



RONILSON CARLOS DE ARAÚJO

**PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO POR BACTÉRIAS
ENDOFÍTICAS EM MUDAS DE *Musa* spp.**

LAVRAS – MG

2020

RONILSON CARLOS DE ARAÚJO

**PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO POR BACTÉRIAS
ENDOFÍTICAS EM MUDAS DE *Musa* spp.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Moacir Pasqual

Orientador

Prof^a. Dr^a. Joyce Dória Rodrigues

Coorientadora

LAVRAS – MG

2020

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados
informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

De araujo, Ronilson Carlos.

Promoção de crescimento por bactérias Endofíticas em mudas de *Musa* spp. / Ronilson Carlos De Araújo. - 2020.
51 p.: il.

Orientador(a): Moacir Pasqual.

Coorientador(a): Joyce Dória Rodrigues.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Casa de vegetação. 2. Microrganismos. 3. Aclimatização. I. Pasqual, Moacir. II. Rodrigues, Joyce Dória. III. Título.

RONILSON CARLOS DE ARAÚJO

**PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS EM MUDAS
DE *Musa spp.***

**PROMOTION OF GROWTH BY ENDOPHYTIC BACTERIA IN SEEDLINGS OF
*Musa spp.***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADO em 10 de fevereiro de 2020

Dr^a. Angelica Cristina de Souza,

UFLA

Dr. Paulo Márcio Norberto,

EPAMIG

Prof. Dr. Moacir Pasqual

Orientador

Prof^a. Dr^a. Joyce Dória Rodrigues

Coorientadora

LAVRAS – MG

2020

*Dedico este trabalho a todas as
pessoas que não acreditaram e que
não acreditam em mim.*

AGRADECIMENTOS

À Deus em primeiro lugar, pois não podemos nada se Ele não permitir, em todos os anos desse curso vi a mão Dele comigo.

A minha família, Carlos meu pai, Alvina minha mãe, Angela, Eliana, Eneide minhas irmãs e Deovane, Geovane meus irmãos. Mas em especial ao meu amigo Marildo que sempre me apoiou muito desde os momentos de felicidade até os momentos de tristeza.

A Universidade Federal de Lavras que foi elo de ligação entre todas as pessoas com as quais eu compartilhei um pouco dessa jornada que é o mestrado.

Ao Laboratório de Cultura de tecidos vegetais sob a coordenação do Professor Dr. Moacir Pasqual da Universidade Federal de Lavras pela oportunidade de ter entrado em uma família e que me ensinou muito mais do que alguns anos de estudo.

Aos técnicos de Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais sob a coordenação do Professor Dr. Moacir Pasqual da Universidade Federal de Lavras pela dedicação e conhecimento adquiridos ao longo desses anos.

Ao meu orientador, Dr. Moacir Pasqual por ter tido paciência com uma pessoa que “caiu de paraquedas” no seu laboratório e por ter confiado um trabalho tão importante.

Aos meus coorientadores professora Dr^a. Joyce Dória e Dr. Filipe Almendagna Rodrigues, que sempre estava disposto a me ajudar, a ensinar e que sempre buscava ser um facilitador dentro da universidade.

As minhas grandes amigas Michele Nadal e Gracielle Vidal, que me apoiaram e compartilharam muitos momentos da vida delas me ensinando sobre assuntos que vão muito além da vida acadêmica.

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

“Cuidado com o que tolera: você está ensinando como as pessoas devem tratá-lo”

(Marcel Gomes)

RESUMO

Mudas multiplicadas por meio da micropropagação são isentas de bactérias e outros contaminantes. As bactérias endofíticas promotoras de crescimento de plantas têm papel importante para a cultivar e podem ser encontradas na raiz, folha e pseudocaule da bananeira. A associação de diferentes espécies de bactérias endofíticas com a rizosfera das plantas hospedeiras podem estimular crescimento, desenvolvimento e aclimatização, ofertando maior quantidade de mudas, além de antecipar o ciclo, proporcionando retorno econômico. Dessa forma, torna-se necessário estudar a reintrodução dessas bactérias no sistema radicular da *Musa* spp. O objetivo do trabalho foi avaliar a eficácia de bactérias endofíticas promotoras de crescimento na aclimatização de mudas de bananeiras micropropagadas. Para tal, foram avaliados os seguintes tratamentos: T0- Controle (Agar nutriente sem bactérias); T1- Bactéria F01 (*Bacillus cereus*); T2- Bactéria R21 (*Bacillus thuringiensis*); T3- Bactéria F12 (*Bacillus cereus*) e T4- Bactéria 11.1. (*Micrococcus luteus*) Ao longo do período de aclimatização, foram avaliadas variáveis morfoagronômicas relacionadas ao desenvolvimento das mudas, tais como: altura total e diâmetro do pseudocaule (mm). Após 90 dias do transplântio (DAT) e aclimatização foram avaliados comprimento do pseudocaule (mm) e da raiz (cm), número de folhas, massa seca/fresca da raiz, pseudocaule, folha (g) e área foliar. As variáveis fisiológicas avaliadas foram: condutância estomática (GS) $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$; taxa de fotossíntese (A) " $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ "; taxa de transpiração (E) " $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ "; temperatura da folha (T°) e SPAD. As bactérias apresentaram resultados distintos em relação às cultivares estudadas. Levando em consideração as variáveis biométricas, morfológicas e fisiológicas, recomenda-se, para o processo de aclimatização de mudas de bananeira, a utilização da bactéria *Bacillus thuringiensis* para as cultivares Prata Anã e Grande Naine e ausência de bactéria para a BRS Princesa por estimular o crescimento da planta, aumentar a massa fresca e seca, além de promover o crescimento de raízes e melhorar os aspectos fisiológicos da planta.

Palavras-chave: Casa de vegetação. Microrganismos. Aclimatização.

ABSTRACT

Seedlings multiplied by micropropagation are free of bacteria and other contaminants. Plant growth-promoting endophytic bacteria play an important role in cultivation and can be found in the root, leaf and pseudostem of the banana tree. The association of different species of endophytic bacteria with the rhizosphere of host plants can stimulate growth, development and acclimatization, offering more seedlings, and anticipating the cycle, providing economic return. Thus, it is necessary to study the reintroduction of these bacteria into the root system of *Musa* spp. The objective of this work was to evaluate the efficacy of growth promoting endophytic bacteria in the acclimatization of micropropagated banana seedlings. For this, the following treatments were tested: T0- Control (nutrient agar); T1- Bacterium F01; T2- Bacterium R21; T3- Bacterium F12 and T4- Bacterium 11.1. During the acclimatization period, we evaluated morphoagronomic variables related to seedling development, such as: total height and pseudostem diameter (mm). After 90 days of transplantation (DAT) and acclimatization, pseudostem length (mm) and root length (cm), number of leaves, dry / fresh root mass, pseudostem, leaf (g) and leaf area were evaluated. The physiological variables evaluated were: stomatal conductance (GS) $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$; photosynthesis rate (A) " $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ "; perspiration rate (E) " $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ "; leaf temperature (T°) and SPAD. The bacteria presented different results in relation to the cultivars studied. Taking into account the biometric, morphological and physiological variables, it is recommended for the acclimatization process of banana seedlings to use the bacterium R21 for the cultivars Prata Anã and Grande Naine and absence of bacteria for the BRS Princesa for stimulating plant growth, increasing fresh and dry mass, promoting root growth and improving the physiological aspects of the plant.

Keywords: Greenhouse. Microorganisms. Acclimatization.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1	A cultura da bananeira.....	14
2.2	Benefícios para a saúde.....	14
2.3	Cultivares.....	15
2.4	Micropropagação.....	16
2.5	Aclimatização.....	16
2.6	Bactérias endofíticas.....	17
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1	Coleta do material vegetal	19
3.2	Isolamento das bactérias endofíticas.....	19
3.3	Identificação direta de bactérias endofíticas de <i>Musa</i> spp. por MALDI-TOF MS.....	19
3.4	Caracterização morfológica das colônias.....	20
4.	Avaliação das bactérias promotoras de crescimento.....	21
4.1	Produção de protease.....	21
4.2	Solubilização de fosfato.....	21
4.3	Produção de auxina.....	22
4.4	Fixação de nitrogênio.....	22
5	Análise estatística.....	23
6	Avaliação da promoção de crescimento por bactérias endofíticas em plantas de bananeira.....	23
6.1	Multiplicação e enraizamento <i>in vitro</i> do material vegetal.....	23
6.2	Avaliação da promoção de crescimento por bactérias endofíticas em plantas de bananeira em casa de vegetação.....	23
6.3	Análises biométricas.....	25
6.3.1	Altura total da planta e diâmetro do pseudocaule.....	25
6.4	Análises morfológicas.....	25
6.5	Análises fisiológicas.....	25
6.5.1	Fotossíntese, transpiração e condutância estomática.....	25
6.5.2	Avaliação indireta do teor de clorofila.....	26
6.6	Delineamento experimental.....	26
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
7.1	Seleção de bactérias endofíticas.....	27
7.1.1	Identificação por MALDI-TOF MS.....	27
7.1.2	Coloração de Gram.....	29
7.1.3	Produção de Protease.....	30
7.1.4	Solubilização de Fosfato em meio sólido.....	30
7.1.5	Produção de Auxina.....	32
7.1.6	Fixação de Nitrogênio.....	34
7.2	Seleção das bactérias endofíticas para serem utilizadas no ensaio experimental.....	34
7.3	Avaliação da promoção de crescimento por bactérias endofíticas em plantas de bananeira em casa de vegetação.....	35
7.3.1	Análises biométricas.....	35
7.3.1.1	Altura total da planta e diâmetro do pseudocaule.....	35
7.3.2	Análises morfológicas.....	37

7.3.2.1	Comprimento pseudocaule/raiz, área foliar, nº folhas, massa seca/fresca da folha.....	37
7.3.2.2	Massa fresca/seca do pseudocaule e raiz.....	39
7.3.3	Análises fisiológicas.....	41
7.3.3.1	Condutância estomática (GS).....	41
7.3.3.2	Taxa de fotossíntese (A).....	42
7.3.3.3	Taxa de transpiração (E).....	42
7.3.3.4	Temperatura da folha (T°).....	42
7.3.3.5	Avaliação indireta do teor de clorofila.....	43
8	CONCLUSÕES.....	45
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	46
	REFERÊNCIAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

As mudas são um dos fatores mais importantes para o sucesso da implantação de um pomar livres de pragas e doenças, contribuindo para o controle fitossanitário. Para se produzirem mudas, com alta sanidade, utiliza-se a técnica de micropropagação, na qual pequenos segmentos de planta, chamados de explantes, são colocados em meios de cultura artificiais com ambiente controlado e asséptico, isentas de bactérias. Porém, essa técnica demanda mão-de-obra especializada e laboratório tecnificado, onerando os custos de produção (KUMAR et al., 2019).

As bactérias promotoras de crescimento podem proporcionar um desenvolvimento diferenciado às plantas por meio da suplementação de nutrientes que estejam com pouca disponibilidade, ou até mesmo inibindo o desenvolvimento e ataques de pragas e doenças, produzindo substâncias capazes de controlar tais adversidades Cardoso e Andreote (2016), com grande capacidade de produzirem reguladores de crescimento vegetal (VEJAN et al., 2016).

Segundo Rocha et al. (2019), a associação da *musa* spp. cultivada *in vitro* e diferentes espécies de bactérias endofíticas podem estimular o crescimento das plantas, desenvolvimento e aclimatização, através da colonização do sistema radicular, ofertando maior quantidade de mudas, além de antecipar o ciclo, proporcionando retorno econômico. No entanto, são necessários mais estudos para entender melhor as relações entre esse grupo de bactérias e a planta hospedeira.

Tendo em vista todos esses benefícios, torna-se necessário isolar, identificar as bactérias endofíticas promotoras de crescimento em *Musa spp.* reintroduzindo-as no sistema radicular das cultivares (Grande Naine, Prata Anã e BRS Princesa). Com o intuito de proporcionar melhor desenvolvimento da planta, tanto em crescimento vegetativo quanto produção de frutos, avaliam-se os aspectos fisiológicos, a influência no crescimento, desenvolvimento radicular e aéreo durante o processo de aclimatização.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura da bananeira

A bananeira de frutos comestíveis (*Musa* spp.) é uma monocotiledônea da classe Liliopsida, subclasse Liliidae, superordem Lilinae, ordem Zingiberales (Scitamineae), família Musaceae, subfamília Musoideae, gênero *Musa*, seção *Eumusa*, planta herbácea, com exuberância de suas formas e dimensões das folhas (SILVA et al., 2002). Possui tronco curto e subterrâneo, representado pelo rizoma e o conjunto de bainhas das folhas de pseudocaule, o rizoma constitui um órgão de reserva, onde se inserem as raízes adventícias e fibrosas (NOVOLETTI et al., 2016).

