

- Itzigsohn, R., Burdman, S., Okon, Y., Zaady, E., Yonatan, R., Perevolotsky, A. (2000) Plant-growth promotion in natural pastures by inoculation with *Azospirillum brasilense* under sub-optimal growth conditions. *Arid Soil Research and Rehabilitation*, 13:151-158.
- James, E. K., Gyaneshwar, P., Mathan, N., Barraquio, W. L., Reddy, P. M., Iannetta, P. P. M., Olivares, F. L., Ladha, J. K. (2002) Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Mol Plant Microb Interact*. 15: 894–906.
- Jagtap, V., Bhargava, S., Streb, B., Feierabend, J. (1998) Comparative effect of water, heat and light stresses on photosynthetic reaction tions in *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *J. Exp. Bot.* 49: 1715–1721.
- Jesus, S. V., Marengo R. J. (2008) O SPAD-502 como alternativa para a determinação dos teores de clorofila em espécies frutíferas. *Acta amazônica*. 38: 815-818.
- Jiang C. D., Shi L., Gao H. Y., Schansker G., Tóth S. Z., Strasser R. J. (2006) Development of photosystems 2 and 1 during leaf growth in grapevine seedlings probed by chlorophyll *a* fluorescence transient and 820 nm transmission *in vivo*. *Photosynthetica*, 44: p. 454–463.
- Jiang, F., Hartung, W. (2008) Long-distance signalling of abscisic acid (ABA): the factors regulating the intensity of the ABA signal. *Journal of Experimental Botany*. 59: 37–43.
- Jones, H. G. ( 1976) Crop characteristics and the ratio between assimilation and transpiration. *Journal Applied Ecology*. 13:605-622.
- Jones, H. G., Jones, M. B. (1989) Introduction: some terminology and common mechanisms, in: H.G. Jones, T.J. Flowers, M.B. Jones (Eds.), *Plants Under Stress*, Cambridge university Press, Cambridge, p. 1–10.
- Jones, H.G. (1992) *Plant and microclimate: A quantitative approach to environmental plant physiology*. 2 ed.: Cambridge University Press, 19-46.
- Jones, H.G., Stoll, M., Santos, T., de Sousa, C., Chaves, M.M., Grant, O.M. (2002) Use of infrared thermography for monitoring stomatal closure in the field: application to grapevine. *Journal of Experimental Botany*. 53: 224-2260.
- Kaldenhoff, R., Fischer, M. (2006) Review: Aquaporins in plants. *Acta Physiologica*, 187: 169-176.
- Kasim, W. A., Osman, M. E., Omar, M. N., El-Daim, I. A. A., Bejai, S., Meijer, J. (2013) Control of Drought Stress in Wheat Using Plant-Growth-Promoting Bacteria. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(1): 122-130.
- Katiyar, V., Goel, R. (2004) Siderophore mediated plant growth promotion at low temperature by mutant of fluorescent pseudomonad. *Plant Growth Regulation*, 42: 239-244.

- Keller, P., Luttge, U. (2005) Photosynthetic light-use by three bromeliads originating from shaded sites (*Ananas ananassoides*, *Ananas comosus* cv. Panare) and exposed sites (*Pitcairnia pruinosa*) in the medium Orinoco basin, Venezuela. *Biol Plant.* 49:73–79.
- 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 & Biochemistry.* 36: 1229–1244.
- Khan, S.V., Kozai, T., Ngyen, O.T., Kubota, C., Dhawan, V. (2003) Growth and water relations of *Paulownia fortunei* under photomixotrophic and photoautotrophic conditions. *Biologia Plantarum*, 46: 161-166
- Khalid, A., Arshad, M., Zahir, Z. A. (2004) Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology* 96: 473-480.
- Kloepper, J.W., Ryu, C. M., Zhang, S. (2004) Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* species. *Phytopathology.* 94: 1259–1266.
- Kloepper, J.W., Gutiérrez-Estrada, A., McInroy, J. A. (2007) Photoperiod regulates elicitation of growth promotion but not induced resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Can. J. Microbiol.* 53: 159–167.
- Kluge. M., Ting, I.P. (1978) Crassulacean acid metabolism: Analysis of an ecological adaptation. *Springer Verlag*, New York.
- Kochar, M., Upadhyay, A., Srivastava. (2011) Indole-3-acetic acid biosynthesis in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Psd and plant growth regulation by hormone overexpression. *Research in Microbiology*, 162: 426-435.
- Kohler, J., Hernández, J. A., Caravaca, F., Roldán, A. (2008) Plant-growth promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi modify alleviation biochemical mechanisms in water-stressed plants. *Fun Plant Biol*, 35: 141–151.
- Kozai, T. (1991) Photoautotrophic micropropagation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 27:47-51.
- Kramer, P.J., Boyer, J.S. (1995) *Water Relations of Plants and Soils*. American Press, 495 p.
- Krause, G. E., Weis, E. (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42: 313–349.
- Krauss, B. H. (1949) Anatomy of the vegetative organs of the pineapple, *Ananas comosus* (L.) Merr. II. The leaf. *Botanical Gazette*, 110: 333-404.

