



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA
DOUTORADO EM AGRONOMIA

GLEDSON LUIZ SALGADO DE CASTRO

**RIZOBACTÉRIAS PROMOVEM CRESCIMENTO, ALIVIAM OS EFEITOS
DO DÉFICIT HÍDRICO E REDUZEM ANTRACNOSE EM MUDAS DE
AÇAIZEIRO**

BELÉM
2018

GLEDSON LUIZ SALGADO DE CASTRO

**RIZOBACTÉRIAS PROMOVEM CRESCIMENTO, ALIVIAM OS EFEITOS
DO DÉFICIT HÍDRICO E REDUZEM ANTRACNOSE EM MUDAS DE
AÇAIZEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do curso de doutorado em agronomia: Área de concentração Produção Vegetal em Sistemas, para obtenção do título de Doutor em Agronomia.

Agrícolas, para obtenção do título de doutor.
Orientadora: Prof.^a Gisele Barata da Silva

BELÉM
2018

Castro, Gledson Luiz Salgado de

Rizobactérias promovem crescimento, aliviam os efeitos do déficit hídrico e reduzem antracnose em mudas de açaizeiro / Gledson Luiz Salgado de Castro. - Belém, 2018.

125 f.

Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2018.

1. *Euterpe oleracea*. 2. Bioestimulante. 3. Estresse oxidativo. 4. *Colletotrichum* sp. I. Título.

CDD – 634.6

GLEDSON LUIZ SALGADO DE CASTRO

**RIZOBACTÉRIAS PROMOVEM CRESCIMENTO, ALIVIAM OS EFEITOS
DO DÉFICIT HÍDRICO E REDUZEM ANTRACNOSE EM MUDAS DE
AÇAIZEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do curso de doutorado em agronomia: Área de concentração Produção Vegetal em Sistemas Agrícolas, para obtenção do título de doutor.

Orientadora: Prof.^a Gisele Barata da Silva

Aprovado em 31 de julho de 2018

BANCA EXAMINADORA



Prof. Gisele Barata da Silva - Orientadora
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA



Prof. Fábio Lopes Olivares - 1º Examinador
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE - UENF



Dr. Walter Vellasco Duarte Silvestre - 2º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA



Dr. Rafael Borges da Silva Valadares - 3º Examinador
INSTITUTO TECNOLÓGICO VALE - UFRA



Dr. João Tomé de Farias Neto - 4º Examinador
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA

DEDICO

Aos meus pais, Luiz Lopes de Castro e Sírnia Nazaré da Silva Salgado, pelos os seus sacrifícios, incentivos e apoio nos momentos mais difíceis para me manter em meus estudos.

Aos meus irmãos Wagner Salgado de Castro, Sara Salgado de Castro e Wanderson Salgado de Castro, por todo amor, carinho e o apoio nas horas mais difíceis.

Aos meus amigos e demais familiares, tão importantes em todos os momentos da minha vida pelo incentivo.

OFEREÇO

A minha esposa, Rosana da Costa Silva, por todo amor, carinho, força, paciência, companheirismo e compreensão em todos os momentos desta jornada. Muito obrigado por acreditar em meu crescimento profissional.

Obrigado por tudo!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder a vida, saúde e paz. Por toda a força concedida diante das dificuldades e por todas as vitórias alcançadas. Sempre serei muito grato por estar comigo, por iluminar a minha mente e fazer de mim um instrumento em suas mãos.

À Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA, pela formação profissional e oportunidade de realizar o curso de Doutorado em Agronomia;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão das bolsas de estudos e financiamento das pesquisas;

À minha orientadora, Prof.^a Gisele Barata da Silva, pela orientação, ensinamentos e conhecimentos repassados. A ela tenho imensa admiração pelo seu profissionalismo e por sua disposição, não medindo esforços para atender e transmitir seus conhecimentos. Muito obrigado pelas oportunidades e confiança depositadas em mim.

À banca examinadora de defesa Prof. Fábio Lopes Olivares, Walter Vellasco Duarte Silvestre, Rafael Borges da Silva Valadares e João Tomé de Farias Neto pela participação e pelas contribuições na melhoria do trabalho. Muito obrigado;

Ao Laboratório de Proteção de Plantas - LPP, onde pude desenvolver as pesquisas com todo apoio necessário, em especial à Fernando, Gleice e Marcela Rêgo pelo auxílio no cultivo dos microrganismos e análise bioquímicas.

Aos doutorandos e grandes amigos Josué Lima, Bruna Fujiyama, Rodolfo Nunes, Jonny Lucio e Michel Sato pela ajuda e companheirismo em todas as etapas deste trabalho, pela amizade, pela agradável convivência, por dividir comigo todos os momentos de dificuldade durante a execução do experimento. Por me incentivar e ensinar através de suas experiências e competências. Pelos bons momentos de alegria e descontração, e por toda atenção e carinho a mim dispensado.

Aos meus pais, Luiz L. de Castro e Sírnia Nazaré S. Salgado, e irmãos Wagner S. de Castro, Sara S. de Castro e Wanderson S. de Castro pelos os seus sacrifícios, incentivos, apoio para me manter em meus estudos e por estarem sempre comigo.

A minha esposa, Rosana da Costa Silva, por todo amor, carinho, força, paciência, companheirismo e compreensão em todos os momentos desta jornada. Muito obrigado pela força e por acreditar em meu crescimento profissional.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta tese e para o meu crescimento profissional.

Minhas sinceras considerações e agradecimentos

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
APX	Ascorbato peroxidase (E.C. 1.11.1.11)
BRM-32111	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
BRM-32113	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>
CAT	Catalase (E.C. 1.11.1.6)
MDA	Aldeído malônico
PGPR	Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas
R-35	<i>Pseudoruegeria sabulilitoris strain GJMS-35</i>
R-38	<i>Pseudoruegeria sabulilitoris strain GJMS-35</i>
R-58	<i>Bacillus thuringiensis YBT-1518</i>
R-61	<i>Bacillus thuringiensis YBT-1518</i>
R-92	<i>Pseudoruegeria sabulilitoris strain GJMS-35</i>
SOD	Superóxido dismutase (E.C. 1.15.1.1)

RESUMO

O açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma palmeira nativa da Amazônia e de grande interesse econômico no Brasil e no mundo. O Brasil é o maior produtor mundial do fruto de açaí, sendo o estado do Pará o maior produtor nacional. Essa produção era destinada ao consumo local, porém a conquista de novos mercados e o aumento nas exportações estimulou a expansão dos plantios comerciais em terra firme. No entanto, a alta demanda por mudas tem limitado a implantação de plantios comerciais, devido ao crescimento lento, alta sensibilidade ao déficit hídrico e a ocorrência de antracnose causada por *Colletotrichum* sp. O objetivo do estudo foi avaliar a promoção de crescimento, mitigação do déficit hídrico e redução da antracnose por rizobactérias em mudas de açazeiro. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado nas condições de viveiro com mudas de açazeiro inoculadas com as rizobactérias R-35, R-38, BRM-32113, BRM-32111, R-58, R-61 e R-92. Todas rizobactérias promoveram crescimento, acúmulo de biomassa, maior conteúdo de nutrientes e clorofilas, além de melhoria no desempenho fotossintético. As rizobactérias BRM-32113, BRM-32111, R-58 e R-92 foram inoculadas em mudas de açazeiro submetidas ao déficit hídrico. A diminuição do conteúdo de água no solo até 50% da capacidade de campo reduziram o potencial hídrico e o desempenho fotossintético. Porém, a maior atividade das enzimas antioxidantes aliviou os efeitos do déficit hídrico nas mudas de açazeiro inoculadas com as rizobactérias. A infecção de *Colletotrichum* sp. em folhas de mudas de açazeiro alterou a captação de luz e a assimilação de CO₂ no mesófilo, resultando em menor desempenho fotossintético. Porém, quando as mudas de açazeiro foram inoculadas com a rizobactéria R-92, a severidade da antracnose foi reduzida e os danos no aparato fotossintético foram atenuadas. Os resultados revelam que as rizobactérias aceleram o crescimento das mudas de açazeiro, podendo contribuir para diminuir o tempo de obtenção das mudas de qualidade, maior tolerância ao déficit hídrico e maior resistência a antracnose. A aplicação das rizobactérias pode ser utilizada como uma tecnologia limpa para auxiliar no manejo sustentável da produção de mudas de açazeiro em viveiros.