As bananeiras são plantas angiospermas com origem na Ásia e seu cultivo é realizado em diversas regiões do planeta, especialmente em climas tropicais. No mundo, existem aproximadamente 1000 cultivares de bananeira, a exemplo da nanica, prata, ouro, maçã e da terra (ARAGUAIA, 2019).

A área plantada de banana no Brasil em Janeiro de 2020 foi de 80,14 milhões de hectares, com produção de 6,90 milhões de toneladas com rendimento de 11,48 t ha⁻¹ em área colhida de 79,18 milhões hectares e o estado de Minas Gerais possui uma área plantada de 5,69 milhões de hectares, com produção de 803,552 mil toneladas, em área colhida de 5,68 milhões de hectares com rendimento de 7,07 t ha⁻¹ (IBGE, 2020).

2.2 Benefícios para a saúde

O Brasil é um dos maiores mercados consumidores de banana, apresentando consumo médio anual estimado de 24 kg per capta. O fruto faz parte do hábito alimentar das populações mais carentes devido ao seu baixo custo e alto grau de calorias (870 kcal 1000 g⁻¹). A banana é uma das frutas de consumo *in natura* mais importante no mundo, detendo o quarto lugar em termos de importância alimentar. O consumo de apenas uma banana supre cerca de um quarto da quantidade total de vitamina C recomendada por dia para uma criança. Além disso, é rica em carboidratos (24%), em fibras (6 a 7%), em minerais como Ca, Mg, K, P e Fe, e vitaminas A e B (AGRIANUAL, 2019).

A banana possui vários benefícios para a saúde humana, podendo destacar: ajuda a superar a depressão devido aos altos níveis de triptofano, que é convertido em serotonina “o

neurotransmissor cerebral do bem humor”, quando consumida antes de um treino intenso pode lhe fornecer muito mais energia e manter o açúcar no sangue. Proteção contra câibras musculares durante os treinos e câibras nas pernas, protege contra o diabetes tipo II, auxilia na perda de peso, fortalece o sistema nervoso, ajuda com a produção de glóbulos brancos, fortalece o sangue, alivia a anemia com a adição de ferro. Por ser rica em potássio e pobre em sal é capaz de reduzir a pressão arterial e proteger contra o ataque cardíaco e acidente vascular cerebral além de diminuir a temperatura do corpo e refrescá-lo durante a febre ou em dia quente (BRASNICA, 2019).

2.3 Cultivares

O grupo genômico é utilizado para designar cada combinação específica entre o número básico de cromossomos das espécies *Musa acuminata* (AA) e *Musa balbisiana* (BB). É possível observar que as bananeiras comestíveis têm a necessidade de ter a presença de, pelo menos, um genoma da espécie *M. acuminata* (A) que sofreu mutação.

Segundo Novoletti et al. (2016), as principais cultivares de banana *Musa* spp. são citadas em função de sua constituição genômica, grupo e nome popular ou comum (Tabela 1).

Tabela 1 – Constituição genômica, grupo e principais cultivares de bananeira (*Musa* spp.) produzidas no Brasil.

Constituição Genômica	Subgrupo	Cultivar
AA	-	Ouro
AAA	Cavendish	Nanica, Nanicão, Grande Naine, Williams
AAA	Gros Michel	Gros Michel, Highgate
AAAB	-	Maçã
AAB	Prata	Prata, Prata Anã, Catarina, Pacovan, Enxerto
AAB	Terra	Terra, Terrinha, Pacova, D’Angola
ABB	Figo	Figo Vermelho, Figo Cinza
AAAB	Maçã	BRS Princesa

Fonte: Frizo (2013) adaptado de Silva et al. (1997); Moreira (1987).

O grupo Cavendish é o mais plantado no mundo, produz frutos finos, alongados e curvos, e possui porte muito variado, com resistência ao Mal do Panamá. As cultivares Nanica, Nanicão, Grande Naine, Williams Hybrid pertencem a esse grupo, destacando em importância no Brasil as três primeiras. A cultivar Grande Naine possui porte médio, variando de 2 a 3 m de altura, com bainha e pecíolo cerosos.

O grupo Prata possui constituição genética (AAB), tendo a Prata, Prata Anã e Pacovan como principais representantes. As características da cultivar Prata-anã é o pseudocaule com coloração verde-clara e reduzido número de manchas escuras, a altura varia de 2 a 3,5 m. Apresenta tolerância ao frio e ótima produção em condição irrigada (NOVOLETTI et al., 2016).

A cultivar BRS Princesa é resultado do cruzamento da cultivar Yangambi nº 2 com o híbrido diploide M53 (AA), criado pela EMBRAPA Mandioca e Fruticultura em Cruz das Almas-BA. Apresenta plantas de porte alto variando de 3,8 m a 5,0 m, pseudocaule vigoroso e resistente com 25 a 30 cm de diâmetro. A massa fresca do cacho varia de 10 a 15 kg e os frutos são maiores e com maiores espessuras do que a banana ‘Maçã’ (12 a 16 cm de comprimento e 32 a 34 mm de diâmetro), com sabor semelhante ao da banana ‘Maçã’. Além disso, apresenta resistência às Sigatokas amarela e negra e tolerância ao mal-do-Panamá (NOMURA et al., 2013).

2.4 Micropropagação

No cultivo *in vitro*, a micropropagação é umas das técnicas mais antigas e que apresentam alto impacto para a agricultura. Nesse processo são utilizados meios nutritivos que fornecem micro e macro nutrientes essenciais para as plantas clonadas e podem controlar o desenvolvimento. Com essa técnica, é possível produzir mudas em larga escala, uniformes, idênticas à planta mãe e livres de patógeno, com rápida disponibilidade (COSTA, 2016).

As plantas provenientes da micropropagação têm maiores chances de sobrevivência no campo, com desenvolvimento mais rápido nos primeiros estádios, são mais produtivas e precoces no primeiro ciclo de produção, proporcionando uniformidade na produção e produção superior quando comparadas com plantas oriundas de propagação convencional. Além disso, as mudas produzidas em laboratório possuem preço mais elevado do que as convencionais (BRUCKNER, 2002).

No cultivo *in vitro*, o explante, podendo ser um ápice caulinar ou meristema, é cultivado em meio de cultura, em ambiente asséptico, com condições controladas de luminosidade, temperatura e fotoperíodo (LIMA et al., 2012).

2.5 Aclimatização

A etapa da aclimatização é importante para corrigir alterações anatômicas e fisiológicas induzidas durante o cultivo *in vitro*. Essa fase pode ser aperfeiçoada utilizando diferentes tipos

de bactérias endofíticas, produzindo mudas sadias em menor tempo (RODRIGUES et al., 2018).

A aclimatização é um processo de importância para mudas micropropagadas, processo realizado entre a multiplicação *in vitro* e o plantio no campo (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1990).

Os explantos devem possuir parte aérea e sistema radicular bem desenvolvidos, com altura de 4 a 6 cm. As mudas devem ser retiradas dos frascos de cultivo, tomando cuidado para não danificá-las e lavadas em água corrente para retirada do meio de cultura.

Na fase de aclimatização deve-se realizar o toalete no sistema radicular, padronizando-as para 1 cm de comprimento, facilitando o plantio no substrato e além de estimular a formação de novas raízes, em ambiente protegido, com sistema de irrigação “micro aspersão”, com sombreamento de 50 a 75%, com temperatura variando de 24 a 26 °C e umidade relativa acima de 80% (SINGH et al., 2011).

Para a bananeira, a aclimatização dura de 45 a 60 dias, porém quando as plantas atingirem 20 a 30 cm de altura e com 3 a 5 folhas já podem ser plantadas no campo (SINGH et al., 2011).

2.6 Bactérias endofíticas

As bactérias endofíticas são as bactérias benéficas para as plantas que prosperam dentro delas melhorando o crescimento em condições normais e desafiadoras, além de beneficiar diretamente as plantas hospedeiras, proporcionando a absorção de nutrientes pelas plantas e modulando fitormônios relacionados ao crescimento e ao estresse (AFZAL et al., 2019).

Indiretamente, as bactérias endofíticas podem melhorar a saúde das plantas, atacando pragas e patógenos com antibióticos, enzimas hidrolíticas, limitação de nutrientes e estimulando suas defesas. Para conferir esses benefícios, as bactérias precisam colonizar a endosfera da planta após colonizar a rizosfera. A colonização é alcançada usando uma bateria de características que envolvem motilidade, fixação, degradação de polímero de plantas e evasão de defesas. A diversidade de colonizadores endofíticos depende de vários fatores específicos de bactérias, plantas e ambiente. Algumas bactérias endofíticas podem ter uma ampla gama de hospedeiros e utilizadas como bioinoculantes no desenvolvimento de um sistema agrícola seguro e sustentável (AFZAL et al., 2019).

Como exemplo de hormônios de crescimento vegetal, o ácido indolacético (AIA) possui relação direta com o aumento da produtividade das culturas. O AIA é uma auxina que induz o

crescimento e formação de raízes e aumento de pêlos radiculares, proporcionando maior absorção de água e de nutrientes presentes no solo, favorecendo o crescimento vegetal, a mobilização de fósforo, bem como na melhoria do desenvolvimento vegetal da planta (PEDRINHO et al., 2010).

Na área biotecnológica, os microrganismos endofíticos vêm despertando grande interesse, pois apresentam grande potencial como agentes de controle biológico. Além disso, para colonizar a planta e competir com outros microrganismos, os endofíticos produzem uma variedade de substâncias, sendo fonte importante de compostos biologicamente ativos com aplicações medicinais, industriais ou agrícolas promissoras (RIBEIRO et al., 2017).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta do material vegetal

Para realização da análise, foram coletados o sistema radicular, pseudocaule e parte aérea de bananeira cultivar Prata Anã localizada no pomar do Setor de Fruticultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG. A planta coletada (com aproximadamente 1 m de altura) foi removida com o auxílio de enxadão, e posteriormente, transportada para o Laboratório de Microbiologia Agrícola da Universidade federal de Lavras (UFLA) procedendo todas as análises. As folhas, pseudocaule e raízes foram separadas e lavadas em água corrente para remoção do solo.

3.2 Isolamento das bactérias endofíticas

As bactérias endofíticas foram isoladas no Laboratório de Microbiologia Agrícola do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Em câmara de fluxo laminar, 10 pedaços de 0,5 cm² de cada órgão vegetal separadamente foram cortados, lavados e enxaguados por três vezes com água destilada e esterilizada. Logo após, foi realizada a assepsia em etanol 70% por 30 segundos (folhas) ou 1-5 minutos (raiz e pseudocaule) e enxaguadas três vezes com água esterilizada. Em seguida, o material foi transferido para solução de hipoclorito de sódio a 1% de cloro ativo durante 1 minuto.

Para isolamento dos microrganismos realizou-se a técnica de plaqueamento direto nos seguintes meios de cultura: meio Luria-Bertani ágar (LB), composto por 10 g L⁻¹ de Triptona, 5 g L⁻¹ de extrato de levedura, 10 g L⁻¹ de NaCl, 20 g L⁻¹ de ágar; meio Ágar Nutriente (NA), constituído de 5 g L⁻¹ de peptona, 3 g L⁻¹ de extrato de levedura, 15 g L⁻¹ de ágar; meio M9, formado por 10 g L⁻¹ de Na₂HPO₄, 3 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 0,6 g L⁻¹ de NaCl, 20 g L⁻¹ de NH₄Cl, 5 g L⁻¹ de glucose e 15 g L⁻¹ de ágar. Incubados à 28 °C por 7 dias.

Após o isolamento, os isolados foram purificados por estrias de esgotamento em placa de Petri contendo o meio NA. Em seguida foram identificados e caracterizados.

3.3 Identificação direta de bactérias endofíticas de *Musa* spp. por MALDI-TOF MS

Todas amostras bacterianas endofíticas isoladas do sistema radicular, pseudocaule e folha foram processadas seguindo a metodologia de extração com ácido fórmico.

As culturas puras foram reativadas em ágar nutriente e incubadas em BOD à 28°C por 18 horas, foram submetidas à análise em triplicata biológica no equipamento ultrafleXtreme MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics; Bremen, Germany).

A extração proteica foi realizada com solução orgânica com etanol, acetonitrila e água pura na proporção 1:1:1 acrescida de 10% de ácido trifluoroacético (TFA). A massa celular foi adicionada a um eppendorf juntamente com 6 uL de solução orgânica, agitou-se em vortex por cinco minutos. Alíquota de 0,6 uL da extração proteica foi adicionada à placa do MALDI-TOF em triplicata. Após secagem, a amostra foi coberta com 1uL de solução matriz ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA), previamente preparada para uma concentração final de 10 mg CHCA/ml de solução orgânica (OLIVEIRA et al., 2015).