- Lal, B., Rao, V. M. (1990) Effect of inoculation with *Azospitillum brasilense* on growth and nitrogen content of *Cynodon dactylon* under different moisture regimes. *Indian Plant Physiology*, 33: 210-213.
- Larcher, W. (2000) *Ecofisiologia vegetal*. São Carlos, Rima.
- Leifert, C., Cassells, A. C. (2001) Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In Vitro Cellular Development Biology – Plant*, Columbia, v. 37, p. 133-138.
- Le Roux. (1951) *The pineapple in South Africa. Farming in South Africa*, 26: 198-202.
- Le Roux, D., Stock, W.D., Bond, W.J., Maphanga, D. (1996). Dry mass allocation, water use efficiency and  $\delta^{13}\text{C}$  in clones of *Eucalyptus grandis*, *E. grandis camaldulensis* and *E. grandis nitens* grown under two irrigation regimes. *Tree Physiology*, 16: 497–502.
- Liu, J., Zhu, J.K. (1998) A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance, *Science*, 280: 1943–1945.
- Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E. R. B., Taghavi, S., Mezgeay, M., van der Lelie, D. (2002) Endophytic bacteria and their potential applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21: 583-606
- Long, S. P., Humphries, S., Falkowski, P. G. (1994) Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 45: p. 633-662.
- López-Valdez, F., Fernández-Luqueño, F., Ceballos-Ramírez, J. M., Marsch, R., Olalde-Portugal, V., Dendooven, L. (2011) A strain of *Bacillus subtilis* stimulates sunflower growth (*Helianthus annuus* L.) temporarily. *Scientia Horticulturae*, 128: 499–505.
- Lüttge, (2002) U. CO<sub>2</sub>-Concentrating: Consequences in Crassulacean Acid Metabolism. *Journal of Experimental Botany*, 53(378): 2131-2142.
- Lüttge U. (2004) Ecophysiology of Crassulacean acid metabolism (CAM). *Annals of Botany* 93: 629-652.
- Lüttge, U (2008) *Physiological Ecology of Tropical Plants*. 2 ed. Cap. 5, Springer, p. 149-164.
- Luvizotto, D. M. (2008) *Caracterização Fisiológica e molecular de Burkholderia spp. Associadas às raízes de cana-de-açúcar*. Tese (Mestrado em Agronomia) – Piracicaba – SP, Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 94 p.
- Lu, C., Zhang, J. (1999) Effects of water stress on photosystem II photochemistry and its thermostability in wheat plants. *Journal of Experimental Botany*, 50:336, p. 1199-1206.

- Mahajan, S., Tuteja, N. (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444: 139–158.
- Malavolta, E. (1980) *Elementos de nutrição mineral de plantas*. São Paulo, Cerer., 251p.
- Malavolta, E., Vitti, G. C., Oliveira, S. A. (1997) *Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações*. 2 ed. Piracicaba: Potafos. 319 p.
- Malézeux, E., Côte, F., Bartholomew, D. P. (2003) Crop Environment, Plant Growth and Physiology. In: Bartholomew, D., Rohrbach, K., Paull, R. E. *The pineapple: Botany, Production e Uses*. International CAB, Australia, p. 68 – 108.
- Malézieux, E., Bartholomew, D. P. (2003) Plant Nutrition. In: Bartholomew, D.P., Paul, R.E., Rohrbach, K.G. (eds.) *The pineapple - botany, production and uses*. Honolulu: CABI Publishing, p. 143-165.
- Mantelin, S., Touraine, B. (2004) Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability impacts on root development and nitrate uptake. *J. Exp. Bot.* 55: 27–34.
- Marin, V. A., Baldani, V. L. D., Teixeira, K. R. S., Baldani, J. I. (1999) *Fixação biológica de nitrogênio de importância para agricultura tropical*. EMBRAPA, p. 4.
- Marques Júnior, R., Canellas, L. P., Silva, L. G., Olivares, F. L. (2008) Promoção de enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas. *R. Bras. Ci. Solo*, 32:1121-1128.
- Martínez, D. E., Guiamet, J. J. (2004) Distortion of the SPAD 502 chlorophyll meter readings by changes in irradiance and leaf water status. *Agronomie*, 24: 41-40.
- Matiz, A., Mito, P. T., Mayorga, A. Y., Freschi, L., Mercier, H. (2013) *CAM Photosynthesis in Bromeliads and Agaves: What Can We Learn from These Plants?*. In: Dubinsky, Z. *Photosynthesis* .44 p.
- Matos, A. P. de. (1999) Doenças e seu Controle. In: *O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia*. EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, Brasília, p.269-305.
- Matos, A. P. de. (1987) Pineapple fusariosis in Brazil: an overview. *Fruits*, 42: 417-422.
- Matos, A. P. de, Mourichon, X., Lapeyre, F. (1991) Reaction of pineapple accessions to inoculation with *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. *Fruits*, 46: 647-652.