Palavras-chaves: *Euterpe oleracea*, bioestimulante, estresse oxidativo, *Colletotrichum* sp.

ABSTRACT

Açaí palm (*Euterpe oleracea* Mart.) is native to the Amazon and presents great economic interest in Brazil and in the world. Brazil is the world's largest producer of açaí fruit, the state of Pará being the largest national producer. This production was destined for local consumption, but the conquest of new markets and the increase in exports stimulated the expansion of commercial plantations on land. However, the high demand for seedlings has limited the implantation of commercial plantations, due to the slow growth, high sensitivity to the water deficit and the occurrence of anthracnose caused by *Colletotrichum*. The study objective was to evaluate the growth promotion, water deficit mitigation and reduction of anthracnose by rhizobacteria in açaí palm seedlings. The experiment was carried out in a completely randomized design in the nursery conditions with açaí seedlings inoculated with rhizobacteria R-35, R-38, BRM32113, BRM32111, R-58, R-61 and R-92. All rhizobacteria promoted growth, accumulation of biomass, higher content of nutrients and chlorophylls, as well as improvements in photosynthetic performance. The rhizobacteria BRM32113, BRM32111, R-58 and R-92 were inoculated in açaí seedlings submitted to the water deficit. Depletion of soil water up to 50% of field capacity reduced water potential and photosynthetic performance. However, the higher activity of antioxidant enzymes alleviated the effects of water deficit on açaizeiro seedlings inoculated with rhizobacteria. The infection of *Colletotrichum* sp. in leaves of açaí seedlings altered the capture of light and the assimilation of CO₂ in the mesophyll, resulting in lower photosynthetic performance. However, when the açaí seedlings were inoculated with the R-92 rhizobacteria the severity of the anthracnose was reduced and the damages in the photosynthetic apparatus were attenuated. The results show that the rhizobacteria accelerate the growth of the açaí palm seedlings, which can contribute to decrease the time of quality seedlings, greater tolerance to water deficit and greater resistance to anthracnose. The application of rhizobacteria can be used as a clean technology to aid in the sustainable management of the production of açaí palm seedlings in nurseries.

Key words: *Euterpe oleracea*, biostimulant, oxidative stress, *Colletotrichum* sp.

SUMÁRIO

	RESUMO	
	ABSTRACT	
1	CONTEXTUALIZAÇÃO	11
	REFERÊNCIAS	15
2	CRESCIMENTO, TEORES DE NUTRIENTES E DESEMPENHO FOTOSSINTÉTICO EM RESPOSTA A INOCULAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS EM MUDAS DE AÇAIZEIRO	23
	RESUMO	
	ABSTRACT	
2.1	Introdução	25
2.2	Material e Métodos	26
2.3	Resultados	32
2.4	Discussão	40
2.5	Conclusão	44
2.6	Material suplementar	45
	REFERÊNCIAS	46
3	RIZOBACTÉRIAS PROTEGEM O APARATO FOTOSSINTÉTICO E ALIVIAM OS EFEITOS DO DÉFICIT HÍDRICO EM MUDAS DE AÇAIZEIRO	57
	RESUMO	
	ABSTRACT	
3.1	Introdução	59
3.2	Material e Métodos	60
3.3	Resultados	65
3.4	Discussão	53
3.5	Conclusão	71
	REFERÊNCIAS	75
4	ANTHRACNOSE IN AÇAÍ PALM LEAVES REDUCES LEAF GAS EXCHANGE AND CHLOROPHYLL A FLUORESCENCE	79
	ABSTRACT	
	RESUMO	

4.1	Introduction	81
4.2	Material and methods	83
4.3	Results	87
4.4	Discussion	89
4.5	Conclusion	91
	LITERATURE CITED	92
	Tables	96
	Figures	98
5.	RIZOBACTÉRIA REDUZ ANTRACNOSE E PROTEGE O APARATO FOTOSSINTÉTICO EM MUDAS DE AÇAIZEIRO	106
	RESUMO	
	ABSTRACT	
5.1	Introdução	108
5.2	Material e Métodos	109
5.3	Resultados	113
5.4	Discussão	116
5.5	Conclusão	119
	REFERÊNCIAS	120
	CONCLUSÕES GERAIS	125

1. CONTEXTUALIZAÇÃO

O açazeiro (*Euterpe Oleracea* Mart.) é uma palmeira tropical e nativa da região amazônica, destacando-se pela abundância e produção de frutos utilizados na alimentação da população ribeirinha do estado do Pará (OLIVEIRA; CARVALHO, 2000). Os frutos tornaram-se recentemente populares como alimento funcional devido ao seu potencial antioxidante, o que contribui para melhoria da saúde humana (RUFINO et al., 2011). Conseqüentemente, o consumo da fruta aumentou em grande escala, levando a mudança do sistema de produção de açazeiros nativos manejados para plantios comerciais em grandes áreas de terra firme (AZEVEDO; KATO, 2008). Entretanto, o crescimento inicial lento (SILVESTRE et al., 2016), a alta sensibilidade ao déficit hídrico (SILVESTRE et al., 2017) e a ocorrência de antracnose (CASTRO et al., 2017) reduzem a produção de mudas de açazeiro nos viveiros e limitam a expansão dos plantios comerciais em terra firme.

A pouca disponibilidade de sementes e material genético diferenciado limitam a produção de mudas de açazeiro em viveiros (MARTINS-CORDER; SALDANHA, 2006; MARTINS; NAKAGAWA; BOVI, 2009). Atualmente, existem apenas uma cultivar registrada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA): BRS-Pará (nº 11300). Esse cultivar foi obtido pela Embrapa Amazônia Oriental através de três ciclos de seleção massal para produção de frutos e perfilhamento em condições de terra firme (OLIVEIRA; CARVALHO, 2000). Porém, podem ser encontradas no mercado outras variedades e sementes sendo comercializadas, sem origem genética conhecida (ecotipos).

O processo de germinação das sementes de açai é relativamente lento e desuniforme (NASCIMENTO, 2007; SILVA et al., 2007). A emergência das plântulas se inicia por volta de 20 dias após a semeadura e estabiliza-se por volta dos 45 dias (QUEIRÓZ; MOCHIUTTI, 2001). As mudas são consideradas adequadas para condições de campo quando atingem idade entre quatro a oito meses após a semeadura, aspecto vigoroso, cinco folhas fisiologicamente ativas (madura), altura entre 40 e 60 cm, diâmetro do coleto maior que o da extremidade da muda e sistema radicular bem desenvolvido (MAPA, 1997). Entretanto, Souza e Jardim (2007) relatam que mudas de açazeiro com altura inferior a 80 cm apresentam maiores taxas de mortalidade quando transplantadas para condições de campo (SOUSA; JARDIM, 2007). A alta intensidade luminosa, elevadas temperaturas, déficit hídrico e doenças foliares são os principais fatores que contribuem para as menores taxas de sobrevivência das palmeiras de açazeiro em

plantios comerciais em terra firme (NOGUEIRA; CONCEIÇÃO, 2000; OLIVEIRA; NETO, 2004).