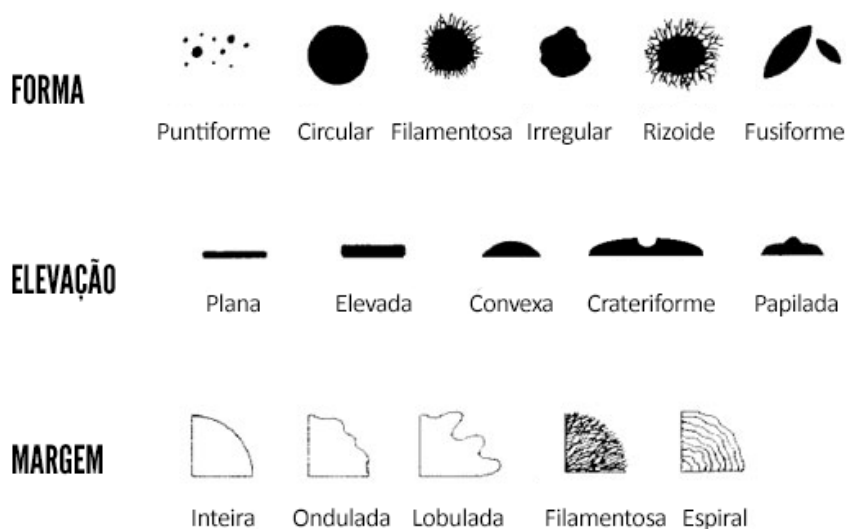
Os espectros de massa foram processados usando o software BioTyper (versão 3.0; Bruker Daltonics) executado com a versão de banco de dados BioTyper DB5989, contendo 5989 perfis de referência MALDI-TOF MS (5298 de bactérias, 626 de leveduras e 65 de fungos filamentosos). A correspondência entre os perfis experimentais MALDI-TOF MS obtidos de isolados de bactérias e os perfis MALDI-TOF MS de referência são expressos por BioTyper de acordo com um Log (Score) e um código de cor associada (verde, amarelo e vermelho).

Resumidamente, registro BioTyper (pontuação) superior a 2,3 (cor verde) indica identificação altamente provável ao nível da espécie. Entre 2,0 e 2,3 significa identificação altamente provável no nível do gênero (cor verde) e identificação provável ao nível da espécie. Registro (pontuação) entre 1,7 e 2,0 (cor amarela) implica apenas a identificação provável do gênero, enquanto o valor da pontuação abaixo de 1,7 (cor vermelha) não significa semelhança significativa entre o perfil desconhecido e qualquer um da base de dados.

3.4 Caracterização morfológica das colônias

A caracterização morfológica da coleção de bactérias foi determinada em placas de Petri com o meio Ágar Nutriente (NA), constituído de 5 g L⁻¹ de peptona, 3 g L⁻¹ de extrato de levedura, 15 g L⁻¹ de ágar, sendo as características observadas em 24 horas de crescimento em BOD a 28 °C. Foram observadas as seguintes características morfológicas das colônias isoladas: forma (P – Puntiforme, CI – circular, F – Filamentosa, I – irregular, RI – Rizoide, FU – Fusiforme); cor (BL – branca leite, BG – branca gelo, A – amarela, CR – creme, T – transparente, R – rósea); margem (IN – inteira, O – ondulada, L – lobulada, FI-filamentosa, ES – espiral); elevação (PL – plana, E – elevada, CO – convexa, CR – crateriforme, P – papilada), segundo metodologia de Melloni (2006) (Figura 1).

Figura 1 – Morfologia das colônias bacterianas.



A coloração de Gram foi realizada com auxílio de microscópio óptico Motic em objetiva de imersão (100X). Logo após, procedeu-se a observação das lâminas.

4 Avaliação das bactérias promotoras de crescimento

4.1 Produção de protease

A seleção de bactérias endofíticas produtoras de protease foi realizada de acordo com o método de Sgroy et al. (2009). As bactérias armazenadas em refrigeração foram reativadas em meio NA por 24 horas os isolados foram cultivados em microtubo contendo 1 mL de caldo nutriente, composto por 5 g L⁻¹ de peptona e 3 g L⁻¹ de extrato de levedura, incubadas a 28 °C e levadas para mesa agitadora a 120 rpm por 24 horas.

Após esse período, foi inoculado 10 µL de meio ágar leite desnatado (SMA) em placas de Petri e incubadas à 28°C em BOD por 24 horas em triplicata. Os resultados positivos foram caracterizados pela presença de um halo de crescimento no interior do meio de cultura e mensurado o diâmetro com a utilização de um paquímetro digital MAX TOOLS, 0 – 150 mm.

4.2 Solubilização de fosfato

A seleção das bactérias endofíticas solubilizadoras de fósforo foi realizada de acordo com o método de Sgroy et al. (2009). Os isolados foram cultivados em meio NBRIP,

constituídos de 10 g L⁻¹ de glicose; 5 g L⁻¹ de Ca₃(PO₄)₂; 5 g L⁻¹ de MgCl₂.6H₂O; 0,25 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O; 0,2 g L⁻¹ de KCl; 0,1 g L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄; 15 g L⁻¹ de ágar e pH 7,2), Foi inoculada uma colônia por placa em triplicata, mantidas a 28°C em BOD por 24 horas, caracterizando os resultados positivos pela presença de halo claro nas colônias bacterianas com capacidade de solubilização do fosfato com a utilização de um paquímetro digital MAX TOOLS, 0 – 150 mm.

4.3 Produção de auxina

A produção do ácido indol acético (AIA) foi mensurada segundo metodologia de Sgroy et al. (2009). Para cada isolado bacteriano foi aplicado 10 µL em microtubo contendo 1 mL de caldo nutriente (5 g L⁻¹ de peptona e 3 g L⁻¹ de extrato de levedura) acrescido de 0,1 g L⁻¹ de L-triptofano, incubadas por 72 horas a 28°C, sob agitação constante de 120 rpm e na ausência de luz (ANDRADE, 2012).

Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos e transferidos 0,5 mL do sobrenadante para o micro tubo, contendo 0,5 mL do reagente de Salkowski 2% (p/v) (0,5 M de FeCl₃ em 35% de ácido perclórico) (SARWAR; KREMER, 1995), e incubados, na ausência de luz, por 30 minutos. A produção de AIA foi determinada, qualitativamente, pela coloração avermelhada da solução contida no micro tubo. Para a avaliação quantitativa do hormônio, foi realizada a leitura em espectrofotômetro Elisa Multiskan GO no comprimento de onda de 540 nm. A concentração foi obtida pela leitura de meio de cultura estéril, não inoculado, com concentrações conhecidas de AIA comercial (0, 5, 10, 15 e 20%). Para cada concentração foi feita em triplicata. Para a análise utilizou-se o Skanit Software 5.0 for Microplate Readers RE versão 5.0.0.42.

4.4 Fixação de nitrogênio

A seleção de bactérias fixadoras de N foi realizada segundo Sgroy et al. (2009). Para isso, as bactérias foram inoculadas em meio semissólido NFB (5 g de ácido málico, 0,5 g de K₂HPO₄; 0,2 g de MgSO₄.7H₂O; 0,1 g de NaCl; 0,02g de CaCl₂.2H₂O; 1 mL de solução de vitaminas; 2 mL de solução de micronutrientes; 4 mL de Fe-EDTA; 2 mL de Azul de Bromotimol 0,5% em 0,2N de KOH; 4,5 g de KOH (o pH do meio foi ajustado para 6,8 com KOH ou H₂SO₄ a 5%); 2 g de ágar e incubados à 28 °C em BOD por sete dias. Os testes foram

realizados em triplicatas, e os resultados positivos caracterizados pela presença de um halo de crescimento no interior do meio de cultura.

5 Análise estatística

Todos os ensaios foram analisados segundo o delineamento inteiramente casualizado com três repetições por amostra. Os resultados de cada ensaio do teste de produção de auxina foram submetidos individualmente à análise de variância e, quando ocorreram diferenças significativas pelo teste F ($p < 0,05$), os dados foram submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Scott Knott à 5% de probabilidade utilizando o programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

6 Avaliação da promoção de crescimento por bactérias endofíticas em plantas de bananeira

6.1 Multiplicação e enraizamento *in vitro* do material vegetal

No intuito de obter material vegetal suficiente para a implantação dos experimentos, mudas de três cultivares de *Musa* spp. (Grande Naine, Prata Anã e BRS Princesa), oriundas da Empresa Campo Biotecnologia Vegetal Ltda., situada no município de Cruz das Almas-BA, previamente estabelecidas *in vitro*, no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA) realizou-se a multiplicação *in vitro* do material em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), suplementado com 4,0 mg L⁻¹ BAP por 45 dias.

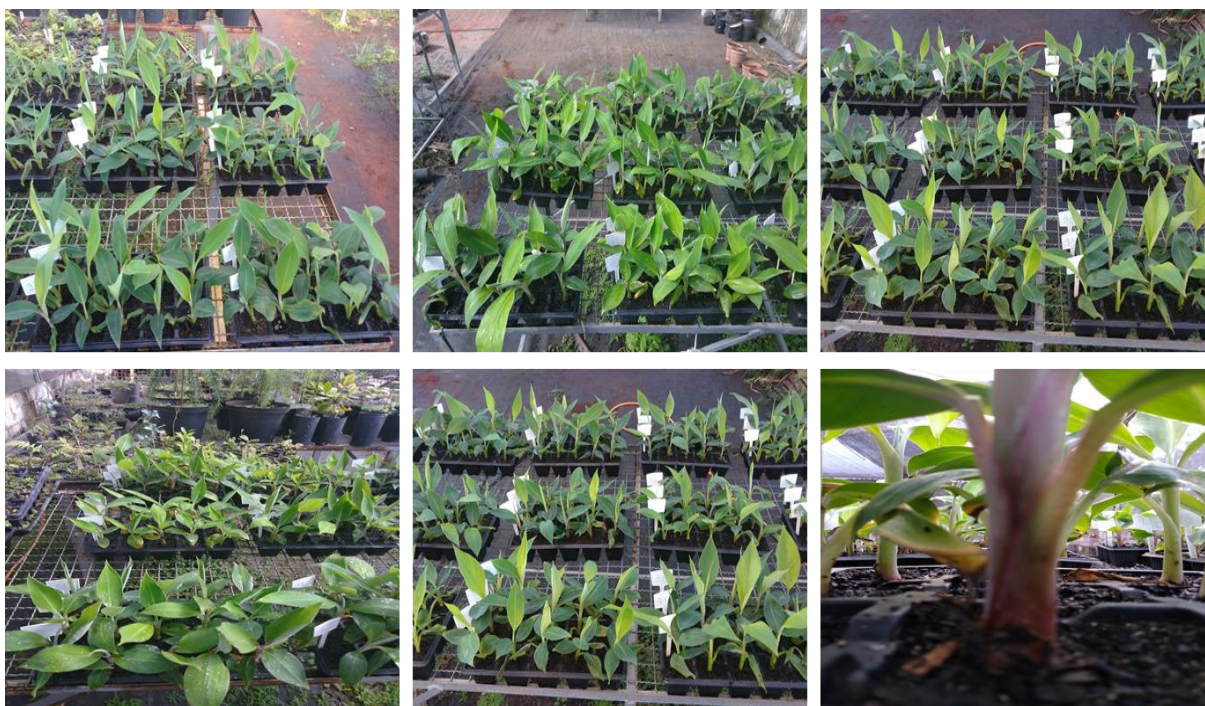
Após a multiplicação, realizou-se a toaleta (retirada do sistema radicular e da parte aérea) e a mesma transferida para tubos de ensaios com capacidade de 50 mL contendo 15 mL de meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) sem adição de reguladores de crescimento por 30 dias para padronização do sistema radicular e aéreo da planta.

6.2 Avaliação da promoção de crescimento por bactérias endofíticas em plantas de bananeira em casa de vegetação

Foi realizado ensaio utilizando mudas das cultivares Prata Anã, Grande Naine e BRS Princesa oriundas da multiplicação e enraizamento *in vitro* na fase anterior. Este ensaio foi

conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 3 x 5, com 3 cultivares (Prata Anã, Grande Naine, BRS Princesa) e 5 níveis T0- Controle (Ágar nutriente sem bactérias); T1- Bactéria F01 (*Bacillus cereus*); T2- Bactéria R21 (*Bacillus thuringiensis*); T3- Bactéria F12 (*Bacillus cereus*) e T4- Bactéria 11.1 (*Micrococcus luteus*), totalizando 15 tratamentos, com 7 repetições de 3 plantas cada, contendo 21 plantas por tratamento, totalizando 315 plantas no experimento (Figura 2).

Figura 2 – Ensaio experimental (aclimatização) em casa de vegetação.



Fonte: Do autor (2019).