- Mayak, S., Tirosh, T., Glick, B. R. (2004) Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Sci.* 166: 525–530
- Medeiros, B. P. (2013) *Estresse hídrico simulado por polietileno glicol 6000: um estudo sobre os efeitos em plantas de tomate, herbaspirillum seropedicae e o potencial da inoculação na resistência ao estresse*. Tese (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF.
- Medina, E., Ziegler, H., Lüttge, U., Trimborn, P., Francisco, M. (1994) Light conditions during growth as revealed by  $^{13}\text{C}$  values of leaves of primitive cultivars of *Ananas comosus*, an obligate CAM species. *Funct. Ecol.* 8: 298–305.
- Mehta, P., Allakhverdiev, S.I., Jajoo, A. (2010) Characterization of photosystem II heterogeneity in response to high salt stress in wheat leaves (*Triticum aestivum*). *Photosynth. Res.* 105: 249–255.
- Meletti, L.M.M., Sampaio, A.C., Ruggiero, C. (2011) Avanços na fruticultura tropical no Brasil. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal. In: Oliveira, M. D. M. *Controle de pré e pós-colheita de doenças em abacaxizeiro*. p. 73-75.
- Meyers, P. A. (1994) Preservation of elemental and isotopic source identification of sedimentary organic matter. *Chem. Geol.* 144: 289–302.
- Meyer, S., Genty, B. (1999) Heterogeneous inhibition of photosynthesis over the leaf surface of *Rosa rubiginosa* L. during water stress and abscisic acid treatment: induction of a metabolic component by limitation of  $\text{CO}_2$  diffusion. *Planta*, 210: 126-131.
- Molina-Favero C., Creus C.M., Simontacchi M., Puntarulo S., Lamattina L. (2008) Aerobic nitric oxide production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and its influence on root architecture in tomato. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 21: 1001–1009.
- Moreira, F. M. S., Silva, K. da, Nóbrega R. S.A., Carvalho, F. (2010) Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. *Comunicata Scientiae*, 1 (2): 74-99.
- Neilands, J.B. (1984) Siderophore of bacteria and fungi. *Microbiological Sciences*, Oxford, 1: 9-14.
- Neivola, C. C., Kraus, J. E., Fresch, I., Souza, B. M., Mercier, H. (2005) Temperatura determiner the occurrence of CAM or C3 photosynthesis i pineapple plantlets grown *in vitro*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant* 41:832–837.
- Nelson, P. E., Tousson, T. A., Marasas, W. F.O. (1983) *Fusarium species an illustrated manual for identification*. The Pennsylvania State University Press, University Park London. 193 p.

- Nguyen, Q.T., Kozai, T., Heo, J., Thai, D.X. (2001) Photoautotrophic growth response of in vitro cultured coffee plantlets to ventilation methods and photosynthetic photon fluxes under carbon dioxide enriched condition. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 66: 215-225.
- Nobel, P. S. (1991) *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*. Academic Press, Inc., San Diego, CA, 635 p.
- Normah, M. N., Nor-Azza, A. B., Alliudin, R. (1995) Factors affecting in vitro shoot proliferation and ex vitro establishment of mangosteen. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 43: 291-294.
- Nose, A., Heima, K., Miyazato, K., Murayama, S. (1986) Effects of day-length on CAM type CO<sub>2</sub> and water vapor exchange of pineapple plants. *Photosynthetica*, 20: 20-28.
- Nowak, J. 1998. Benefits of in vitro "biotization" of plant tissue cultures with microbial inoculants. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant*, 34: 122-130.
- Nunes, F.S., Raimondi, A.C., Niedwieski, A.C. (2003) Fixação de nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases. *Revista Química Nova*, 26: 872.
- Ochse, J. J., Soule Jr., M. J., Dikman, M. J., Wehlburg, C. (1961) *Tropical and Subtropical Agriculture*. New York: MacMillan, vol. 2.
- Okon, Y., Labandera-Gonzales, C.A. (1994) Agronomic applications of Azospirillum: an evaluation of 20 years of world-wide field inoculation. *Soil Biology and Biochemistry*, 26: 1591-1601.
- Olivares, F. L., Baldani, V. L. D., Reis V. M., Baldani, J.I., Döbereiner J (1996) Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems and leaves predominantly of Gramineae. *Biol Fertil Soils*, 21: 197–200.
- Olivares, F. L., James, E. K., Baldani, J. I., and Döbereiner, J. (1997). Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. *New Phytol.* 135:723-737.
- Onofre-Lemus, J., Hernández-Lucas, I., Girard, L., Caballero-Mellado, J. (2009) ACC (1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate) Deaminase Activity, a Widespread Trait in *Burkholderia* Species, and Its Growth-Promoting Effect on Tomato Plants. *Applied And Environmental Microbiology*, 50 (20): p. 6581–6590.
- Osmond, C. B., Allaway, W. G., Sutton, B. G., Troughton, J. H., Queiroz, O., Lüttge, U., Winter, K. (1973) Carbon Isotope Discrimination in Photosynthesis of CAM Plants. *Nature*, p. 246-41.
- Osmond, C. B. (1978) Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context. *Annu Rev Plant Physiol*, 29: 379-414.