A irrigação inadequada em viveiros e a alta sensibilidade das mudas de açazeiro ao déficit hídrico provocam reduções drásticas na produção de mudas (SILVESTRE et al., 2016). O déficit hídrico atua como fator limitante do crescimento das plantas, pois afeta as relações hídricas e ocasiona alterações nos processos fisiológicos (KASIM et al., 2013; BARBOSA et al., 2017). As folhas diminuem a abertura estomática para reduzir a perda de água através da transpiração (MEDRANO et al., 2002), porém, aumentam a resistência à entrada do CO₂ e provocam reduções na fotossíntese líquida (FLEXAS et al., 2012). Em mudas de palma de óleo submetidas ao déficit hídrico, a redução da condutância estomática, taxa fotossintética e transpiração limitaram o crescimento das mudas (SILVA et al., 2017).

Além do déficit hídrico, a antracnose, causada pelo fungo hemibiotrófico *Colletotrichum* sp., é principal doença foliar, provocando perdas de até 70% de mudas de açazeiro em viveiros (CASTRO et al., 2017). Os sintomas nas folhas começam como pequenos pontos de manchas circulares ou elípticas de cor marrom, com área central clara e halo clorótico. Em viveiros, a elevada umidade e temperaturas moderadas favorecem a ocorrência de antracnose em mudas de açazeiro (LEÃO; BOVI; JÚNIOR, 1987). O controle da doença tem sido realizado com a aplicação de fungicidas. No entanto, nenhum fungicida foi registrado no Ministério da Agricultura brasileiro para ser utilizado em mudas de açazeiro (OLIVEIRA; CARVALHO, 2000).

Os patógenos de folhas podem provocar várias alterações fisiológicas no hospedeiro, que podem ocorrer diretamente através da secreção de enzimas líticas e toxinas (DEBONA et al., 2014), ou indiretamente, através de respostas do hospedeiro induzidas pelo patógeno (PINKARD; MOHAMMED, 2006). A fotossíntese é considerada um dos principais motores do crescimento e desenvolvimento das culturas e um dos processos fisiológicos mais afetados por patógenos foliares (TATAGIBA; DAMATTA; RODRIGUES, 2015). Muitos estudos (RESENDE; RODRIGUES; CAVATTE, 2012; DEBONA et al., 2014) demonstraram uma diminuição na taxa fotossintética e alterações no aparelho fotossintético causadas pela infecção por patógenos. Essas alterações podem ser devidas a uma baixa regulação ou danos ao aparelho fotossintético (ALVES; GUIMARAES, 2011).

Várias estratégias têm sido utilizadas para controlar os efeitos negativos dos estresse bióticos e abióticos, tais como a criação de variedades mais tolerantes e a engenharia genética (KASIM et al., 2013). Contudo, a pouca disponibilidade de sementes

e material genético diferenciado dificultam a obtenção de novas variedades de açaizeiro mais tolerantes. Uma estratégia alternativa para induzir tolerância aos estresses pode ser o uso das bactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPR), pois são benéficas para o crescimento das plantas e induzem o aumento de tolerância aos estresses bióticos e abióticos (YUWONO; HANDAYANI; SOEDARSONO, 2005; GOU et al., 2015; LUCAS et al., 2014; GONTIA-MISHRA et al., 2016). As PGPR são encontradas em vida livre no solo e podem promover benefícios para a planta através da colonização das raízes (HALDAR; SENGUPTA, 2015). Os benefícios incluem, principalmente, maior reciclagem, solubilização e absorção de nutrientes minerais, síntese de vitaminas, aminoácidos, sideróforos e hormônios promotores do crescimento de plantas, como giberelina, auxina e citocinina (VAN LOON, 2007; GLICK, 2012; CHAUDHARY; SINDHU, 2016).

As PGPR podem induzir alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas que são favoráveis a redução do impacto negativo dos estresses (WANG et al., 2014). O maior sistema radicular induzido pelas PGPR melhora a absorção de água e nutrientes e, conseqüentemente, amenizam os efeitos negativos dos estresses biótico e abiótico (SARAVANAKUMAR et al., 2011). O maior sistema radicular em mudas de açaizeiro é uma estratégia de tolerância ao déficit hídrico e pode contribuir para a adaptação das mudas durante os meses mais secos (SILVESTRE et al., 2016).

Estudos relatam que plantas inoculadas com PGPR são mais tolerantes ao déficit hídrico porque estimulam a regulação estomática para manter altos níveis do potencial hídrico nas folhas. As PGPR induzem alterações coordenadas na transpiração, conteúdo de ácido abscísico (ABA) e fotossíntese, resultando em maior eficiência do uso da água em plantas submetidas ao déficit hídrico (BRESSON et al., 2013). Outros benefícios induzidos pelas PGPR envolvem a mitigação do estresse osmótico através da produção de metabólitos osmoprotetores como betaínas, prolina e trealose, e a proteção contra o estresse oxidativo provocado pelas espécies reativas de oxigênio através das enzimas antioxidantes como dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) (FORNI; DUCA; GLICK, 2016). A maior proteção do aparato fotossintético, proporcionado pelas enzimas antioxidantes, influenciam na manutenção do maior desempenho fotossintético em plantas submetidas ao déficit hídrico (GAGNÉ-BOURQUE et al., 2016).

Outros estudos relatam que plantas inoculadas com PGPR são mais tolerantes a doenças porque são capazes de desencadear o seu metabolismo defensivo de forma preventiva, um estado fisiológico denominado de priming, onde as plantas mostram

ativação mais rápida e mais forte das respostas de defesa quando desafiadas com patógenos (ZHANG; REDDY; KLOEPPER, 2004; BARRIUSO; SOLANO; GUTIÉRREZ MAÑERO, 2008; CONRATH, 2011). As PGPR são capazes de preparar as plantas modificando as condições metabólicas, o que altera a distribuição de recursos energéticos comprometendo o crescimento das plantas em favor de um metabolismo secundário mais ativo envolvido na defesa (LUCAS et al., 2014). Em plantas de arroz infectadas com *Magnaporthe oryzae*, ocorreu indução de maior atividade das enzimas de defesa pelas PGPR, como peroxidase, quitinase e beta-1,3-glucoamilase, contribuindo para a redução da severidade da brusone (FILIPPI et al., 2011).

Sabendo que a inoculação das PGPR pode promover o crescimento, aliviar os efeitos déficit hídrico e reduzir a severidade de antracnose, o objetivo do estudo foi avaliar o crescimento, alterações no desempenho fotossintético e estresse oxidativo provocados pelo déficit hídrico e a severidade de *Colletotrichum* sp. em mudas de açaizeiro inoculadas com rizobactérias.