Completados 30 dias de enraizamento e crescimento *in vitro*, as mudas enraizadas foram transplantadas para bandejas plásticas de 15 células de 6,5 cm de altura por 6,2 cm de largura (boca) por 5,0 cm de largura (fundo), contendo substrato comercial Tropstrato®, composto por casca de pinus, turfa, vermiculita, superfosfato simples, nitrato de potássio e produtos formulados por terceiros, “umidade (% p/p) 60; CRA (%P/P) 130; Densidade base seca (kg/cm³) 200; pH 5,8”.

Durante o transplântio, procedeu-se a aplicação das bactérias endofíticas por imersão das mudas em suspensão aquosa contendo as bactérias na concentração de 10⁹ ufc mL⁻¹ por 30 minutos. As bandejas foram mantidas em casa de vegetação, irrigadas via nebulização intermitente diariamente de acordo com a temperatura interna da mesma, para o desenvolvimento das mudas.

6.3 Análises biométricas

6.3.1 Altura total da planta e diâmetro do pseudocaule

Decorridos 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias, as mudas foram avaliadas quanto à AT (Altura total da planta, medida “em mm” tomada por trena metálica a partir da base da muda “sem o rizoma” até o ponto de intersecção da extremidade da folha mais recente completamente expandida e o DP (Diâmetro do pseudocaule na base da muda, medida “em mm” tomada com auxílio de paquímetro digital MAX TOOLS).

6.4 Análises morfológicas

Decorridos 90 dias, avaliaram-se altura total da planta e diâmetro do pseudocaule. Em seguida, foram separadas a parte aérea do sistema radicular e do pseudocaule, avaliando-se comprimento radicular total, comprimento do pseudocaule, área foliar, massa fresca e seca da parte aérea e massa fresca e seca de pseudocaule e sistema radicular, armazenadas em sacos de papel e transferidas para estufa de circulação forçada à 60 °C por 3 dias. Após este período, foi realizada a pesagem do material em balança digital da marca CELTAC FA2104N.

6.5 Análises fisiológicas

6.5.1 Fotossíntese, transpiração e condutância estomática

Aos 90 dias após o transplântio das mudas de bananeira, na parte mediana do primeiro par de folha a partir do ápice mediram-se a condutância estomática (GS) “ $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ”; taxa de fotossíntese (A) “ $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ”; taxa de transpiração (E) “ $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ” e temperatura da folha (T°) através do medidor de trocas gasosas IRGA (analisador de gás infravermelho), sistema aberto, portátil, modelo LI-COR 6400, utilizando a radiação natural. A avaliação foi realizada as 9 horas, horário de Brasília, com temperatura interna na casa de vegetação em torno de 20 °C.

6.5.2 Avaliação indireta do teor de clorofila

Para a avaliação indireta do teor de clorofila utilizou-se o método não destrutivo para quantificação do conteúdo de pigmentos fotossintéticos com a aplicação do medidor indireto de clorofila, clorofilômetro SPAD 502 - Soil and Plant Analysis Development (MINOLTA, 1989). Para a análise, foram utilizadas dez plantas de cada cultivar por tratamento, com 90 dias de idade, onde foram medidos um ponto da região mediana do primeiro par de folha mais estendida. A coleta foi realizada às 9 horas no horário de Brasília.

6.6 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Todos os dados coletados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade pelo programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2011).

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Seleção de bactérias endofíticas

7.1.1 Identificação por MALDI-TOF MS

Como a metodologia MALDI-TOF apresenta prática execução, foi empregada como a metodologia inicial da identificação dos isolados obtidos. Foram identificados isolados repetidos nas amostras, ou seja, foi verificado que colônias isoladas eram correspondentes à mesma cepa isolada, uma vez que os picos apresentados pelo programa de análise dos dados do MALDI-TOF foram idênticos. A metodologia empregada permitiu a identificação de 68 dos 74 isolados bacterianos independentes obtidos. Isto porque estes 6 microrganismos, 6/74 (8,11%) não identificados apresentaram o parâmetro de pontuação abaixo do recomendado pelo software Bruker Daltonics para ser considerado um dado confiável (Tabela 2).

Tabela 2 – Identificações dos isolados bacterianos da raiz, pseudocaule e folha de *Musa* spp. cultivar Prata Anã pela técnica MALDI-TOF MS.

Identificação	Quantidade
<i>Bacillus cereus</i>	34
<i>Enterobacter asburiae</i>	8
<i>Bacillus thuringiensis</i>	7
<i>Bacillus megaterium</i>	5
<i>Serratia marcescens</i>	6
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	2
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	2
<i>Klebsiella variicola</i>	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	1
<i>Escherichia coli</i>	1
<i>Bacillus mycoides</i>	1
Total	68

Fonte: Do autor (2019).

Oliveira et al. (2019) relatam em seu trabalho que os gêneros de bactérias endofíticas mais estudados quanto a micosíntese destacam-se *Bacillus* e *Pseudomonas*.

Algumas bactérias, pertencentes aos gêneros *Enterobacter* sp., *Staphylococcus* sp., *Serratia* sp., e alguns outros, apresentam potencial patogênico apesar de terem sido isoladas de amostras ambientais (ARPIN et al., 1996; NAZAROWEC-WHITE; FARBER, 1997).

Os resultados das identificações bacterianas feitas pelo método MALDI-TOF MS e as caracterizações morfológicas dos isolados estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 – Resultados das identificações dos 68 isolados bacterianos da raiz, pseudocaule e folha de *Musa* spp. cultivar Prata Anã pela técnica MALDI-TOF MS e suas características morfológicas.

Bactérias	Cor	Forma	Elevação	Margem	Local
<i>Bacillus cereus</i>	Amarela	Irregular	Plana	Ondulada	Raiz
<i>Serratia marcescens</i>	Amarela	Irregular	Plana	Ondulada	Raiz
<i>Serratia marcescens</i>	Amarela	Irregular	Plana	Ondulada	Raiz
<i>Bacillus megaterium</i>	Amarela	Irregular	Plana	Ondulada	Raiz
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Amarela	Irregular	Plana	Ondulada	Raiz
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Amarela	Irregular	Plana	Ondulada	Raiz
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Amarela	Irregular	Plana	Ondulada	Raiz
<i>Bacillus cereus</i>	Amarela	Irregular	Plana	Ondulada	Raiz
<i>Bacillus cereus</i>	Amarela	Irregular	Plana	Ondulada	Raiz
<i>Bacillus mycoides</i>	Amarela	Irregular	Plana	Ondulada	Raiz
<i>Bacillus cereus</i>	Amarela	Irregular	Plana	Ondulada	Raiz
<i>Bacillus cereus</i>	Amarela	Irregular	Plana	Espiral	Raiz
<i>Serratia marcescens</i>	Amarela	Irregular	Plana	Espiral	Raiz
<i>Bacillus cereus</i>	Amarela	Irregular	Plana	Espiral	Raiz
<i>Bacillus cereus</i>	Amarela	Irregular	Plana	Espiral	Raiz
<i>Enterobacter asburiae</i>	Amarela	Irregular	Plana	Espiral	Raiz
<i>Klebsiella variicola</i>	Amarela	Irregular	Plana	Espiral	Raiz
<i>Enterobacter asburiae</i>	Amarela	Irregular	Plana	Espiral	Raiz
<i>Serratia marcescens</i>	Amarela	Irregular	Plana	Espiral	Raiz
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Amarela	Irregular	Plana	Espiral	Raiz
<i>Bacillus cereus</i>	Amarela	Irregular	Plana	Espiral	Raiz
<i>Bacillus cereus</i>	Amarela	Irregular	Plana	Espiral	Raiz
<i>Bacillus cereus</i>	Amarela	Irregular	Plana	Espiral	Raiz
<i>Bacillus cereus</i>	Amarela	Irregular	Plana	Espiral	Raiz
<i>Enterobacter asburiae</i>	Amarela	Irregular	Plana	Espiral	Raiz
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	Amarela	Irregular	Plana	Espiral	Raiz
<i>Bacillus cereus</i>	Amarela	Irregular	Plana	Filamentosa	Raiz
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	Amarela	Irregular	Plana	Filamentosa	Raiz
<i>Enterobacter asburiae</i>	Amarela	Irregular	Plana	Filamentosa	Raiz
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Amarela	Irregular	Plana	Filamentosa	Raiz
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	Amarela	Irregular	Plana	Filamentosa	Raiz
<i>Enterobacter asburiae</i>	Amarela	Irregular	Plana	Filamentosa	Raiz
<i>Bacillus megaterium</i>	Amarela	Irregular	Plana	Lobulada	Folha
<i>Bacillus cereus</i>	Amarela	Irregular	Elevada	Lobulada	Raiz
<i>Bacillus cereus</i>	Amarela	Irregular	Plana	Lobulada	Raiz
<i>Bacillus cereus</i>	Amarela	Filamentosa	Plana	Filamentosa	Folha

Continua...

<i>Bacillus cereus</i>	Amarela	Filamentosa	Plana	Inteira	Folha
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Amarela	Circular	Convexa	Inteira	Folha
<i>Bacillus cereus</i>	Amarela	Rizoíde	Elevada	Lobulada	Raiz
<i>Bacillus cereus</i>	Creme	Irregular	Elevada		Raiz
<i>Enterobacter asburiae</i>	Creme	Irregular	Elevada	Ondulada	Raiz
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	Creme	Irregular	Elevada	Ondulada	Raiz
<i>Bacillus cereus</i>	Creme	Irregular	Elevada	Ondulada	Raiz
<i>Bacillus cereus</i>	Creme	Irregular	Elevada	Inteira	Raiz
<i>Enterobacter asburiae</i>	Creme	Irregular	Plana	Ondulada	Pseudocaule
<i>Serratia marcescens</i>	Creme	Irregular	Plana	Ondulada	Raiz
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Creme	Irregular	Convexa	Ondulada	Folha
<i>Escherichia coli</i>	Creme	Circular	Plana	Inteira	Pseudocaule
<i>Enterobacter cloacae</i>	Creme	Circular	Plana	Inteira	Pseudocaule
<i>Bacillus megaterium</i>	Creme	Circular	Plana	Inteira	Pseudocaule
<i>Bacillus cereus</i>	Creme	Circular	Plana	Inteira	Folha
<i>Bacillus cereus</i>	Creme	Circular	Plana	Inteira	Folha
<i>Bacillus cereus</i>	Creme	Circular	Elevada	Inteira	Raiz
<i>Bacillus cereus</i>	Branco gelo	Irregular	Elevada	Ondulada	Raiz
<i>Bacillus cereus</i>	Branco gelo	Irregular	Elevada	Ondulada	Raiz
<i>Bacillus cereus</i>	Branco gelo	Irregular	Elevada	Ondulada	Raiz
<i>Bacillus cereus</i>	Branco gelo	Irregular	Elevada	Ondulada	Raiz
<i>Bacillus cereus</i>	Branco gelo	Irregular	Plana	Ondulada	Raiz
<i>Bacillus cereus</i>	Branco gelo	Irregular	Plana	Ondulada	Folha
<i>Bacillus cereus</i>	Branco gelo	Irregular	Plana	Ondulada	Raiz
<i>Bacillus megaterium</i>	Branco gelo	Irregular	Plana	Espiral	Folha
<i>Bacillus cereus</i>	Branco gelo	Irregular	Elevada	Lobulada	Raiz
<i>Bacillus cereus</i>	Branco gelo	Irregular	Elevada	Filamentosa	Folha
<i>Enterobacter asburiae</i>	Branco gelo	Circular	Elevada	Inteira	Raiz
<i>Bacillus cereus</i>	Branco gelo	Circular	Plana	Lobulada	Folha
<i>Bacillus megaterium</i>	Branco gelo	Circular	Convexa	Ondulada	Folha
<i>Bacillus cereus</i>	Branco gelo	Filamentosa	Plana	Ondulada	Folha
<i>Bacillus cereus</i>	Rosea	Filamentosa	Convexa	Lobulada	Folha

Fonte: Do autor (2020).

7.1.2 Coloração de Gram

Dos 68 isolados bacterianos identificados, todos passaram pelo teste de coloração de Gram, sendo 50 *Bacillus* e 24 *Cocos*. A determinação da coloração de Gram foi realizada para todos os isolados. A maioria deles (88%), 60 isolados foi considerada Gram-positiva e 12% (8 isolados) Gram-negativos.

7.1.3 Produção de Protease

Dos 68 isolados bacterianos selecionados para a realização do teste de produção de protease, 21 isolados se apresentaram de forma positiva com tamanho do halo variando entre 15,333 mm a 28,703 mm (Tabela 4).

Tabela 4 – Produção de Protease dos isolados de raiz, pseudocaule e folha de *Musa* spp.