- Osório, J., Osório, M.L., Chaves, M.M., Pereira, J.S. (1998). Effects of water deficits on  $^{13}\text{C}$  discrimination and transpiration efficiency of *Eucalyptus globulus* clones. *Australian Journal of Plant Physiology*, 25: 645–653.
- Oukarroum, A., Madidi S.E. I. Schansker, G., Strasser, R.J. (2007) Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll a fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering. *Environ. Exp. Bot.* 60: 438–446.
- Pasqual, M., Lopes, P. A. (1991) Efeitos da concentração e tempo de incubação em ácido indolbutírico sobre o enraizamento e posterior desenvolvimento de brotos de *Pyrus calleryana* L. obtidos *in vitro*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 26: 975-980.
- Patten, C. I., Glick, B. R. (1996) Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, 42: 207-220.
- Paula, M.B., Mesquita, H.A., Nogueira, F.D. (1998) Nutrição de adubação do abacaxizeiro. *Informe agropecuário*, 19(195):33-39.
- Pedraza, R. O. Recent advances in nitrogen-fixing acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 125: 25-35.
- Van Peer, R., Punte, H. L. M., de Weger, L. A., Schippers, B. (1990) Characterization of root surface and endorhizosphere pseudomonads in relation to their colonization of roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2462-2470.
- Pereira, A. P. A., Silva, M. C. B., Oliveira, J. R. S., Ramos, A. P. S., Freire, M. B. G. S., Freire, F. J., Kuklinsky-Sobral. (2012) Influência da salinidade sobre o crescimento e a produção de ácido indol acético DE *Burkholderia* spp. endofíticas de cana-de- açúcar. *Biosci. J.*, 28: 112-121.
- Pereira, M. C. T, Nietsche, S., França, A. C., Nunes, C. F., Lima, C., Gonçalves, V. D., Salles, B. P., Morais, D. L. P., Kobayashi, M. P. (2005) Aclimatização De Mudanças Micropropagadas De Bananeira Sob Diferentes Condições De Luminosidade. *Rev. Bras. Frutic.*, 27 (2): 238-240.
- Pereyra, M. A., Zalazar C. A., Barassi, C. A. (2006) Root phospholipids in *Azospirillum*-inoculated wheat seedlings exposed to water stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44: 873–879.
- Perin, L., L. Martínez-Aguilar, G. Paredes, J. I. Baldani, P. Estrada-de los Santos, V. M. Reis, and J. Caballero-Mellado. (2006) *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56:1931–1937.
- Pierik, R, Tholen, D., Poorter, H. et al. (2006) The janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. *Trends in Plant Science*, 11: 176-183.
- Pissara, T. B. (1978) Fusariose no Espírito Santo. *In: Encontro Nacional de Abacaxicultura*. Salvador. Anais, Salvador, BA. p. 121-122.

- Pospisilová, J., Solarová, Catsky, J. (1992) Photosynthetic responses to stress during in vitro cultivation. *Photosynthetica*, 26: 3-18.
- Potters, G., Pasternak, T.P., Guisez, Y., Palme, K.J., Jansen, M.A.K. (2007) Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Science*, 12, 98–105.
- Prasad, G.V., Coury, L.A., Finn, F., Zeidel, M.L. (1998) Reconstituted aquaporin 1 water channels transport CO<sub>2</sub> across membranes. *J Biol Chem*, 273: 33123–33126.
- Preece, J.E., Sutter, E. (1991) Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. *Micropropagation: Technology and application*, p. 71-94.
- Py, C. (1969) *La piña tropical*. Barcelona: Blume. 278p.
- Py, C., Lacoeyllhe, J.J., Teisson, C. (1984) *L'ananas, sa culture, ses produits*. Paris: G. P. Maisonneuve e Larose. pp. 562.
- Radwan, T. E. E., Mohanmed, Z. K., Reis, V. M. (2005) Aeração e adição de sais na produção de ácido indol acético por bactérias diazotróficas. *Pesq. Agropec. Bras.*, 40: 997-1004.
- Radwan, T.S.D., Mohamed, Z.K., Reis, V.M. (2002) Production of indole-3-Acetic by different strains of *Azospirillum* and *Herbaspirillum* spp. *Symbiosis* 32: 39-54.
- Ranson, S.L., Thomas, M. (1960) Crassulacean acid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology*. 11: 81–110.
- Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E. (2007) *Biologia Vegetal*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Read, P. E., Fellman, C. D. (1985) Accelerating acclimation of in vitro propagated woody ornamentals. *Acta Horticulturae*, 166: 15-20.
- Redillas, M.C.F.R., Strasser, R.J., Jeong, J.S., Kim, Y.S., Kim, J.K. (2011) The use of JIP test to evaluate drought-tolerance of transgenic rice overexpressing OsNAC10. *Plant Biotechnol. Rep.* 5, 169–175.
- Reinhardt, D.H. (2002) *Técnicas de produção e pós-colheita do abacaxi*. Fortaleza, FRUTAL/SINDIFRUTA, 72 p.
- Reinhardt, D. H., Cabral, J. R. S., Souza, L.F.S., Sanches, N.F., Matos, A.P. (2002) Pérola and 'Smooth Cayenne' pineapple cultivars in the state of Bahia, Brazil: growth, flowering, pests and diseases, yield and fruit quality aspects. *Fruits*, 57: 43-53.