REFERÊNCIAS

- ALVES, A.; GUIMARAES, L. DA S. Leaf gas exchange and chlorophyll a fluorescence of *Eucalyptus urophylla* in response to *Puccinia psidii* infection. **Acta physiologiae**, 2011.
- AZEVEDO, J. R. D. R. DE; KATO, O. R. R. Sistema de manejo de açaiçais nativos praticados por ribeirinhos das ilhas de Paquetá e ilha Grande, Belém, Pará. **VII Encontro da Sociedade Brasileira de Sistemas de Produção**, n. 1985, p. 15, 2008.
- BARBOSA, M. et al. Antioxidant system is insufficient to prevent cell damages in *Euterpe oleracea* exposed to water deficit. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 29, n. 3, p. 206, 2017.
- BARRIUSO, J.; SOLANO, B. R.; GUTIÉRREZ MAÑERO, F. J. Protection Against Pathogen and Salt Stress by Four Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Isolated from *Pinus* sp. on *Arabidopsis thaliana*. **Phytopathology**, v. 98, n. 6, p. 666–672, 2008.
- BRESSON, J. et al. The PGPR strain *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 induces a reproductive delay and physiological changes that result in improved drought tolerance in *Arabidopsis*. **New Phytologist**, v. 200, n. 2, p. 558–569, 2013.
- CASTRO, G. L. S. et al. Anthracnose in açai palm leaves reduces leaf gas exchange and chlorophyll a fluorescence. **Tropical Plant Pathology**, v. 42, n. 1, p. 13–20, 2017.
- CHAUDHARY, S. R.; SINDHU, S. S. Growth stimulation of clusterbean (*Cyamopsis tetragonoloba*) by coinoculation with rhizosphere bacteria and *Rhizobium*. **Legume Research - An International Journal**, v. 39, n. OF, p. 1003–1012, 2016.
- CONRATH, U. Molecular aspects of defence priming. **Trends in Plant Science**, v. 16, n. 10, p. 524–531, 2011.
- DEBONA, D. et al. Limitations to Photosynthesis in Leaves of Wheat Plants Infected by *Pyricularia oryzae*. **Phytopathology**, v. 104, n. 1, p. 34–39, jan. 2014.
- FILIPPI, M. C. C. et al. Leaf blast (*Magnaporthe oryzae*) suppression and growth promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil. **Biological Control**, v. 58, n. 2, p. 160–166, 2011.
- FLEXAS, J. et al. Mesophyll diffusion conductance to CO₂: An unappreciated central player in photosynthesis. **Plant Science**, v. 193–194, p. 70–84, 2012.
- FORNI, C.; DUCA, D.; GLICK, B. R. Mechanisms of plant response to salt and drought stress and their alteration by rhizobacteria. **Plant and Soil**, p. 1–22, 2016.
- GAGNÉ-BOURQUE, F. et al. Alleviation of Drought Stress and Metabolic Changes in Timothy (*Phleum pratense* L.) Colonized with *Bacillus subtilis* B26. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. May, p. 1–16, 2016.
- GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 1–15, 2012.
- GONTIA-MISHRA, I. et al. Amelioration of drought tolerance in wheat by the interaction of plant growth promoting rhizobacteria. **Plant Biology**, v. 18, p. 992–1000, 2016.
- GOU, W. et al. Accumulation of choline and glycinebetaine and drought stress tolerance

- induced in maize (*Zea mays*) by three plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) strains. **Pakistan Journal of Botany**, v. 47, n. 2, p. 581–586, 2015.
- HALDAR, S.; SENGUPTA, S. Plant-microbe Cross-talk in the Rhizosphere: Insight and Biotechnological Potential. **The Open Microbiology Journal**, v. 9, n. iii, p. 1–7, 2015.
- KASIM, W. A. et al. Control of Drought Stress in Wheat Using Plant-Growth-Promoting Bacteria. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 32, n. 1, p. 122–130, 2013.
- LEÃO, M.; BOVI, A.; JÚNIOR, G. G. Híbridos interespecíficos de palmiteira (*Euterpe oleracea* x *Euterpe edulis*). **Bragantia**, v. 46, n. 2, p. 343–363, 1987.
- LUCAS, J. A. et al. Beneficial rhizobacteria from rice rhizosphere confers high protection against biotic and abiotic stress inducing systemic resistance in rice seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 82, p. 44–53, 2014.
- MARTINS-CORDER, M. P.; SALDANHA, C. W. Germinação de sementes e crescimento de plântulas de diferentes progênies de *Euterpe edulis* Mart. **Revista Árvore**, v. 30, n. 5, p. 693–699, 2006.
- MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J.; BOVI, M. L. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de açaí. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 1, p. 231–235, 2009.
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Delegacia Federal de Agricultura no Pará. Comissão Estadual de Sementes e Mudas do Pará. **Normas técnicas e padrões para a produção de mudas fiscalizadas no Estado de Pará**. Belém, 1997. 40p.
- MEDRANO, H. et al. Regulation of photosynthesis of C3 plants in response to progressive drought: Stomatal conductance as a reference parameter. **Annals of Botany**, v. 89, n. SPEC. ISS., p. 895–905, 2002.
- NASCIMENTO, W. Conseqüências fisiológicas da dessecação em sementes de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). **Revista Brasileira de**, 2007.
- NOGUEIRA, O.; CONCEIÇÃO, H. Análise de crescimento de açaizeiros em áreas de várzea do estuário amazônico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 2000.
- OLIVEIRA, M.; CARVALHO, J. Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). 2000.
- OLIVEIRA, M. D. S. P.; NETO, J. T. D. F. Cultivar BRS-Pará: Açaizeiro para Produção de Frutos em Terra Firme. **Embrapa, Comunicado Técnico**, v. 114, n. 1, p. 1–3, 2004.
- PINKARD, E. A.; MOHAMMED, C. L. Photosynthesis of *Eucalyptus globulus* with *Mycosphaerella* leaf disease. **New Phytologist**, v. 170, n. 1, p. 119–127, mar. 2006.
- QUEIRÓZ, J. DE; MOCHIUTTI, S. Produção de mudas de açaí. **Embrapa Amapá**, 2001.
- RESENDE, R.; RODRIGUES, F.; CAVATTE, P. Leaf gas exchange and oxidative stress in sorghum plants supplied with silicon and infected by *Colletotrichum sublineolum*. 2012.
- RUFINO, M. DO S. M. et al. Açaí (*Euterpe oleracea*) “BRS Pará”: A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2100–2106, ago. 2011.
- SARAVANAKUMAR, D. et al. Plant growth promoting bacteria enhance water stress resistance in green gram plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, n. 1, p. 203–209, 2011.

SILVA, B. M. S. et al. Influência da posição e da profundidade de semeadura na emergência de plântulas de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.-Arecaceae). **Rev. Bras. Frutic**, p. 187–190, 2007.

SILVA, P. A. et al. Drought tolerance in two oil palm hybrids as related to adjustments in carbon metabolism and vegetative growth. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 2, p. 58, 2017.

SILVESTRE, W. V. D. et al. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental Morphological and physiological responses of açaí seedlings subjected to different watering regimes Respostas morfológicas e fisiológicas de mudas de açazeiros submetidas à diferentes regimes hídricos. p. 364–371, 2016.

SILVESTRE, W. V. D. et al. Differential tolerance to water deficit in two açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) plant materials. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 1, p. 4, 2017.

SOUSA, L. DE; JARDIM, M. Produção foliar de mudas de açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) em área de vegetação secundária no nordeste paraense. **Revista Brasileira de Biociências**, 2007.

TATAGIBA, S.; DAMATTA, F.; RODRIGUES, F. Leaf gas exchange and chlorophyll a fluorescence imaging of rice leaves infected with *Monographella albescens*. **Phytopathology**, 2015.

VAN LOON, L. C. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. **European Journal of Plant Pathology**, v. 119, n. 3, p. 243–254, 5 nov. 2007.