Isolado	Tamanho do halo	Origem
<i>Bacillus cereus</i>	18,577	Raiz
<i>Bacillus cereus</i>	21,317	Raiz
<i>Bacillus cereus</i>	28,703	Raiz
<i>Bacillus cereus</i>	20,357	Raiz
<i>Serratia marcescens</i>	17,627	Raiz
<i>Serratia marcescens</i>	21,250	Raiz
<i>Bacillus megaterium</i>	22,35	Raiz
<i>Enterobacter asburiae</i>	18,843	Raiz
<i>Bacillus thuringiensis</i>	23,580	Raiz
<i>Bacillus cereus</i>	23,527	Raiz
<i>Bacillus thuringiensis</i>	24,683	Raiz
<i>Bacillus cereus</i>	25,290	Raiz
<i>Bacillus cereus</i>	27,120	Raiz
<i>Bacillus cereus</i>	22,293	Raiz
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	24,260	Raiz
<i>Bacillus cereus</i>	15,333	Raiz
<i>Bacillus megaterium</i>	25,200	Folha
<i>Bacillus cereus</i>	21,260	Folha
<i>Bacillus cereus</i>	24,840	Folha
<i>Bacillus cereus</i>	21,667	Raiz
<i>Bacillus cereus</i>	22,893	Folha

Fonte: Do autor (2020).

7.1.4 Solubilização de Fosfato em meio sólido

A eficiência de solubilização de fosfato em meio de cultura sólido foi determinada pela formação de halo transparente indicador de solubilização. Dos 68 isolados bacterianos identificados, 3 isolados de *Bacillus cereus* e 1 isolado de *Serratia marcescens* apresentaram positivamente para a presença do halo de solubilização, os demais isolados se apresentaram de forma negativa. De acordo com os índices de solubilização (Tabela 5) os isolados foram

classificados como estirpes de baixa solubilização ($IS < 2$), média ($2 \leq IS \leq 4$) e alta solubilização ($IS > 4$) (BERRAQUERO et al., 1976).

Ahemad (2015) relata que o fósforo é importante para as reações enzimáticas responsáveis por muitos processos fisiológicos das plantas.

Tabela 5 – Índice de solubilização de fosfato IS, aos 7 dias de inoculação em meio de cultura sólido NBRIP, de 68 bactérias endofíticas isoladas da raiz, folha e pseudocaule da Banana Prata Anã.

Isolado	IS ¹	Capacidade solubilizadora	Origem
<i>Bacillus cereus</i>	21,53	Alta	Raiz
<i>Bacillus cereus</i>	19,48	Alta	Raiz
<i>Serratia marcescens</i>	16,26	Alta	Raiz
<i>Bacillus cereus</i>	17,92	Alta	Raiz

Fonte: Do autor (2020).

¹ Índice de solubilização (mm) (Berraquero et al., 1976).

IS < 2: baixa solubilização; $2 \leq IS \leq 4$: média solubilização; IS > 4: alta solubilização.

O meio de cultura utilizado contém fonte insolúvel de P na forma de fosfato tricálcio que na presença de cloreto de cálcio e substâncias liberadas pelos microrganismos, como ácidos orgânicos e enzimas no meio circundante, sofre processo de solubilização que é evidenciado pela formação de um halo translúcido ao redor das colônias que apresentam capacidade solubilizadora (SOUCHIE et al., 2005).

Segundo Matos et al. (2017), as bactérias endofíticas isoladas de raízes de bananeira em meio sólido em laboratório apresentam variações em sua capacidade de solubilizar P, destacando a bactéria *Aneurinibacillus* sp. e *Lysinibacillus* sp., necessitando de testes futuros para avaliar seu desempenho em campo.

Os 3 isolados de *Bacillus cereus* e o isolado de *Serratia marcescens* apresentaram maior habilidade em solubilizar o fosfato em relação aos demais. De acordo com Sobral (2003), essa habilidade das bactérias endofíticas desperta grande interesse em microbiologistas agrícolas, ganhando grande importância durante o processo de colonização, pois podem inicialmente colonizar superficialmente o hospedeiro e, conseqüentemente, fornecer o nutriente fósforo para o desenvolvimento das plantas. Dessa maneira é primordial a busca por microrganismos com essa habilidade de solubilização de fosfato como alternativa econômica e ambiental em substituição aos fertilizantes químicos (KHAN et al., 2007; MEHRVARZ et al., 2008).

7.1.5 Produção de Auxina

Dos 68 isolados bacterianos selecionados para a realização do teste de produção de Auxina, todos apresentaram concentrações com valores variados. Os resultados obtidos neste estudo indicam que os isolados provenientes tanto da raiz, pseudocaule e folha foram capazes de produzir AIA e que a produção deste fitormônio não foi dependente da parte da planta de onde as bactérias foram isoladas (Tabela 6).

Os isolados endofíticos apresentaram capacidades variáveis de produzir compostos indólicos. Os valores para produção de AIA pelos isolados endofíticos variaram de 4,328 a 15,678 mg de AIA.L⁻¹ (Tabela 6). Os isolados R21 (*Bacillus thuringiensis*), PC01 (*Escherichia coli*) e F01 (*Bacillus cereus*) apresentaram os maiores valores de AIA, respectivamente.

Resultados semelhantes foram encontrados por Ikeda (2014) em bactérias isoladas do milho, em que o isolado do gênero *Bacillus* apresentou a maior produção de AIA, assim como os resultados descritos por Luvizotto (2008), que verificou que todos os isolados de *Burkholderia* associados às raízes da cana-de-açúcar produziram esse fitormônio.

As cepas de bactérias isoladas de raízes de bananeiras (*Musa acuminata*) possuem atividades de promoção do crescimento de plantas, sendo capazes de produzir ácido indol-3-acético (IAA) entre outras atividades, aumentando o crescimento das plantas, clorofila, fenólicos totais, prolina, catalase e oxidase do ácido ascórbico, podendo essas bactérias serem usadas como bioestimulantes para melhorar a produção de banana (PATEL et al., 2017).

De acordo com Susilowati et al. (2018), o fitormônio é um composto importante que regula o crescimento de plantas, a auxina (ácido indol-3-acético) é um hormônio essencial para muitos aspectos do crescimento das plantas que podem regular muitos processos fisiológicos podendo ser obtida sob a forma de compostos sintéticos ou produzidos por organismos bacterianos com o objetivo de ser utilizados para aumentar a produção agrícola.

De acordo com Taiz e Zeiger (2017), a produção de concentrações de AIA não muito elevada é preferível, pois, sendo considerado um fitormônio, em concentrações elevadas, pode ter reação negativa sobre o crescimento, podendo atuar como um herbicida, produzindo uma reação contrária ao esperado. Assim, os resultados indicam que parte dos isolados estudados podem ser promissores na promoção de crescimento vegetal.

As auxinas sintetizadas pelas bactérias afetam o sistema radicular, aumentando o tamanho, o número de ramificações de raízes adventícias e a área de contato com o solo, possibilitando que uma maior área seja explorada pela superfície radicular, disponibilizando assim grandes quantidades de nutrientes à planta (ARRUDA et al., 2013).

Tabela 6 - Análises quantitativas da produção de ácido-indol-3-acético (AIA) de bactérias endofíticas de *Musa* spp. isoladas a raiz, pseudocaule e folha.

Isolado	AIA mg de AIA.L ¹
<i>Bacillus cereus</i>	4,328 j
<i>Bacillus cereus</i>	5,715 i
<i>Bacillus thuringiensis</i>	5,890 i
<i>Bacillus cereus</i>	6,085 i
<i>Bacillus cereus</i>	6,090 i
<i>Bacillus megaterium</i>	6,177 i
<i>Bacillus cereus</i>	6,244 i
<i>Bacillus megaterium</i>	6,325 i
<i>Bacillus cereus</i>	6,357 i
<i>Bacillus megaterium</i>	6,688 i
<i>Enterobacter asburiae</i>	6,807 h
<i>Bacillus megaterium</i>	6,893 h
<i>Bacillus cereus</i>	6,895 h
<i>Bacillus cereus</i>	6,946 h
<i>Bacillus cereus</i>	7,031 h
<i>Bacillus cereus</i>	7,342 g
<i>Bacillus cereus</i>	7,474 g
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	7,538 g
<i>Bacillus cereus</i>	7,698 g
<i>Bacillus cereus</i>	7,812 g
<i>Bacillus cereus</i>	8,097 f
<i>Bacillus cereus</i>	8,210 f
<i>Bacillus megaterium</i>	8,287 f
<i>Bacillus thuringiensis</i>	8,425 f
<i>Bacillus cereus</i>	8,563 f
<i>Bacillus cereus</i>	8,616 f
<i>Bacillus thuringiensis</i>	8,694 f
<i>Serratia marcescens</i>	8,699 f
<i>Bacillus cereus</i>	8,897 f
<i>Bacillus cereus</i>	8,977 f
<i>Serratia marcescens</i>	9,159 f
<i>Bacillus cereus</i>	9,162 f
<i>Serratia marcescens</i>	9,246 f
<i>Enterobacter asburiae</i>	9,303 f
<i>Bacillus cereus</i>	9,428 f
<i>Bacillus cereus</i>	9,453 f
<i>Bacillus cereus</i>	9,494 f
<i>Enterobacter asburiae</i>	9,544 f
<i>Bacillus cereus</i>	9,758 f
<i>Bacillus cereus</i>	9,764 f
<i>Bacillus cereus</i>	9,868 f

Continua...

<i>Bacillus cereus</i>	10,115 e
<i>Bacillus cereus</i>	10,166 e
<i>Bacillus cereus</i>	10,176 e
<i>Bacillus thuringiensis</i>	10,189 e
<i>Klebsiella variicola</i>	10,263 e
<i>Enterobacter asburiae</i>	10,335 e
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	10,438 e
<i>Enterobacter asburiae</i>	10,442 e
<i>Enterobacter asburiae</i>	10,476 e
<i>Bacillus cereus</i>	10,543 e
<i>Bacillus megaterium</i>	10,556 e
<i>Serratia marcescens</i>	10,666 e
<i>Bacillus cereus</i>	10,696 e
<i>Bacillus mycoides</i>	10,857 d
<i>Enterobacter cloacae</i>	10,876 d
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	10,926 d
<i>Bacillus cereus</i>	11,050 d
<i>Serratia marcescens</i>	11,859 c
<i>Enterobacter asburiae</i>	11,863 c
<i>Bacillus cereus</i>	11,883 c
<i>Enterobacter asburiae</i>	12,153 c
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	12,270 c
<i>Bacillus cereus</i>	12,490 c
<i>Escherichia coli</i>	14,910 b
<i>Bacillus thuringiensis</i>	17,926 a

Fonte: Do autor (2020).

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott ($p < 0,05$). Média de três repetições em delineamento inteiramente casualizado.

7.1.6 Fixação de Nitrogênio

Dos 68 isolados bacterianos selecionados para a realização do teste de fixação de Nitrogênio, 42 isolados apresentaram a presença da faixa branca com origem do sistema radicular, pseudocaule e folha da *Musa* spp.

7.2 Seleção das bactérias endofíticas para serem utilizadas no ensaio experimental

Nos dias atuais, a aplicação de microrganismos endofíticos em diferentes áreas é uma realidade. Na agricultura, podem-se isolar endófitos de cultivares como milho e soja (RUSSO

et al., 2016) para produzir metabólitos secundários com atividade antifúngica contra fitopatógenos (PARK et al., 2015); na saúde produzindo substâncias que podem ser empregadas como fármacos (NA et al., 2016); ou na recuperação de áreas contaminadas por meio da biorremediação de compostos poluentes e xenobióticos (SYRANIDOU et al., 2016).

Diante dos resultados obtidos no teste de produção de auxinas, as bactérias R 21 (*Bacillus thuringiensis*) e bactéria F01 (*Bacillus cereus*) foram selecionadas mediante aos resultados estatísticos apresentados para a produção de AIA, complementados com as análises dos outros testes realizados, selecionando as mais completas. A bactéria PC01 (*Escherichia coli*) não foi selecionada por não apresentar nenhuma característica dos outros testes realizados, no lugar da bactéria PC01 (*Escherichia coli*) foi acrescida a bactéria F12 (*Bacillus cereus*) por apresentar outras características de outros testes benéficas às plantas em estudo. Além destas três bactérias foi acrescido a bactéria 11.1 (*Micrococcus leteus*).