- Reinhardt, D. H., Cunha, G. A. P. (1999) Métodos de Propagação. In: *O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia*. EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, Brasília, p.105-138.
- Reinhardt, D. H. R., Souza, L.F.S., Cunha, G.A.P. (2000) *Botânica e Exigências edafoclimáticas*. Abacaxi: produção. (Frutas do Brasil, 7), Brasília: Embrapa, 9, p..
- Reinhold-Hurek, B., Hurek, T. (1998) *Life in grasses: diazotrophic endophytes*. *Trends in Microbiology*, 6: 139-144.
- Reis, L. L., Tarsitano, M. A. A., Hiraki, S. S. (2012) Diógenes Martins BARDIVIESSO Custo de produção e rentabilidade de abacaxizeiro cv. Pérola em cassilândia (ms), sob diferentes doses de potássio. *Biosci. J.*, 28: 725-733.
- Reis, V. M., Baldani, J.I., Baldani, V.L., Döbereiner, J. (2000) Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 3:227-247.
- Reynders, L., Vlassak, K. (1979) Conversion of tryptophan to indoleacetic acid by *Azospirillum brasiliense*. *Soil Biology Biochemistry*, 11: 547-548.
- 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 de Fruticultura*, Jaboticabal, 33(4):1240-1250.
- Roesch L. F. W., Olivares F. L., Passaglia L. M. P., Selbach, P. A. (2006) Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen supply. *World J Microbiol Biotechnol.* 22: 967–974.
- Robinson, D., Handley, L.L., Scrimgeour, C.M., Gordon, D.C., Forster, B.P., Ellis, R.P. (2000). Using stable isotope natural abundances ( $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$ ) to integrate the stress responses of wild barley (*Hordeum spontaneum* C. Koch.) genotypes. *Journal of Experimental Botany*, 51: 41–50.
- Rosenblueth, M., Martinez Romero, E. (2004) Rhizobium etli maize populations and their competitiveness for root colonization. *Arch. Microbiol.* 181:337-344.
- Rumjanek, N. G., Martins, L. M. V., Xavier, G. R., Neves, M. C. P., Freire Filho, F. R., Lima, J. A. A., Silva, P. H. S., Viana, F. M. P. (2005) Feijão-caupi: avanços tecnológicos. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, p. 281-335.
- Ryu, R. J., Patten, C. L. (2008) Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by tyrr in *Enterobacter cloacae* UW5. *Journal of Bacteriology*, 190: 7200–7208.
- Sanford, W. G. (1962) Pineapple crop log – concept and development. *Better Crops with Plant Food*, 46: 32-43.

- Sala, V. M. R., Cardoso, E. J. B. N., Freitas, J. G., Silveira, A. P. D. (2008) Novas bactérias diazotróficas endofíticas na cultura do trigo em interação com a adubação nitrogenada, no campo. *R. Bras. Ci. Solo*, 32:1099-1106.
- Sala, V. M. R., Silveira, A. P. D. D., Cardoso, E. J. B. N. (2007) Bactérias diazotróficas associadas a plantas não leguminosas. In: Silveira, A. P. D. D. e Freitas, S. D. S. (Ed.). *Bactérias diazotróficas associadas a plantas não leguminosas*. Microbiologia do solo e qualidade ambiental. Campinas: Instituto Agrônômico, p. 97-115.
- Sale, P. J. M., Neales, T. F. (1980) Carbon dioxide assimilation by pineapple plants, *Ananas comosus* (L.) Merr. I. Effects of daily irradiance. *Australian Journal of Plant Physiology*, 7: 363-373.
- Santos, M.G., Ribeiro, R.V., Oliveira, R.F., Machado, E.C., Pimentel, C. (2006). The role of inorganic phosphate on photosynthesis recovery of common bean after a mild water deficit. *Plant Sci.*, 170: 659–664.
- Santos, S. T. (2008) Biogeografia de bactérias culturáveis associadas às fruteiras tropicais. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 105 p.
- Saravanakumar, D., Kavino, M., Raguchander, T., Subbian, P., Samiyappan, R. (2011) Plant growth promoting bacteria enhance water stress resistance in green gram plants. *Acta Physiol Plant*, 33: 203–209.
- Sayed, O. H. (2001) Crassulacean acid metabolism 1975–2000, a check list. *Photosynthetica*, 39: 339–352.
- Sether, D. M., Hu, J. S. (2002) Closterovirus infection and mealybug exposure are necessary for the development of mealybug wilt of pineapple disease. *Phytopathology*, 92 (9): 928-935.
- Sether, D. M., Melzer, M. J., Busto, J., Zee, F., Hu, S. J. (2005) Diversity and mealybug transmissibility of ampeloviruses in pineapple. *Plant Disease*, 89: 450-456.
- Schulz, B., Boyle, C. (2005) The endophytic continuum. *Mycol. Res.* 109:661-686.
- Shaharoon, B., Naveed, M., Arshad, M., Zahir, Z. A. (2008) Fertilizer-dependent efficiency of pseudomonads for improving growth, yield, and nutrient use efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79: 147–155
- Shao, R., Wang, K., Shangguan, Z. (2010) Cytokinin-induced photosynthetic adaptability of *Zea mays* L. to drought stress associated with nitric oxide signal: probed by ESR spectroscopy and fast OJIP fluorescence rise. *J. Plant Physiol.* 167: 472–479.
- Sharp, R.E., LeNoble, M. E. (2002) ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *J. Exp. Bot.*, 53: p. 33-7.