WANG, S. et al. Survey of Plant Drought-Resistance Promoting Bacteria from *Populus euphratica* Tree Living in Arid Area. **Indian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 419–426, 2014.

YUWONO, T.; HANDAYANI, D.; SOEDARSONO, J. The role of osmotolerant rhizobacteria in rice growth under different drought conditions. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 56, n. 7, p. 715–721, 2005.

ZHANG, S.; REDDY, M. S.; KLOEPPER, J. W. Tobacco growth enhancement and blue mold disease protection by rhizobacteria: Relationship between plant growth promotion and systemic disease protection by PGPR strain 90-166. **Plant and Soil**, v. 262, n. 1–2, p. 277–288, 2004.

**CAPÍTULO 2. CRESCIMENTO, TEORES DE NUTRIENTES E DESEMPENHO
FOTOSSINTÉTICO EM RESPOSTA A INOCULAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS
EM MUDAS DE AÇAIZEIRO**

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA	Ácido indolacético
ACC	1-Aminociclopropano-1-Carboxilato
A/E	Eficiência instantânea do uso da água
A	Taxa de assimilação líquida de CO ₂
ATP	Adenosina trifosfato
BRM-32111	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
BRM-32113	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>
Ca	Cálcio
C _i	Concentração intercelular de CO ₂
Chl _a	Clorofila <i>a</i>
Chl _b	Clorofila <i>b</i>
Chl _{a+b}	Clorofila <i>a</i> + clorofila <i>b</i>
Chl _a /Chl _b	Razão entre clorofila <i>a</i> e clorofila <i>b</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPV	Déficit de pressão de vapor do ar
E	Taxa de transpiração
ETR	Taxa de transporte de eletrons
F _o	Fluorescência inicial
F _m	Fluorescência máxima
F _v '/F _m '	Eficiência fotoquímica efetiva
F _v /F _o	Atividade potencial do fotossistema II
g _s	Condutância estomática ao vapor d'água
K	Potássio
Mg	Magnésio
N	Nitrogênio
P	Fósforo
PAR	Radiação fotossinteticamente ativa
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Priming	Estado fisiológico induzido pela rizobactéria
Quorum sense	Densidade população de rizobactérias
qP	Coefficiente de dissipação fotoquímica
qN	Coefficiente de dissipação não fotoquímica
R-35	<i>Pseudoruegeria sabulilitoris strain</i> GJMS-35
R-38	<i>Pseudoruegeria sabulilitoris strain</i> GJMS-35
R-58	<i>Bacillus thuringiensis</i> YBT-1518
R-61	<i>Bacillus thuringiensis</i> YBT-1518
R-92	<i>Pseudoruegeria sabulilitoris strain</i> GJMS-35
SNK	Student-Newman-Keuls
UFC	Unidade Formadora de Colônia

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Aspecto visual da parte aérea das mudas de açaizeiro (cinco meses de idade) inoculadas com rizobactérias: R-35 (A), R-38 (B), R-58 (C); R-61 (D); BRM32111 (E), BRM32113 (F) e R-92 (G) em relação ao controle - C. Figura elaborada pelo autor a partir de imagens registradas por Rinaldo Viana, 2018.
- Figura 2.** Aspecto visual das raízes das mudas de açaizeiro (cinco meses de idade) inoculadas com rizobactérias: R-35, R-38, R-58; R-61; R-92; BRM32111 e BRM32113 em relação ao controle - C. Figura elaborada pelo autor a partir de imagens registradas por Gisele Silva, 2017.
- Figura 3.** Árvore filogenética para as sequencias parciais do gene 16S rRNA mostrando as relações entre as rizobactérias deste estudo e gêneros relacionados. Os números do banco de acesso da base de dados são indicados após os nomes bacterianos.
- Figura 4.** [A] Taxa de assimilação líquida de CO₂ (A), [B] condutância estomática ao vapor de água (g_s) [C] transpiração (E), [D] concentração intercelular de CO₂ (C_i) e [E] eficiência instantânea do uso da água (A/E) em mudas de açaizeiro (cinco meses) inoculadas com rizobactérias: grupo 1 (controle – sem rizobactéria), grupo 2 (R-35, R-38, R-58, R-61, BRM-32111 e R-92) e grupo 3 (BRM-32113). As médias foram comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$)
- Figura 5.** [A] Taxa de assimilação líquida de CO₂ total (A_{total}) e [B] transpiração total (E_{total}) em mudas de açaizeiro (cinco meses) inoculadas com rizobactérias: grupo 1 (controle – sem rizobactéria), grupo 2 (R-35, R-38, R-58, R-61, BRM-32111 e R-92) e grupo 3 (BRM-32113). As médias foram comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$)
- Figura 6.** [A] Teores de clorofila *a* (Chl_a), [B] clorofila *b* (Chl_b), [C] clorofila *a* + clorofila *b* (Chl_{a+b}) e [D] razão entre Chl_a e Chl_b (Chl_a/Chl_b) em folhas de mudas de açaizeiro (cinco meses de idade) inoculadas com rizobactérias: grupo 1 (controle – sem rizobactéria), grupo 2 (R-35, R-38, R-58, R-61, BRM-32111 e R-92) e grupo 3 (BRM-32113). As médias foram comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$)
- Figura 7.** [A] Teores totais de clorofila *a* ($Chl_{a\ total}$), [B] clorofila *b* ($Chl_{b\ total}$), [C] clorofila *a* total+ clorofila *b* total ($Chl_{a+b\ totais}$) e [D] razão entre Chl_a e Chl_b totais ($Chl_{a\ total}/Chl_{b\ total}$) em folhas de mudas de açaizeiro (cinco meses de idade) inoculadas com rizobactérias: grupo 1 (controle – sem rizobactéria), grupo 2 (R-35, R-38, R-58, R-61, BRM-32111 e R-92) e grupo 3 (BRM-32113). As médias foram comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$).

Figura 8. [A] Fluorescência inicial (F_o), [B] Fluorescência máxima (F_m), [C] atividade potencial do PSII (F_v/F_o), [D] eficiência fotoquímica efetiva do PSII (F_v'/F_m'), [E] coeficientes de extinção fotoquímica (q_p) e [F] não fotoquímica (q_N), e [G] taxa de transferência de elétrons (ETR) em folhas de mudas de açaizeiro (Cinco meses de idade) inoculadas com rizobactérias: grupo 1 (controle – sem rizobactéria), grupo 2 (R-35, R-38, R-58, R-61, BRM 32111 e R-92) e grupo 3 (BRM 32113). As médias foram comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$).

Figura complementar. Relação entre os valores de SPAD e os teores de clorofila a (Chl_a), clorofila b (Chl_b), clorofila a mais clorofila b (Chl_{a+b}) e razão Chl_a/Chl_b por unidade de área em folhas de mudas de açaizeiro. Cada ponto representa a média de seis leituras por folha.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Biometria e biomassa em mudas de açaizeiro (cinco meses de idade) inoculadas com rizobactérias: R-35, R-38, R-58, R-61, R-92, BRM-32111 e BRM-32113.
- Tabela 2.** Caracterização molecular dos isolados através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA (fragmentos de aproximadamente 400-500 pares de bases).
- Tabela 3.** Teores de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) em folhas de mudas de açaizeiro sem inoculação (grupo 1) e com inoculação das rizobactérias (grupo 2 e 3).
- Tabela complementar.** Código de identificação, origem, cor, características bioquímicas e classificação taxonômica dos sete isolados de rizobactérias inoculados nas mudas de açaizeiro.