7.3 Avaliação da promoção de crescimento por bactérias endofíticas em plantas de bananeira em casa de vegetação

7.3.1 Análises biométricas

7.3.1.1 Altura total da planta e diâmetro do pseudocaule

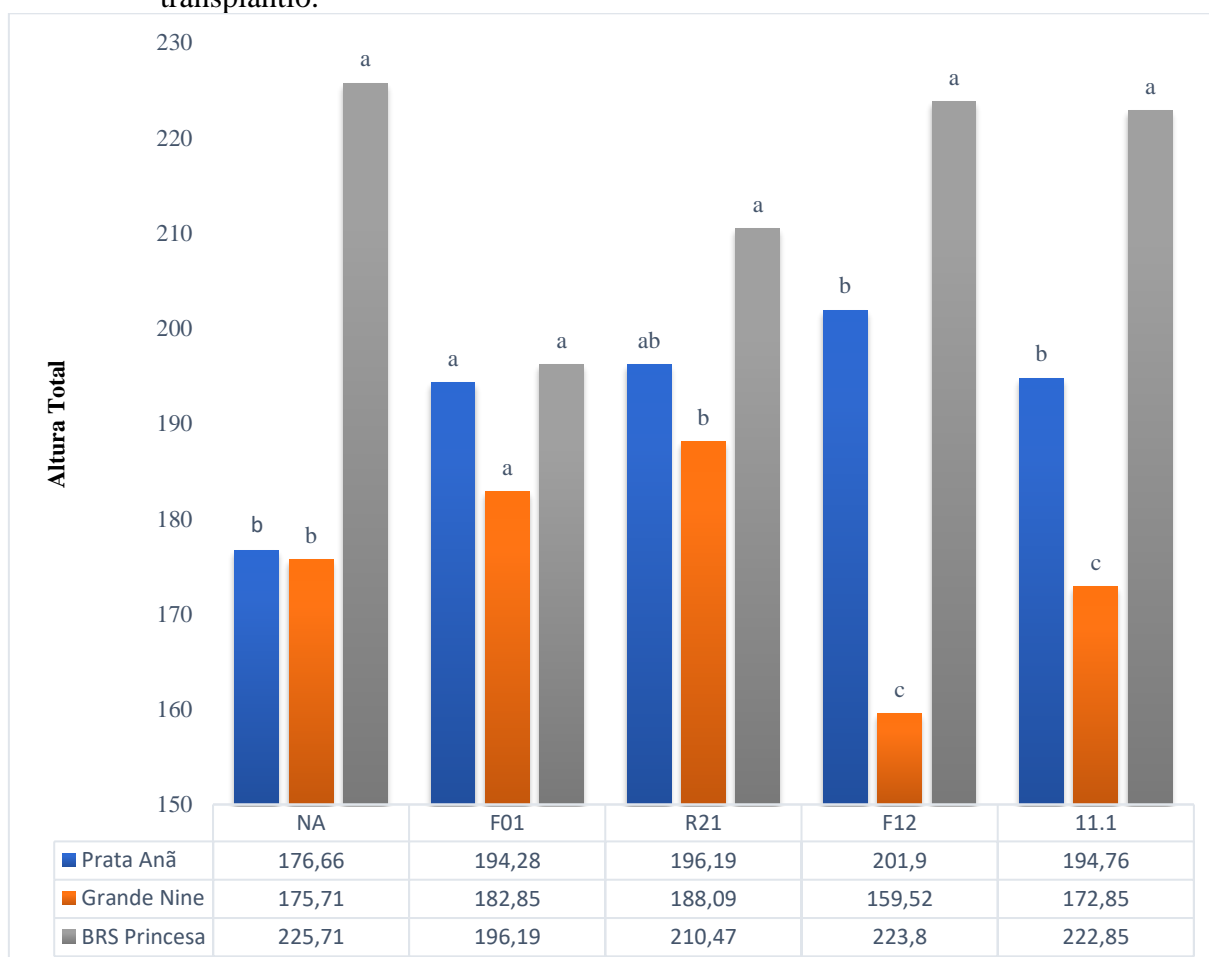
Conforme o esperado, a altura total das plantas apresentou crescimento linear com o avanço dos dias após o transplântio (DAT), destacando-se a bactéria 11.1 (*Micrococcus leteus*) para a cultivar Prata Anã e BRS Princesa, a bactéria F12 (*Bacillus cereus*) para a cultivar BRS Princesa que proporcionou maior altura total de plantas quando comparada aos demais tratamentos (Figura 3).

Para diâmetro do pseudocaule, verificou-se que o controle, a bactéria F01 (*Bacillus cereus*) e R21 (*Bacillus thuringiensis*) para a cultivar Grande Naine proporcionou o crescimento de mudas com diâmetro superior às bactérias F12 (*Bacillus cereus*) e 11.1 (*Micrococcus leteus*). Para a cultivar BRS Princesa o controle e a bactéria 11.1 foram significativos quando comparados com as bactérias F01 (*Bacillus cereus*), R21 (*Bacillus thuringiensis*) e F12 (*Bacillus cereus*). A cultivar Prata Anã obteve melhor resultado na bactéria R21 (*Bacillus thuringiensis*), sendo que a taxa de acréscimo do diâmetro foi linear a medida que se passava os dias até aos 90 DAT, no final do experimento foi possível avaliar que para cada cultivar

houve a influência de uma cerca bactéria, onde proporcionou valores distintos em sua maioria totalidade dos dados obtidos para essa variável (Figura 4).

Segundo Souza et al. (2017), a utilização de inoculantes microbianos capazes de promover o crescimento e incrementar a produtividade das plantas tem sido aceita como alternativa a redução do uso de adubos químicos. Diante do exposto, o isolado R21 (*Bacillus thuringiensis*) caracterizado como fixador biológico de nitrogênio, o R21 (*Bacillus thuringiensis*) F01 (*Bacillus cereus*) F12 (*Bacillus cereus*) e 11.1 (*Micrococcus leteus*), sintetizadores do ácido indol-3-acético, propiciaram os maiores incrementos para a altura total e diâmetro do pseudocaule.

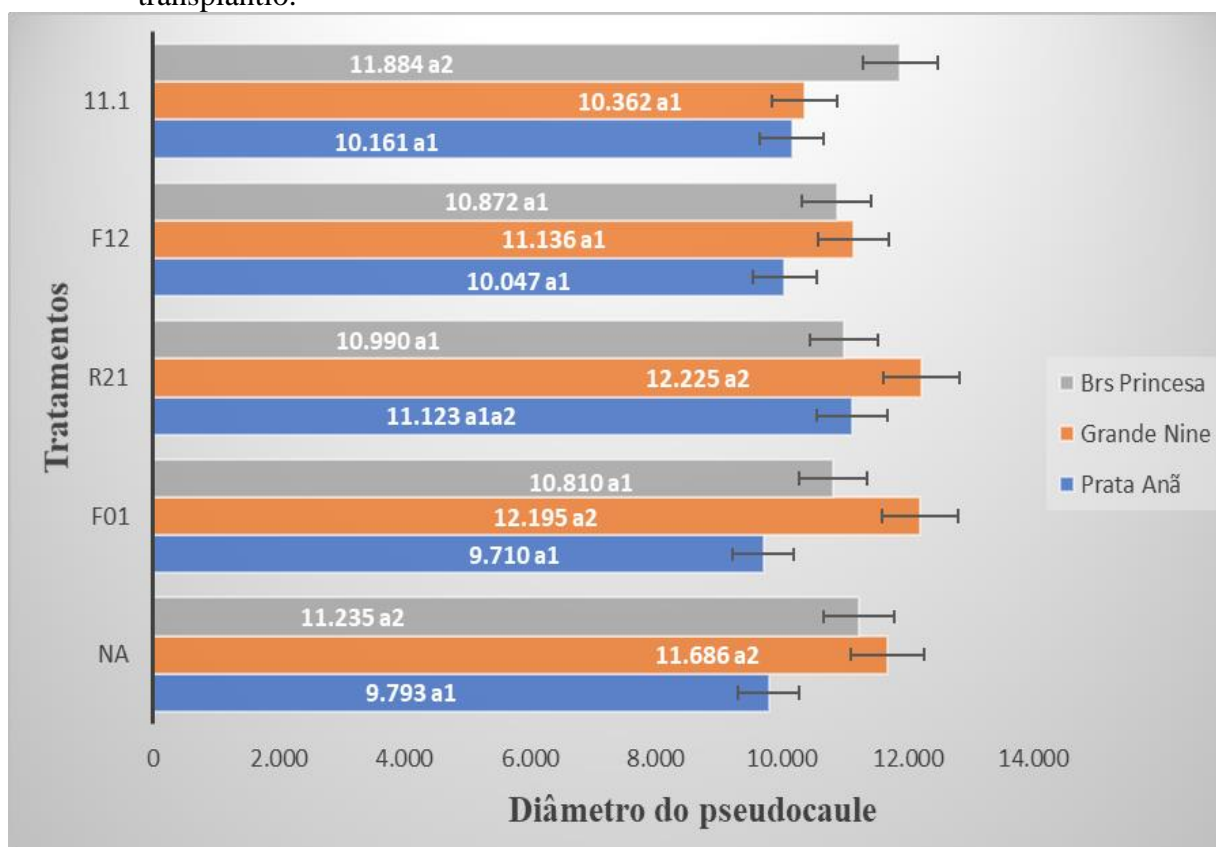
Figura 3 – Altura total de plantas de bananeira cultivares Prata Anã, Grande Naine e BRS Princesa, submetidas a diferentes inoculações de bactérias, aclimatizadas em casa de vegetação com comparação de médias entre tratamentos aos 90 dias após transplântio.



Fonte: Do autor (2020).

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 4 – Diâmetro do pseudocaule de plantas de bananeira cultivares Prata Anã, Grande Naine e BRS Princesa, submetidas a diferentes inoculações de bactérias, aclimatizadas em casa de vegetação com comparação de médias entre tratamentos aos 90 dias após transplântio.



Fonte: Do autor (2020).

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

7.3.2 Análises morfológicas

7.3.2.1 Comprimento pseudocaule/raiz, área foliar, nº folhas, massa seca/fresca da folha

Avaliando-se o comprimento do pseudocaule, é possível verificar que a bactéria F12 (*Bacillus cereus*) foi a melhor para a cultivar Prata Anã, para a cultivar Grande Naine não houve diferença significativa entre os tratamentos o mesmo ocorreu com a cultivar BRS Princesa (Tabela 7). Em pesquisa realizada por Silva et al. (2018) relata-se que a inoculação com as bactérias promotoras de crescimento de plantas é uma alternativa sustentável para produção de mudas de qualidade, onde a biomassa bacteriana e os mecanismos envolvidos nas interações planta/microrganismo são pontos importantes para o sucesso, favorecendo às mudas ganhos em

altura, comprimento da raiz, massa seca da raiz, diâmetro do pseudocaule e área foliar através da produção de enzimas e sideróforos.

Em relação a variável comprimento de raiz a cultivar Prata Anã obteve os melhores resultados nas bactérias F01 (*Bacillus cereus*), R21 (*Bacillus thuringiensis*), F12 (*Bacillus cereus*) e 11.1 (*Micrococcus leteus*) quando comparada com o controle. A cultivar Grande Naine se sobressaiu nas bactérias F01 (*Bacillus cereus*) e R21 (*Bacillus thuringiensis*) quando comparadas com as demais já para a BRS Princesa não houve diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 7).

Segundo o relato de Lambrech et al. (2000) e Arruda et al. (2013), as auxinas sintetizadas pelas bactérias afetam o sistema radicular, aumentando o tamanho, o número de ramificações de raízes adventícias e a área de contato com o solo, possibilitando que uma maior área seja explorada pela superfície radicular, disponibilizando assim grandes quantidades de nutrientes à planta. Ao analisar a área foliar foi possível observar que a cultivar Prata Anã destacou-se nas bactérias 11.1 (*Micrococcus leteus*), R21 (*Bacillus thuringiensis*) e no controle. Já para a cultivar Grande Naine verificou-se diferença significativa entre a bactéria R21 (*Bacillus thuringiensis*) e os demais tratamentos. A bactéria 11.1 (*Micrococcus leteus*) e o controle foram superiores aos outros tratamentos para a cultivar BRS Princesa. Dessa forma, pode-se inferir que essas diferenças estão relacionadas com a diferença de tamanho das plantas.

No presente trabalho nota-se que as médias da variável número de folhas foi menor, não ultrapassando 6 folhas em nenhum tratamento aos 90 dias. Talvez essa diferença seja por conta da senescência das folhas mais jovens e o surgimento de novas folhas. Para os tratamentos (Tabela 7).

Para massa fresca das folhas, o controle e a bactéria 11.1 (*Micrococcus leteus*) da cultivar BRS Princesa ocorreu diferença significativa para os demais tratamentos, a cultivar Prata Anã e Grande Naine não obtiveram diferenças entre os tratamentos. Apesar da diferença de objetivos e tratamentos, os resultados encontrados com aclimatização por 90 dias indicam bom desenvolvimento das mudas utilizadas. A maior massa fresca final foi obtida em plantas advindas do tratamento controle e da bactéria 11.1 (*Micrococcus leteus*) da cultivar BRS Princesa, obtendo-se média superior aos demais tratamentos. A massa fresca final das folhas difere em função da cultivar e do tipo de tratamento envolvido (Tabela 7).