- Silva, A. B., Pasqual, M., Araujo, A. G., Braga, F. T., Castro, E. M., Albert, L. H. B. Morfofisiologia e anatomia foliar de mudas micropropagadas e aclimatizadas de abacaxizeiro cv. Smooth Cayenne em diferentes substratos. *Rev. Ceres*, 59 (5): 580-586.
- Silva, A. I. P., Silva, A. P., Souza, A. P., Santos, D., Silva, S. M., Silva, V. B. Resposta do abacaxizeiro 'Vitória' a doses de nitrogênio em solos de tabuleiros costeiros da Paraíba. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 36: 447-456.
- Silva, H., Martinez, J. P., Baginsky, C., Pinto, M. (1999) Efecto del déficit hídrico en la anatomía foliar de seis cultivares de poroto *Phaseolus vulgaris*. *Revista Chilena de Historia Natural*. 72: 219-235.
- Silvera, K., Neubig, K. M., Whitten, M., Williams, N. H., Winter, K., Cushman, J. C. (2010) Evolution Along the Crassulacean Acid Metabolism Continuum. *Functional Plant Biology* 37(11): 995-1010.
- Slesak, I., Libik, M., Miszalski, Z. (2008) The foliar concentration of hydrogen peroxide during salt-induced C<sub>3</sub>-CAM transition in *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Sci.* 174: 221–226.
- Slesak, I., Miszalski, Z., Karpinska, B., Niewiadomska, E., Ratajczak, R., Karpinski, S. (2002) Redox control of oxidative stress responses in the C<sub>3</sub>-CAM intermediate plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol. Biochem*, 40: 669–677.
- Smirnoff, N. (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist*, 125: 27–58.
- Smirnoff, N., Colombé, S. V. (1988) Drought influences the activity of enzymes of the chloroplast hydrogen peroxide scavenging system, *J. Exp. Bot.* 39: 1097–1108.
- Smith, M. K., Ko, L. H., Hamill, S. D., Sanewski, G. M., Graham, M. W. (2003) Biotechnology. In: Bartholomew, D., Rohrback, K., Paull, R. E. *The pineapple: Botany, Production e Uses*. International CAB, Australia, p. 57 – 68.
- Souza, F.V.D., Souza, A.S., Santos-Serejo, J.A., Souza, E.H., Junghans, T.G., Silva, M.J. (2009) Micropropagação do Abacaxizeiro e Outras Bromeliáceas. In: Junghans, T.G., Souza, A.S. (eds.) *Aspectos Práticos da Micropropagação de Plantas*. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, p.177-206.
- de Souza, C.R., Maroco, J.P., dos Santos, T.P., Rodrigues, M.L., Lopes, C.M., Pereira, J.S., Chaves, M.M. (2005) Impact of deficit irrigation on water use efficiency and carbon isotope composition ( $\delta^{13}\text{C}$ ) of field-grown grapevines under Mediterranean climate. *Journal of Experimental Botany*, 56: (418): 2163-2172 .

- Souza, L. F. S. da. (1999) Exigências Edáficas e Nutricionais. In: *O abacaxizeiro: cultivo, agroindústria e economia*. EMBRAPA Mandioca e Fruticultura, Brasília, p. 67-82.
- Souza, R.P., Machado, E.C., Silva, J.A.B., Lagoa, A.M.M.A., Silveira, J.A.G. (2004) Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. *Environmental and Experimental Botany* 51: 45-56.
- Spaepen, S., Dobbelaere, S., Droonenborghs, A. et al. (2008) Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant and Soil*, 312 (1): 15-23.
- Stirbet, A., Govindjee (2011) On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 104: p. 236–257.
- Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Srivastava A. (2004): Analysis of the fluorescence transient. In: George C., Papageorgiou C., Govindjee (eds.): *Chlorophyll Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. Advances in Photosynthesis and Respiration Series, p. 321-362.
- Strasser, R.J., Tsimilli-Michael, M., Srivastava, A. (2000) The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: Yunus, M., Pather, U., Mohanly P. (eds.). *Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation*, p. 445-483.
- Strasser, R.J., Tsimilli-Michael, M., Qiang, S., Goltsev, V. (2010) Simultaneous in vivo recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1797: 1313–1326.
- Sturz, A. V., Christie, B. R. (1995) Endophytic bacterial systems governing red clover growth and development. *Ann. Appl. Biol.* 126:285- 290.
- Sturz, A. V., Christie, B. R., Matheson, B. G., Nowak, J. (1997) Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biol. Fertil. Soils*, 25:13-19.
- Sutter, E. G., Hutzell, M. (1984) Use of humidity tents and antitranspirants in the acclimatization to tissue-cultured plants to the greenhouse. *Scientia Horticulturae*, 23 (4): 303-312.
- Sziderics, A. H., Rasche, F., Trognitz, F., Sessitsch, A., Wilhelm, E. (2007) Bacterial endophytes contribute to abiotic stress adaptation in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Canadian Journal of Microbiology*, 53: 1195–1202.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2013). *Fisiologia vegetal*. 4. ed. Porto Alegre. Artmed. 848p.