1 **2. CRESCIMENTO, TEORES DE NUTRIENTES E DESEMPENHO**
2 **FOTOSSINTÉTICO EM RESPOSTA A INOCULAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS**
3 **EM MUDAS DE AÇAIZEIRO***

4
5 ***Artigo 1: Normas da revista Environmental microbiology reports**

6
7 **RESUMO**

8 O crescimento lento e o menor vigor das mudas de açaizeiro limitam a expansão dos
9 plantios comerciais. O objetivo do estudo foi avaliar a biometria, acúmulo de biomassa,
10 teores de nutrientes, fluorescência da clorofila *a* e trocas gasosas em mudas açaizeiro
11 inoculadas com rizobactérias. Os tratamentos consistiam das inoculações individuais dos
12 oito isolados de rizobactérias e um controle (sem inoculação) nas raízes das mudas de
13 açaizeiro. Os dados de biometria e biomassa foram submetidos a análise de agrupamento
14 para separar os isolados em grupos conforme o grau de similaridade, e as médias dos
15 grupos foram comparadas pelo teste SNK ($P < 0,05$). Três grupos foram formados, sendo
16 o grupo 1 composto pelo controle, o grupo 2 composto pelos isolados R-35, R-38, R-58,
17 R-61, R-92 e BRM-32111, e o grupo 3 composto pelo isolado BRM-32113. Os isolados
18 dos grupos 2 e 3 promoveram aumento no crescimento, acúmulo de biomassa, maiores
19 teores de nutrientes e clorofilas, e melhoria nos parâmetros de trocas gasosas e
20 fluorescência da clorofila *a* em comparação ao controle. Os resultados evidenciam que as
21 rizobactérias aceleram o crescimento, aumentam a eficiência fotossintética e induzem o
22 acúmulo de nutrientes foliar em mudas de açaizeiro. A inoculação das rizobactérias pode
23 contribuir para o manejo sustentável da produção de mudas de açaizeiro em viveiros.

24
25 **Palavras-chave:** *Euterpe Oleracea*, bioestimulantes, nutrientes, fotossíntese

26
27
28
29
30
31
32
33

34 **GROWTH, NUTRIENT CONTENTS AND PHOTOSYNTHETIC**
35 **PERFORMANCE IN RESPONSE TO INOCULATION RIZOBACTERIA IN**
36 **AÇAÍ PALM SEEDLINGS**

37

38 **ABSTRACT**

39 The slow growth and the loss vigor of the açai palm seedlings limit the expansion of
40 commercial plantations. The objective of this study was to evaluate the biometry,
41 accumulation of biomass, nutrient contents, chlorophyll a fluorescence and gas exchange
42 in açazeiro seedlings inoculated with rhizobacteria. The treatments consisted of
43 individual inoculations of eight rhizobacterial isolates and a control (not inoculation) in
44 roots of açai seedlings. Biometry and biomass data were submitted to cluster analysis to
45 separate the isolates into classes according to the degree of similarity, and the means of
46 the groups were compared by the SNK test ($P < 0,05$). Three classes were formed, where
47 class 1 consisting of the control, class 2 composed of the isolates R-35, R-38, R-58, R-
48 61, R-92 and BRM-32111, and the classes 3 composed of the isolate BRM-32113. The
49 isolates of classe-2 and 3 promoted increase in growth, biomass accumulation, nutrients
50 and chlorophylls levels higher, and improvements in the parameters of gas exchange and
51 chlorophyll *a* fluorescence in relation to control. The results evidenced that the
52 rhizobacteria accelerate the growth, increase the photosynthetic efficiency and induce the
53 accumulation of leaf nutrients in açai palm seedlings.

54

55 **Key words:** *Euterpe Oleracea*, biostimulants, nutrients, photosynthesis

56

57

58

59

60

61

62

63

64

65 2.1 Introdução

66 O açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma palmeira nativa da região amazônica
67 e distribuída ao longo das margens do rio Amazonas no norte do Brasil (Yamaguchi et al.
68 2015). A demanda nacional e internacional pela fruta na última década, devido aos
69 benefícios nutricionais (Cantu-Jungles et al. 2017), estimulou a mudança do sistema de
70 produção extrativista para plantios comerciais em grandes áreas em terra firme (Oliveira
71 and Neto 2004). A produção de mudas aumentou e tem como fatores limitante, o
72 crescimento inicial lento, menor vigor das mudas e a baixa disponibilidade de material
73 genético diferenciado (Costa et al. 2004).

74 Vários estudos relatam a utilização das rizobactérias para promover o crescimento
75 de mudas de palmeiras, como palma de óleo (Om et al. 2009) e coco (George et al. 2013).
76 As rizobactérias são encontradas em vida livre do solo e podem promover benefícios à
77 planta através da colonização do sistema radicular (Haldar and Sengupta 2015). Os
78 benefícios incluem maior reciclagem, solubilização e absorção de nutrientes minerais,
79 síntese de vitaminas, aminoácidos, sideróforos e hormônios promotores do crescimento
80 de plantas, como giberelina, auxina e citocinina (Van Loon 2007; Glick 2012; Chaudhary
81 and Sindhu 2016).

82 As auxinas são responsáveis pela indução do crescimento das raízes primárias e
83 secundárias, como observado em mudas de palma de óleo inoculadas com rizobactérias
84 (Noor Ai'shah et al. 2013; Astriani et al. 2016). Em arroz, as rizobactérias BRM32111 e
85 BRM32113 promoveram o crescimento de parte aérea e raízes (Filippi et al. 2011). Para
86 Aslantaş et al. (2007), o maior crescimento radicular pode ser atribuído a capacidade das
87 rizobactérias de sintetizar a enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC)
88 desaminase, a qual diminui os níveis do hormônio etileno que atua como inibidor do
89 crescimento.

90 O maior sistema radicular aumenta a área de contato das raízes com o solo e
91 melhora a absorção de água e nutrientes (Asari et al. 2016). Em mudas de palma de óleo
92 inoculadas com rizobactérias, o sistema radicular expandido melhora a eficiência de
93 absorção de nitrogênio, fósforo e potássio e, influencia no incremento da altura e
94 biomassa da parte aérea (Amir et al. 2005). As rizobactérias induzem a síntese de
95 giberelinas para direcionar a utilização dos nutrientes e, conseqüentemente, acúmulo de
96 biomassa da parte aérea, como observado em mudas de tomate inoculadas com
97 rizobactérias (Chauhan et al. 2015).

98 O maior crescimento da parte aérea inclui maior número de folhas e expansão da
99 aérea foliar, o qual contribui para maior captação de luz e assimilação de CO₂ (Zhang et

100 al. 2017). O melhor desempenho fotossintético, resultantes da inoculação das
101 rizobactérias, podem ser mensurados através das avaliações de trocas gasosas e
102 fluorescência da clorofila *a*. As trocas gasosas indicam a eficiência na regulação da
103 abertura estomática que influenciam diretamente na assimilação do CO₂ (Nascente et al.
104 2016), enquanto que os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* indicam a eficiência
105 da utilização da luz nos processos fotoquímicos da fotossíntese (Maxwell and Johnson
106 2000).

107 Mudas de açaizeiro inoculadas com rizobactérias podem acelerar o crescimento e
108 diminuir o tempo para obtenção das mudas em viveiros, contribuindo para aumentar o
109 vigor e diminuir a taxa de mortalidade das plantas no campo. O objetivo do estudo foi
110 avaliar a biometria, acúmulo de biomassa, teores de nutrientes, fluorescência da clorofila
111 *a* e trocas gasosas em folhas de mudas de açaizeiro inoculadas com rizobactérias. Os
112 benefícios induzidos pelas rizobactérias podem contribuir para o manejo sustentáveis da
113 produção de mudas de açaizeiro em viveiros.