A maior massa seca da folha para a cultivar Prata Anã foi observada nos tratamentos com bactérias R21 (*Bacillus thuringiensis*), F12 (*Bacillus cereus*) e 11.1 (*Micrococcus leteus*) quando comparada com a bactéria F01 e o controle. Para a cultivar BRS Princesa, os melhores resultados foram o controle, a bactéria 11.1 (*Micrococcus leteus*), F12 (*Bacillus cereus*) e R21

(*Bacillus thuringiensis*) quando comparada com a bactéria F01 (*Bacillus cereus*) esse maior acúmulo de biomassa indica um melhor desenvolvimento das mudas micropropagadas de bananeira cv. Prata Anã e BRS Princesa quando as mesmas são aclimatizadas por 90 dias em casa de vegetação sob as mesmas condições climáticas. A cultivar Grande Naine não houve diferença significativa entre os tratamentos analisados.

Tabela 7 – Comprimento do pseudocaule CP (cm), raiz CR (cm), número de folhas NF, área foliar AF (cm²), massa fresca MFF e massa seca da folha MSF (g) de plantas de bananeira cultivares Prata Anã, Grande Naine e BRS Princesa, submetidas a diferentes inoculações de bactérias, aclimatizadas em casa de vegetação, onde os tratamentos são: NA (Controle) Agar nutriente sem bactéria, F01 (*Bacillus cereus*), R21 (*Bacillus thuringiensis*), F12 (*Bacillus cereus*) e 11.1 (*Micrococcus leteus*).

	Tratamentos					Cultivar	CV
	NA	F01	R21	F12	11.1		
CP (cm)	6,676 b	7,452 b	7,723 b	7,700 b	7,114 b	Prata Anã	16,18
	7,538 b	6,857 b	7,204 b	6,409 b	6,319 b	Grande Naine	
	10,828 a	9,256 a	9,409 a	9,485 a	10,352 a	BRS Princesa	
NF	5,714 a	5,571 a	5,809 a	5,238 a	5,714 a	Prata Anã	15,38
	5,666 a	5,904 a	6,000 a	5,476 a	5,904 a	Grande Naine	
	4,761 b	4,238 b	4,571 b	4,476 b	4,714 b	BRS Princesa	
MFF (g)	2,969 b	3,227 a	3,842 a	3,220 a	3,488 ab	Prata Anã	28,08
	3,376 b	3,674 a	3,899 a	2,933 a	3,238 b	Grande Naine	
	4,445 a	3,331 a	3,713 a	4,006 a	4,096 a	BRS Princesa	
MSF (g)	0,348 b	0,394 a	0,467 a	0,400 a	0,403 a	Prata Anã	30,58
	0,340 b	0,352 a	0,378 b	0,298 b	0,305 b	Grande Naine	
	0,498 a	0,371 a	0,394 ab	0,448 a	0,469 a	BRS Princesa	
CR (cm)	10,666 b	15,880 b	14,285 b	15,957 a	17,666 a	Prata Anã	20,9
	14,809 a	20,585 a	18,785 a	16,161 a	17,185 a	Grande Naine	
	9,052 b	11,000 c	11,557 c	11,061 b	12,452 b	BRS Princesa	
AF (cm ²)	104,95 ab	123,61a	124,09 a	112,10 a	133,08 a	Prata Anã	21,23
	94,85 b	107,36 a	112,97 ab	96,62 a	89,09 b	Grande Naine	
	120,62 a	109,19 a	101,39 b	111,70 a	129,54 a	BRS Princesa	

Fonte: Do autor (2020).

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

7.3.2.2 Massa fresca/seca do pseudocaule e raiz

A massa fresca do pseudocaule obteve melhor resultado no controle da cultivar BRS Princesa ocorrendo diferença significativa para os demais tratamentos, a cultivar Prata Anã não

obteve diferenças entre os tratamentos, a cultivar Grande Naine obteve os melhores resultados entre o controle e a bactéria R21 (*Bacillus thuringiensis*). Apesar da diferença de objetivos e tratamentos, os resultados encontrados com aclimatização por 90 dias indicam bom desenvolvimento das mudas utilizadas. A maior massa fresca final foi obtida em plantas advindas do tratamento controle da cultivar BRS Princesa, obtendo-se média superior aos demais tratamentos. A massa fresca final do pseudocaule difere em função da cultivar e do tipo de tratamento envolvido (Tabela 8).

A maior massa seca do pseudocaule para a cultivar Grande Naine foi observada no controle. Para a cultivar BRS Princesa o melhor resultado foi o controle seguido pela bactéria 11.1 (*Micrococcus luteus*), a cultivar Prata Anã não houve diferenças entre os tratamentos. Esse maior acúmulo de biomassa na cultivar BRS Princesa indica um melhor desenvolvimento das mudas micropropagadas “quando as mesmas são aclimatizadas por 90 dias em casa de vegetação sob as mesmas condições climáticas” (Tabela 8).

A massa fresca da raiz obteve melhor resultado no controle e na bactéria F01 (*Bacillus cereus*) da cultivar Prata Anã ocorrendo diferença significativa para os demais tratamentos, a cultivar Grande Naine não obteve diferenças entre os tratamentos. A cultivar BRS Princesa obteve diferenças significativas entre os resultados da bactéria F12 (*Bacillus cereus*) e os demais tratamentos onde apresentaram maior média (Tabela 8).

Segundo Ferrari et al. (2018), em trabalho realizado utilizando bactérias produtoras de fitohormônios na aclimatização durante 60 dias em casa de vegetação de mudas de bananeira micropropagadas apresentou diferenças significativas na massa fresca e seca de raízes na ordem de 58%.

Não houve diferença significativa entre os tratamentos das cultivares Grande Naine e BRS Princesa. A cultivar Prata Anã obteve resultados diferentes entre a bactéria 11.1 (*Micrococcus luteus*) e os demais tratamentos onde apresentaram maior média. Esse maior acúmulo de biomassa na cultivar BRS Princesa indica um melhor desenvolvimento das mudas micropropagadas quando as mesmas são aclimatizadas por 90 dias em casa de vegetação sob as mesmas condições climáticas (Tabela 8).

Tabela 8 – Massa fresca do pseudocaule MFP (g), massa seca pseudocaule MSP (g), massa fresca da raiz MFR (g) e massa seca da raiz MSR (g) de plantas de bananeira cultivares Prata Anã, Grande Naine e BRS Princesa, submetidas a diferentes inoculações de bactérias, aclimatizadas em casa de vegetação, onde os tratamentos são: NA (Controle) Agar nutriente sem bactéria, F01 (*Bacillus cereus*), R21 (*Bacillus thuringiensis*), F12 (*Bacillus cereus*) e 11.1 (*Micrococcus leteus*).

	Tratamentos					Cultivar	CV
	NA	F01	R21	F12	11.1		
MFP (g)	2,944 c	3,536 a	3,586 a	3,375 a	3,066 b	Prata Anã	31,2
	4,177 b	3,843 a	4,024 ab	3,270 a	3,250 b	Grande Nine	
	5,656 a	4,128 a	4,024 ac	4,775 a	5,349 a	BRS Princesa	
MSP (g)	0,261 c	0,315 a	0,353 a	0,336 a	0,308 b	Prata Anã	36,2
	0,385 b	0,365 a	0,371 a	0,334 a	0,305 b	Grande Nine	
	0,531 a	0,356 a	0,414 a	0,427 a	0,483 a	BRS Princesa	
MFR (g)	6,756 a	7,438 a	4,124 b	3,984 a	2,159 b	Prata Anã	30,3
	1,278 c	2,832 c	3,265 b	4,042 a	1,313 b	Grande Nine	
	5,014 b	5,841 b	6,546 a	4,762 a	4,242 a	BRS Princesa	
MSR (g)	0,785 a	0,757 a	0,915 a	0,716 a	0,626 ab	Prata Anã	27,2
	0,502 b	0,552 b	0,502 b	0,469 b	0,560 b	Grande Nine	
	0,859 a	0,846 a	1,002 a	0,720 a	0,732 a	BRS Princesa	

Fonte: Do autor (2020).

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

7.3.3 Análises fisiológicas

7.3.3.1 Condutância estomática (GS)

A cultivar Prata Anã obteve melhor resultado significativo na bactéria R21 (*Bacillus thuringiensis*) quando comparada com os demais tratamentos, a Grande Naine apresentou diferenças significativas entre as Bactérias F01(*Bacillus cereus*), R21 (*Bacillus thuringiensis*) dos demais tratamentos, a BRS Princesa apresentou diferença significativa entre o controle, a bactéria F01 (*Bacillus cereus*), bactéria F12 (*Bacillus cereus*) dos demais tratamentos (Tabela 9).

Verifica-se que a bananeira regula a perda de água para manutenção de um balanço hídrico favorável com o fechamento estomático. Assim, a planta mantém-se túrgida, condição fundamental para maior crescimento e desenvolvimento. A condutância estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) está relacionada ao uso da água e à fotossíntese líquida. Seus valores diminuem com o

aumento do déficit de pressão de vapor e da temperatura. Cultivares que apresentam sensibilidade do estômato ao déficit de pressão de vapor tendem a restringir a abertura estomática à tarde e são consideradas econômicas em água. Isto pode ou não estar relacionado com tolerância à seca (TURNER, 2013).

7.3.3.2 Taxa de fotossíntese (A)

As plantas C3 como a bananeira, em média, apresentam taxas fotossintéticas variando entre 10 e 20 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (RAVEN et al., 2001), desta maneira, a cultivar Prata Anã (3,54 – 5,27 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), Grande Naine (3,75 – 5,54 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e BRS Princesa (3,30 – 4,97 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) apresentaram valores abaixo, segundo Arantes et al. (2016) as taxas fotossintéticas em bananeiras podem variar ainda mais.

A taxa de fotossíntese da cultivar Prata Anã foi significativamente diferente entre o controle e a bactéria F12 (*Bacillus cereus*) dos demais tratamentos, a cultivar Grande Naine obteve diferença significativa entre o controle e a bactéria F01 (*Bacillus cereus*) dos demais tratamentos, a BRS Princesa deve destaque significativo da bactéria R21 (*Bacillus thuringiensis*) dos demais tratamentos (Tabela 9).

7.3.3.3 Taxas de transpiração (E)

A taxa de transpiração ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) avaliada na cultivar Prata Anã na bactéria R21 diferiu dos demais tratamentos, variações também foram observadas na cultivar Grande Naine entre a bactéria F01 (*Bacillus cereus*) e R21 (*Bacillus thuringiensis*) dos demais tratamentos. Na BRS Princesa ocorreu diferença significativa na bactéria F01 (*Bacillus cereus*) entre os demais tratamentos (Tabela 9).

7.3.3.4 Temperatura da folha (T°)

A temperatura foliar da cultivar Prata Anã apresentou variação significativa do controle e da bactéria 11.1 (*Micrococcus luteus*) dos demais tratamentos. A cultivar Grande Naine obteve destaque significativo entre a bactéria F01 (*Bacillus cereus*) e F12 (*Bacillus cereus*) dos demais tratamentos. A bactéria R21 (*Bacillus thuringiensis*) obteve melhor resultado significativo na cultivar BRS Princesa quando comparada com os demais tratamentos (Tabela 9).

Entretanto, o comportamento ecofisiológico é resultante do balanço dos diversos fatores ambientais (DONATO et al., 2013). Segundo Robinson e Saúco (2012), a temperatura ótima para a carboxilação do CO₂ predominante em plantas com mecanismo fotossintético C3, como a bananeira, está em torno de 22°C, na fase de crescimento e desenvolvimento a temperatura ótima é de aproximadamente 27°C.

Segundo Taiz e Zeiger (2017) esta é uma fase enzimática, que consiste de uma reação catalisada pela enzima ribulose 1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), mediante a qual o CO₂ é adicionado a um açúcar de 5 carbonos, a ribulose 1,5-bifosfato (RuBP) para formar duas moléculas de ácido fosfoglicérico (PGA) de três carbonos. Além da atividade de carboxilase, também apresenta atividade oxigenase. Quando atua como oxigenase, o acceptor ribulose 1,5-bifosfato combina-se com o oxigênio para produzir um PGA e uma molécula de fosfoglicolato. Esse processo é denominado de fotorrespiração. O balanço entre as atividades carboxilase e oxigenase da Rubisco é governado pela sua cinética, temperatura e concentração dos substratos CO₂ e O₂. Sob concentração de CO₂ ambiental, o aumento na temperatura modifica as constantes cinéticas da rubisco e aumenta a taxa de oxigenação preferencialmente à carboxilação, conseqüentemente aumenta a fotorrespiração e decresce a fotossíntese líquida.