- Taybi T, Cushman JC, Borland AM (2002) Environmental, hormonal and circadian regulation of Crassulacean acid metabolism expression. *Funct Plant Biol*, 29: 669–678.
- Taybi, T., Sotta, B., Gehrig, H., Guclu, S., Kluge, M., Brulfert, J. (1995) Differential effects of abscisic acid on phosphoenolpyruvate carboxylase and CAM operation in *Kalanchoe blossfeldiana*. *Bot Acta*, 108: 240–246.
- 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. *Biotecnol. Ci. Desenvol.*, 3:42-47.
- Terashima, I., Ono, K. (2002) Effects of HgCl<sub>2</sub> on CO<sub>2</sub> dependence of leaf photosynthesis: evidence indicating involvement of aquaporins in CO<sub>2</sub> diffusion across the plasma membrane. *Plant Cell Physiol*, 43: 70–78.
- Tien, T.M., Gaskins, M.H., Hubblel, D.H. (1979) Plant growth substances produced by *Azospirillum brasiliense* and their effects on the growth of *Pennisetum americanum* L. *Applied and Environmental Microbiology*, 37: 1016-1024.
- Timmusk, S., Wagner, G.H. (1999) The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12: 951–959.
- Torres Netto, A., Campostrini, E., Oliveira, J. G., Yamanishi, O. K. (2002) Portable chlorophyll meter for the quantification of photosynthetic pigments, nitrogen and the possible use for assessment of the photochemical process in *Carica papaya*. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 14: 203-210.
- Torres Netto, A. (2005) *Atributos fisiológicos e relações hídricas em genótipos de mamoeiro (Carica papaya L.) na fase juvenil*. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes – RJ, 116p.
- Valentini, R., Cecchi, G., Mazzinghi, P., Scarascia Mugnozza, G., Agati, G., Bazzani, M., De Angelis, P., Fusi, F., Matteicci, G., Raimondi, V. Remote (1994). *Sensing Environment*. 47: 29p.
- Vandamme, P., Opelt, K., Knöchel, N., berg, C., Schönmann, S., De Brandt, e., Eberl, L., Falsen, E., Beng, G. (2007) *Burkholderia bryophyla* sp. Nov. and *Burkholderia megapolitana* sp. Nov., moss-associated species with antifungal and plant growth promoting properties. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57:2228-2235.
- Veloso, C. A. C., Oeiras, A. H. L., Carvalho, E. J. M., Souza, F. R. S. (2001) Resposta do abacaxizeiro à adubação de nitrogênio, potássio e calcário em latossolo amarelo do nordeste paraense. *Revista Brasileira de Fritucultura*, 23: 396-402.

- Ventura, A.J., Cabral, J.R.S., Matos, A.P., Costa, H. (2006) 'Vitória' cultivar de abacaxi resistente à fusariose. Documentos nº 148, Vitória: INCAPER.
- Vivas, A. A., Marulanda, J.M., Ruiz-Lozano, J.M. Barea and R. Azcon (2003) Influence of a *Bacillus* sp. on physiological activities of two arbuscular mycorrhizal fungi and on plant responses to PEG induced drought stress. *Mycorrhiza*, 13: 249-256.
- Weber, O. B., Correia, D., Silveira, M. R. S., Crisóstomo, L. A., Oliveira, E. M., Sá, E. G. (2003a) Efeito da bactéria diazotrófica em mudas micropropagadas de abacaxizeiros 'Cayenne Champac' em diferentes substratos. *Pesq. Agropec. Bras.*, 38(12): 689-696.
- Weber, O. B., Correia, D., Rocha, M. W., Alvez, G. C., Oliveira, E. M., Sá, E. G. (2003b) Resposta de plantas micropropagadas de abacaxizeiro à inoculação de bactérias diazotróficas em casa de vegetação. *Pesq. Agropec. Brasileira*, 39(12):1419-1426.
- Weber, O. B., Teixeira, K. R. S., Kirchhof, G., Baldani, J. I., Döberreiner, J. (1999) Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. *Plant Soil*. 210:103-113.
- Wetzstein, H., Sommer, H.E. (1982) Leaf anatomy of tissue-cultured *Liquidambar styraciflua* (hamamelidaceae) during acclimatization. *American Journal of Botany*, 69: 1579-1586.
- Whitlock, G.C., Estes, D.M., Torres, A.G. (2007) Glanders: off to the races with *Burkholderia mallei*. *FEMS Microbiology Letters* 277: 115-122.
- Wichern, F., Ederhardt, E., Mayer, J. et al. (2008) Nitrogen rhizodeposition in agricultural crops: methods, estimates and future prospects. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 30-48.
- Williams, P. M., Barkan, A. (2003) A chloroplast-localized PPR protein required for plastid ribosome accumulation. *Plant J.* 36 (5): 675-686.
- Winter, K. (1985) Crassulacean acid metabolism.. In J. Barber and N.R. Baker, eds. *Photosynthetic mechanisms and the environment*. Elsevier, Amsterdam. 329-387 p.
- Winter, K., Garcia, M., Holtum, J. A. M. (2008) On the nature of facultative and constitutive CAM: environmental and developmental control of CAM expression during early growth of *Clusia*, *Kalanchoe*, and *Opuntia*. *Journal of Experimental Botany* 59: 1829-1840.
- Winter K, Holtum JAM. (2002) How closely do the  $\delta^{13}\text{C}$  values of crassulacean acid metabolism plants reflect the proportion of  $\text{CO}_2$  fixed during day and night? *Plant Physiology* 129: 1843–1851.