114

115 **2.2 Materiais e métodos**

116 **Crescimento das plantas**

117 Sementes de açaizeiro (cultivar BRS-Pará) foram semeadas em bandejas de
118 plástico contendo 2,5 L de substrato composto de fibra de coco triturada (Golden mix).
119 Aos 32 dias após a germinação, as plântulas que apresentaram duas folhas expandidas e
120 altura próxima de 13 cm foram transplantadas para sacos de plástico (15 x 25 cm,
121 comprimento x altura) contendo substrato composto de 60% de Latossolo e 40% de cama
122 de aviário curtida. O cultivo foi realizado no viveiro da Universidade Federal Rural da
123 Amazônia em Belém, PA, que apresenta características climáticas do tipo AMI de acordo
124 com a classificação de Koppen-Geiger. Durante o período experimental (agosto a
125 dezembro de 2016) as condições ambientais foram de 32 ± 2 °C de temperatura do ar, 75
126 $\pm 5\%$ de umidade relativa, $2 \pm 0,2$ kPa de DPV do ar e 800 ± 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiação
127 incidente. O pH do substrato e as concentrações de macro e micronutrientes foram
128 ajustadas conforme recomendado para açaizeiros (Silva Cravo et al. 2007). As plantas
129 foram irrigadas diariamente por gotejamento autocompensante para repor a água perdida
130 pela evapotranspiração e manter a umidade do solo próximo da capacidade de campo
131 (Klar et al. 1966).

132

133

134

135 **Caracterização das rizobactérias**

136 As rizobactérias provenientes de açazeiros (R-35, R-38, R-58, R-61 e R-92) e
137 plantas de arroz (BRM-32111 e BRM32-113) estão descritas na tabela suplementar, e
138 estão armazenadas e preservadas na coleção de microrganismos do Laboratório de
139 Proteção de Plantas da Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, PA, Brasil.

140

141 **Identificação molecular das rizobactérias provenientes de açazeiro**

142 *Extração do DNA bacteriano*

143 A extração do DNA genômico foi realizada conforme descrito por Li & Bouer
144 (1995). Os isolados das rizobactérias foram cultivadas em meio sólido 523, por 48 horas.
145 A suspensão bacteriana foi preparada com 4 mL de água destilada estéril. Em seguida, 2
146 mL da suspensão bacteriana foi transferido para um microtubo e centrifugado a 13000
147 rpm durante 5 min. O sobrenadante foi descartado e a massa bacteriana precipitada foi
148 lavada duas vezes através da adição 1 mL de água destilada estéril e centrifugação a
149 13.000 rpm por 5 min. O pellet foi congelado a -20°C por uma hora. Após esse período
150 foram descongeladas a temperatura ambiente e em seguida adicionado 100 µL de acetona
151 pura, sendo homogeneizadas e mantidas a temperatura ambiente por 10 min. O pellet foi
152 ressuscitado em 500µL de tampão de extração TE (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA,
153 pH 8.0) + 50 µL de 500 mM EDTA pH 8,0 + 50 µL de dodecyl sulfato de sódio SDS a
154 14% + 10 µL de proteinase K (0,1%). Foram homogeneizadas novamente e incubadas
155 por 1 hora a 55°C. Em seguida adicionou-se (~700 µL) de acetato de amônio (7,5 M),
156 homogeneizado e centrifugado a 13.000 rpm por 20 min. O sobrenadante, cerca de 800
157 µL, foi transferido para um microtubo e adicionado 540 µL de isopropanol,
158 homogeneizado e precipitado a -20°C por 1 hora, e em seguida, foi centrifugado a 13.000
159 rpm, por 30 min a 4°C. A limpeza do DNA foi realizada com adição de etanol 70%
160 (gelado) ao pellet seguido de centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante
161 foi descartado e as amostras submetidas a secagem por 40 minutos a 1 h. O DNA foi
162 ressuscitado em 50 µL de tampão TE. O DNA extraído foi quantificado utilizando
163 fluorômetro (Qubit 4 Fluorometer).

164

165 *Ampliação do gene 16S*

166 O gene 16S rRNA foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR)
167 com os primers 515F (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) e 806R
168 (GGACTACHVGGGTWTCTAAT) (Apprill et al., 2015). As ampliações do gene 16S
169 rRNA por PCR foram feitas em volume final de 50 µL contendo: 2µL de DNA (~25µM);

170 1,5 µL primer Forward (25µM); 1,5 µL primer Reverse (25µM) 5 µL de Buffer 10X; 1
171 µL de DNTp (10mM); 3 µL de MgCl₂ (50mM); 0,25 µL TAp e 35,75 µL água MilliQ.
172 As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador (Applied Biosystems,
173 Veriti) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguido por 35
174 ciclos de 45s de desnaturação a 94°C, 30s de anelamento a 50°C e 1min e 30s de extensão
175 a 72°C. Uma extensão final foi incorporada por 10 minutos a 72°C ao final dos 35 ciclos.
176 O conteúdo das reações (5 µL) foi homogeneizado com tampão BlueJuice (3 µL) e
177 submetido à eletroforese, em gel de agarose 1% (p/v). A corrida eletroforética foi
178 realizada em tampão TBE 1X, à 120 V por 40 min. Após a corrida, as bandas do gel foram
179 visualizadas em Transiluminador e as imagens capturadas através do software Quantity
180 One (Bio-Rad).

181

182 *Sequenciamento e análise das sequencias*

183 O sequenciamento foi realizado pela empresa Myleus Biotechnology
184 (www.myleus.com). As mostras foram sequenciadas por eletroforese capilar em aparelho
185 ABI3730, utilizando polímero POP7 e BigDye v3.1. As sequências de DNA foram
186 analisadas utilizando-se o programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool -
187 versão 2.215 do BLAST 2.0) disponível no portal NCBI
188 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) desenvolvido pelo National Center For
189 Biotechnology Information. As bases de baixa qualidade das sequencias foram removidas
190 com o auxílio do programa BioEdit Sequence Alignment Editor. A construção e
191 visualização da árvore filogenética foi realizada no programa Mega 7. Para cálculo da
192 significância estatística da similaridade entre as sequencias foi utilizada uma re-
193 amostragem para 1000 replicações. O método de distância UPGMA foi usado na
194 construção da árvore filogenética.

195

196 **Inoculação das rizobactérias**

197 As rizobactérias foram cultivadas em meio sólido 523 (Kado and Heskett 1970)
198 durante 48 h, a 28 °C. As suspensões bacterianas foram preparadas com água destilada e
199 esterilizada, e a concentração foi ajustada em espectrofotômetro para A₅₄₀ = 0,5 (10⁸
200 UFC). As plântulas tiveram suas raízes seccionadas para padronização do comprimento
201 radicular em 7 cm e, antes do transplante para os sacos plásticos com o substrato, foram
202 imersas em 500 mL de cada suspensão bacteriana durante 20 min. As plântulas controle
203 foram imersas em água destilada e esterilizada. Em seguida, foi realizada uma irrigação
204 por semana durante um mês com 50 mL/plântula de cada suspensão bacteriana para

205 plantas tratadas, e com 50 mL/plântula de água destilada e esterilizada para as plantas
206 controle. Após esse período, foi mantida uma irrigação a cada mês até o terceiro mês de
207 idade das mudas de açaizeiro.