7.3.3.5 Avaliação indireta do teor de clorofila

Quanto às unidades SPAD obtidas do primeiro par de folhas expandida das mudas de bananeira Prata Anã, houve diferença significativa em relação ao controle, bactéria R21 (*Bacillus thuringiensis*), F12 (*Bacillus cereus*) e 11.1 (*Micrococcus luteus*) do tratamento bactéria F01, não houve diferença significativa entre os tratamentos da cultivar Grande Naine. No entanto, observou-se diferença significativa em relação a bactéria F01 (*Bacillus cereus*), F12 (*Bacillus cereus*) e 11.1 (*Micrococcus luteus*).do tratamento controle e bactéria R21 na cultivar BRS Princesa (Tabela 9).

Tabela 9 – Bananeiras cultivares Prata Anã, Grande Naine e BRS Princesa, submetidas a diferentes inoculações de bactérias, aclimatizadas em casa de vegetação, onde os tratamentos são: NA (Controle) Agar nutriente sem bactéria, F01 (*Bacillus cereus*), R21 (*Bacillus thuringiensis*), F12 (*Bacillus cereus*) e 11.1 (*Micrococcus leteus*). GS) Condutância estomática ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$); A) Taxa de fotossíntese ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$); E) Taxa de transpiração ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$); T°) Temperatura da folha ($^{\circ}\text{C}$); S) SPAD.

	Tratamentos					Cultivar	CV
	NA	F01	R21	F12	11.1		
GS	0,07 a	0,03 b	0,08 a	0,05 b	0,03 a	Prata Anã	31,5
	0,05 b	0,04 ab	0,06 b	0,05 b	0,03 a	Grande Nine	
	0,06 a	0,04 a	0,03 c	0,07 a	0,03 a	BRS Princesa	
A	5,27 a	4,46 b	3,54 b	5,09 a	4,47 a	Prata Anã	22,4
	5,08 a	5,29 a	5,54 a	3,75 b	4,21 a	Grande Nine	
	3,62 b	4,21 b	4,97 a	3,30 b	4,59 a	BRS Princesa	
E	1,86 a	0,75 b	2,00 a	1,24 ab	0,76 a	Prata Anã	30,0
	1,36 b	1,08 a	1,67 b	1,42 a	0,81 a	Grande Nine	
	1,22 b	0,89 ab	1,13 c	1,15 b	0,91 a	BRS Princesa	
T°	27,83 a	27,25 b	27,05 c	26,90 b	27,91 a	Prata Anã	0,64
	27,56 b	27,75 a	27,68 b	27,25 a	26,77 b	Grande Nine	
	23,56 c	24,50 c	28,63 a	22,31 c	26,39 c	BRS Princesa	
S	37,83 a	30,70 b	47,53 a	38,56 a	35,66 a	Prata Anã	13,4
	34,36 b	30,36 ab	33,73 b	25,10 b	27,23 b	Grande Nine	
	33,36 b	35,83 a	33,36 b	35,66 a	37,20 a	BRS Princesa	

Fonte: Do autor (2020).

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

8 CONCLUSÕES

As bactérias apresentaram resultados distintos em relação às cultivares estudadas. Levando em consideração as variáveis biométricas, morfológicas e fisiológicas, recomenda-se, para o processo de aclimatização de mudas de bananeira, a utilização da bactéria R21 (*Bacillus thuringiensis*) para as cultivares Prata Anã e Grande Naine e ausência de bactéria para a BRS Princesa por estimular o crescimento da planta, aumentar a massa fresca e seca, além de promover o crescimento de raízes e melhorar os aspectos fisiológicos da planta.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A associação entre cultivares de bananeira e bactérias estimulou o crescimento e desenvolvimento das plantas, possibilitando a melhoria no processo de aclimatização. Dessa forma, é possível antecipar o ciclo da cultura e proporcionar retorno econômico ao produtor. No entanto, mais estudos são necessários para compreender melhor as relações entre as bactérias promotoras de crescimento e a planta hospedeira.

REFERÊNCIAS

- AFZAL, I. et al. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. **Microbiological Research**, [s.l.], v. 221, p.36-49, abr. 2019.
- AGRIBUS. **AGRIBUS 2019 - Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira**. 2019. p. 153-154.
- ARAGUAIA, M. "**Banana**"; **Brasil Escola**. Disponível em: <<https://brasilecola.uol.com.br/frutas/banana.htm>>. Acesso em: 10 abr. 2019.
- ARPIN, C. et al. Epidemiological study of an outbreak due to multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes* in a medical intensive care unit. **Journal of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 34, n. 9, p. 2163-2169, 1996.
- ANDRADE, L. F. **Bactérias endofíticas de bananeira “prata-anã”: fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato de cálcio e produção de ácido indol-3-acético**. 2012. 67 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, 2012.
- ARANTES, A. M. et al. Gas exchange in different varieties of banana prata in semi-arid environment. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 38, n. 2, p. 1-12, 2016.
- BALDANI, V. L. et al. **Manual de Soluções e Reagentes da Embrapa Agrobiologia**. Seropédica: EMBRAPA AGROBIOLOGIA, 1999. 16 p.
- BARBIERI, M.; HACKMANN, R. **Banana, Cepea, clima, exportações de banana, exportações de banana ao Mercosul, exportações de frutas, mercado internacional, oferta de banana, qualidade**. Disponível em: <<https://www.hfbrasil.org.br/br/banana-cepea-exportacoes-ao-mercosul-estao-com-bom-ritmo.aspx>>. Acesso em: 22 de jul. 2019.
- BRASNICA. **Frutas Tropicais. 25 Surpreendentes Benefícios da Banana Para Saúde Beleza**. Disponível em: <<http://www.brasnica.com.br/blog/25-surpreendentes-beneficios-da-banana-para-saude-beleza/>>. Acesso em: 15 de dez. 2019.
- BRUCKNER, C. H. **Melhoramento de Fruteiras Tropicais**. 2.ed. Viçosa: UFV, 2002. 422 p.
- CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. 2. ed. Piracicaba: ESALQ, 2016. 221 p.
- COSTA, A. M. et al. Cultivo *in vitro* da bananeira Prata Anã clone Gorutuba, em meio líquido, agitado e estacionário. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 63, n. 3, p. 277-284, jun. 2016.
- PATEL, D. H. et al. Synergistic effect of root-associated bacteria on plant growth and certain physiological parameters of banana plant (*Musa acuminata*). **Archives of Agronomy and Soil Science**, [s.l.], v. 64, n. 7, p. 1021-1031, dez. 2017.
- FERRARI, E. et al. Potential of auxinary production bacterium in promoting the growth of micropropagate banana plant. **Scientific Electronic Archives**, [s.l.], v. 11, n. 4, p. 1-7, 2018.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia (UFLA)**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S. (Ed.). **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP: Embrapa CNPH, 1990. p. 99-170.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618>>. Acesso em: 20 fev. 2020.

KUMAR, R. et al. Estudo do estabelecimento *in vitro* e indução de calos em Banana cv. Grande Naine. **Revista Atual de Ciência Aplicada e Tecnologia**, [s.l.], v. 33, n. 3, p. 1-5, mar. 2019.

KARTHIK, M. et al. Endophytic bacteria associated with banana cultivars and their inoculation effect on plant growth. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, [s.l.], v. 92, n. 6, p. 568-576, abr. 2017.

LAZAROVITS, G.; NOWAK, J. Rhizobacteria for Improvement of plant growth and establishment. **Hortscience**, [s.l.], v. 32, n. 2, p. 188-192, abr. 1997.

LEONEL, S. et al. Desempenho agrônomo de bananeiras micropropagadas em Botucatu-SP. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 2, p. 245-248, ago. 2004.

LIMA, M. B.; SILVA, S. O. E.; FERREIRA, C. F. **Banana: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília-DF, Brasil. 2012. 214 p.

MATOS, A. D. M. et al. Phosphate solubilization by endophytic bacteria isolated from banana trees. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 89, n. 4, p. 2945-2954, dez. 2017.

MELLONI, R. et al. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [s.l.], v. 30, n. 2, p. 235-246, abr. 2006.

MOREIRA, R. S. **Banana: teoria e prática de cultivo**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. 335 p.

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

NA, R. et al. Identification of vincamine indole alkaloids producing endophytic fungi isolated from *Nerium indicum*, Apocynaceae. **Microbiological Research**, [s.l.], v. 192, p. 114-121, nov. 2016.

NAZAROWEC-WHITE, M.; FARBER, J. M. *Enterobacter sakazakii*: a review. **International Journal of Food Microbiology**, [s.l.], v. 34, n. 2, p. 103-113, fev. 1997.

NOMURA, E. S. et al. Avaliação agronômica de genótipos de bananeiras em condições subtropicais, Vale do Ribeira, São Paulo - Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 35, n. 1, p. 112-122, mar. 2013.

NOVOLETTI, G. et al. **Cultivo e produção de Banana**. 1.ed. Piracicaba: ESALQ-USP, 2016. 86 p.

OLIVEIRA, M. M. E. et al. Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex. **Research in Microbiology**, [s.l.], v. 166, n. 2, p. 102-110, fev. 2015.

OLIVEIRA, J. A. S. et al. síntese biológica de nanopartículas mediada por micro-organismos endofíticos. **Saber Científico**, Porto Velho, v. 8, n. 1, p. 146-155, jul. 2019.

OLIVEIRA, J. P; SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E. Caracterização bioquímica de bactérias sistêmicas em bananeiras, sensibilidade a antibióticos e fitotoxicidade de plantas durante a proliferação de brotos. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 38, n. 2, p. 193-200, jun. 2016.

PARK, Y. H. et al. Endophytic *Trichoderma citrinoviride* isolated from mountain-cultivated ginseng (*Panax ginseng*) has great potential as a biocontrol agent against ginseng pathogens. **Journal of Ginseng Research**, [s.l.], v. 43, n. 3, p. 408-420, jul. 2019.

PEDRINHO, E. A. N. et al. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 4, p. 905-911, dez. 2010.

RAVEN, P. H. et al. **Biologia vegetal: Raiz / Estrutura e desenvolvimento**. 6. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 2001. 906 p.

RIBEIRO, A. S; PAMPHILE, J. A. Micro-organismos endofíticos e seu potencial biotecnológico. **Revista Uningá Review**, Maringá, v. 29, n. 3, mar. 2017.

ROCHA, J. S. et al. Endophytic interaction of *Bacillus* sp. in micropropagated banana plantlets. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 91, n. 3, e20181295, 2019.

RODRIGUES, F. A. et al. Crescimento de bananeiras micropropagadas em função do substrato e adubo de liberação controlada. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 18, n. 1, p. 146-149, fev. 2019.

RODRIGUES, M. G. V. et al. Banana. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 32, p. 35-48, 2011.

RUSSO, M. L. et al. Endophytic fungi from selected varieties of soybean (*Glycine max* L. Merr.) and corn (*Zea mays* L.) grown in an agricultural area of Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, [s.l.], v. 48, n. 2, p. 154-160, abr. 2016.

SALOMÃO, L. C. C. et al. Crescimento e produção da bananeira (Musa spp. AAB) 'Prata-Anã', oriunda de rizoma e micropropagada. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 63, n. 3, p. 340-347, jun. 2016.

SARWAR, M.; KREMER, R.J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, [s.l.], v. 20, n. 5, p. 282-285, mai. 1995.

SILVA, C. F. B. et al. Growth-promoting potential of bacterial biomass in the banana micropropagated plants. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 22, n. 11, p. 782-787, nov. 2018.

SILVA, J. P. L. et al. **Catálogo da coleção de microrganismos de interesse da indústria de alimentos e agroenergia**. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2013. 30 p.

SILVA, S. O. et al. Cultivares. In: ALVES, E. J. (Org). **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. Brasília: Embrapa-SPI; Cruz das Almas: Embrapa-CNPMF, p. 585, 1997.

SINGH, H. P. et al. **Micropropagation for production of quality banana planting material in Asia-Pacific: Health Management in the Production of Disease Free Planting Material through Micropropagation**. New Delhi: Consortium on Agricultural Biotechnology, 2011. 92 p.

SIQUEIRA, D. L. et al. Micropropagação da bananeira 'Maçã', cultivada in vitro em diferentes volumes de meio líquido. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 60, n. 6, p. 745-751, dez. 2013.

SOUZA, G. L. O. D. et al. Endophytic bacteria used as bioinoculants in micropropagated banana seedlings. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 39, n. 2, p. 1-10, jun. 2017.

SYRANIDOU, E. et al. Bisphenol-A removal by the halophyte *Juncus acutus* in a phytoremediation pilot: Characterization and potential role of the endophytic community. **Journal of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 323, p. 350-358, fev. 2017.

TAIZ, L. et al. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal: Crescimento e desenvolvimento**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 888 p.

VEJAN, P. et al. Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability - A review. **Molecules**, [s.l.], v. 21, n. 5, p. 1-17, abr. 2016.

WEBER, O. B. et al. **Bactérias diazotróficas em abacaxizeiros e bananeiras: técnicas de inoculação e monitoramento**. Fortaleza: Embrapa-CNPAT, 1999. 16 p.