- Winter K., Lüttge U., Winter E. & Troughton J.H. (1978) Seasonal shift from C<sub>3</sub> photosynthesis to crassulacean acid metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum* growing in its natural environment. *Oecologia*. 34: 225–237.
- Winter K, Smith JAC. 1996. An introduction to crassulacean acid metabolism: biochemical principles and ecological diversity. In: Winter K, Smith JAC, eds. *Crassulacean acid metabolism: biochemistry, ecophysiology and evolution*. Berlin: Springer-Verlag, 1–13.
- Winter, K., Zotz, G., Baur, B. and Dietz, K.-J. (1992) Light and dark CO<sub>2</sub> fixation in *Clusia uvitana* and the effects of plant water status and CO<sub>2</sub> availability. *Oecologia*. 91:47-51.
- Wise, R.R., Sparrow, D.H., Ortiz-Lopez, A., Ort, D.R. (1991) Biochemical regulation during the midday decline of photosynthesis in field-grown sunflower. *Plant Science*, 74: 45-52.
- Xiao, Y., Kozai, T. (2006) In vitro multiplication of static plantlet using sugar-free media. *Scientia Horticulturae*, p. 1-7
- Yang, G.P., Rhodes, D., Joly, R.J. (1996). Effects of high temperature on membrane stability and chlorophyll fluorescence in glycinebetaine-deficient and glycinebetaine-containing maize lines. *Australian Journal Plant Physiology*, 23: 437-443.
- Yang1, J., Kloepper, J. W., Ryu, C. M. (2009) Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends in Plant Science*. 14(1): 1-4.
- Young, A. L., Frank, H. A. (1996) Energy transfer reactions involving carotenoids: quenching of chlorophyll fluorescence. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 36: 3-15.
- Yuwono, T., Handayani, D., Soedarsono, J. (2005) The role of osmotolerant rhizobacteria in rice growth under different drought conditions. *Australian Journal of Agricultural Research* 56: 715–721.
- Zagdanska, B., Kazdój, J. (1994) Water stress-inducer changes in morphology and anatomy of flag leaf of spring wheat. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*. 63(1): 61-66.
- Zaied, K.A., El-Hady, A.H., Afify, A.H., Nassef, M.A. (2003) Yield and nitrogen assimilation of winter wheat inoculated with new recombinant inoculants of rhizobacteria. *Pakist. J. Biol. Sci.*, 4:344-358.
- Zawoznik, M.S., Ameneiros, M., Benavides, M.P., Vázquez, S., Groppa, M.D. (2011) Response to saline stress and aquaporin expression in *Azospirillum*-inoculated barley seedlings. *Applied microbial and cell physiology*. 90: 4, 1389-1397.
- Zhang, H., Hanada, S., Shigematsu, T., Shibuya, K., Kamagata, Y., Kanagawa, T., Kurane, R. 2000. *Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-

- degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50: 743- 749.
- Zhang, J., Kirkham, M. B. (1994) Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species. *Plant Cell Physiol.* 35: 785–791.
- Zhang, H., Xie, X., Kim, M. S., Korniyeyev, D. A., Holaday, S., Pare, P. W. (2008) Soil bacteria augment *Arabidopsis* photosynthesis by decreasing glucose sensing and abscisic acid levels in planta. *The Plant Journal*, 56, 264–273.
- Zhang, M., Zhao, D., Ma, Z., Li, X., Xiao, Y. (2009) Growth and photosynthetic capability of *Momordica grosvenori* plantlets grown photoautotrophically in response to light intensity. *Hort Science*, 44:757-763.
- Zhu, B., Ye, S., Chang, S., Chen, M., Sun, L., An, Q. (2012) Genome Sequence of the Pathogenic *Herbaspirillum seropedicae* Strain Os45, Isolated from Rice Roots. *Journal of Bacteriology*, 194 (24): 6995–6996.
- Zhu, J., Bartholomew, D., Goldstein, G., (1997) Effect of elevated carbondioxide on the growth and physiological responses of pineapple, a species with Crassulacean acid metabolism. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 122:233-237.
- Zhu, J., Goldstein, G., Bartholomew, D. (1999) Gas exchange and carbon isotope composition of *Ananas comosus* in response to elevated CO<sub>2</sub> and temperature. *Plant cell and environment*, 22: 999 – 1007.
- Zhu, J. (1996) *Physiological responses of pineapple (Ananas comosus (L.) Merr.) to CO<sub>2</sub> enrichment, temperatures and water deficit*. Tese (PhD) – University of Hawaii at Manoa, Honolulu, Hawaii.
- Zotz, G., Winter, K. 1993. Short-term regulation of crassulacean acid metabolism activity in a tropical hemiepiphyte, *Clusia uvitana*. *Plant Physiology* 102: 835–841.
- Zimmer, W., Roeben, K., Bothe, H. (1988) An alternative explanation for plant growth promotion by bacteria of the genus *Azospirillum*. *Planta*, 176: 333-342.
- Ziv, M., Schwartz, A., Fleminger, D. (1987) Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (*Sianthus caryophyllus*) plants propagated in vitro, implications for hardening. *Plant. Sci.*, 52: 127-134.
- Živčák, M., Brestič, M., Olšovská, K., Slamka P. (2008) Performance index as a sensitive indicator of water stress in *Triticum aestivum* L. *Plant Soil Environ.*, 54, 4: p. 133–139