208

209 **Avaliação do crescimento e biomassa**

210 A promoção do crescimento e acúmulo de biomassa foram avaliados aos cinco
211 meses após a germinação das sementes. A altura das plantas e o comprimento radicular
212 foram mensurados com régua metálica graduada, enquanto o diâmetro do coleto foi
213 mensurado com paquímetro digital (precisão de 0,02 mm). O índice de robustez foi
214 calculado pela razão entre a altura da planta e diâmetro do coleto. O número de folhas foi
215 avaliado através da contagem direta das folhas emitidas e a área foliar total foi estimada
216 pela massa seca dos discos foliares de 7 mm de diâmetro (6 discos por folha). As mudas
217 foram seccionadas em raiz, limbo foliar e parte aérea e secas em estufa de ventilação
218 forçada a 65 °C, até peso constante, para pesagem e determinação da biomassa seca
219 (Benincasa 1988).

220

221 **Trocas gasosas**

222 Os parâmetros de trocas gasosas foram estimados na segunda folha
223 fisiologicamente madura e completamente expandida, do ápice para a base, aos cinco
224 meses após a inoculadas das rizobactérias nas mudas de açaizeiro. A assimilação líquida
225 de CO₂ (A), condutância estomática ao vapor de água (g_s), concentração intercelular de
226 CO₂ (C_i) e a taxa de transpiração (E) foram estimadas entre 08:00 e 10:00 horas usando
227 um sistema portátil de fluxo aberto de trocas gasosas (LI-6400XT, LI-COR, Lincoln, NE)
228 sob uma concentração externa de CO₂ de 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ de ar e radiação
229 fotossinteticamente ativa (PAR) artificial de 900 $\mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Esse intervalo de
230 medição (08:00 - 10:00 h) foi ajustado de acordo com os resultados obtidos com curva
231 diurna de trocas gasosas para a espécie (Silvestre et al. 2016). A eficiência instantânea do
232 uso da água foi estimada pela razão A/E . Todas as medições foram realizadas sob
233 temperatura do ar de $31 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar de $63 \pm 2\%$, radiação incidente de
234 $600 \pm 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e déficit de pressão de vapor do ar de $1,9 \pm 0,2\text{kPa}$. A quantidade
235 de luz azul foi ajustada para 10% da radiação fotossinteticamente ativa para otimizar a
236 abertura estomática.

237

238 **Fluorescência da clorofila *a***

239 A fluorescência da clorofila *a* foi determinada simultaneamente com as trocas
 240 gasosas utilizando-se uma câmara de fluorescência (IG 6400-40; LI-COR Inc.) integrada
 241 ao sistema portátil de fluxo aberto de trocas gasosas. As folhas foram adaptadas ao escuro
 242 durante 20 min, e posteriormente, iluminadas com um pulso de luz fraca e modulada ($0,03$
 243 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para obter a fluorescência inicial (F_o). Um pulso saturante de luz branca de
 244 $6000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi aplicado durante 0,8 s para garantir a máxima emissão de
 245 fluorescência (F_m). As folhas amostradas foram então iluminadas durante 300 s com uma
 246 luz actínia ($250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para obter o rendimento da fluorescência no estado
 247 estacionário (F_s). Posteriormente, pulsos saturantes de luz branca foram aplicados para
 248 atingir a fluorescência máxima (F_m'). A luz actínia foi então desligada e uma iluminação
 249 vermelho-distante ($2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foi aplicada para estimar a fluorescência inicial
 250 adaptada à luz (F_o'). A partir dessas medições, os seguintes parâmetros foram calculadas:
 251 atividade potencial do PSII [$F_v/F_o = (F_m - F_o) / F_o$], eficiência fotoquímica efetiva do PSII
 252 [$F_v/F_m' = (F_m' - F_o') / F_m'$] (Oxborough and Baker 1997), coeficientes de dissipação
 253 fotoquímica [$q_p = (F_m' - F_s) / (F_m' - F_o')$] e não-fotoquímica [$q_N = 1 - q_P$] e a taxa de
 254 transporte de elétrons [ETR = $\phi\text{PSII} \cdot \text{PPFD} \cdot 0,42$] (Maxwell and Johnson 2000).

255

256 **Conteúdo de clorofilas**

257 O conteúdo relativo de clorofilas foi estimado inicialmente pelo clorofilômetro
 258 (SPAD-502) nas mesmas folhas utilizadas para as medidas das trocas gasosas e
 259 fluorescência da clorofila *a*. Posteriormente, esses valores foram utilizados para estimar
 260 os teores absolutos de clorofila *a* (Chl_a), clorofila *b* (Chl_b), somatório de Chl_{a+b} e a relação
 261 Chl_a/Chl_b a partir das equações das curvas de ajuste obtidas pela relação entre os valores
 262 relativos de clorofilas obtido pelo SPAD-502 e teor absoluto de clorofilas (Figura
 263 suplementar), descritas no item abaixo.

264

265 *SPAD-502 e conteúdo de clorofilas*

266 A relação entre o teor relativo de clorofilas obtido pelo SPAD e o teor absoluto de
 267 clorofilas foi determinada conforme descrito por Jesus and Marengo (2008), com algumas
 268 modificações. As folhas das mudas de açaizeiro (BRS-PA) com diferentes tons de verde
 269 foram selecionadas para se obter um gradiente de teor de clorofila. Foram utilizadas
 270 folhas com diferentes idades: estágios iniciais, com baixos teores de clorofilas, até
 271 estágios de completa atividade fotossintética (maduras) e completamente expandidas,
 272 com elevados teores de clorofilas. As leituras com o SPAD-502 foram feitas em três
 273 pontos a cada lado da nervura central da folha, na face adaxial da folha. Após as leituras,

274 as folhas foram destacadas e armazenadas em sacos de papel alumínio dentro de isopor
275 com gelo e levadas ao laboratório para determinação do teor absoluto de clorofila. Sete
276 discos de 5 mm de diâmetro foram retirados de cada local do limbo foliar onde foram
277 realizadas as medições com SPAD-502. A extração do teor absoluto de clorofila foi
278 realizada através da maceração do tecido foliar em 250 µL de etanol 98% (v/v). O tecido
279 macerado foi incubado durante 20 min a 80 ° C e subsequentemente centrifugado a 12000
280 x g durante 5 min a 4 ° C. O sobrenadante foi coletado e o resíduo foi lavado duas vezes
281 com 200 µL de etanol. A primeira lavagem utilizou etanol a 80% e a segunda, etanol a
282 50%. O volume foi ajustado para 600 µL com o mesmo extrator e uma alíquota de 20 µL
283 do extrato etílico de cada amostra foi adicionada a um meio de reação contendo 120 µL
284 de etanol a 98% e 40 µL do mix etílico (volume final de 180 µL por poço / amostra). A
285 absorvância das amostras foi registrada a 645 e 665 nm e as concentrações de *Chl_a*, *Chl_b*,
286 *Chl_a/Chl_b* e *Chl_{a+b}* foram estimadas de acordo com as fórmulas A e B descritas por Porra
287 et al. (1989), posteriormente normalizado para a área dos discos foliares de cada amostra
288 e área foliar total de cada planta.

289 (A) $Chl_a = 5.48 * Abs_{665} - 2.16 * Abs_{645}$ (µg/poço)

290 (B) $Chl_b = 9.67 * Abs_{645} - 3.04 * Abs_{665}$ (µg/poço)

291

292 **Teor de nutrientes em folhas**

293 As amostras de folhas foram secas em estufas de circulação forçada de ar (72h a
294 65°C), moídas (< 5 mm) em moinho tipo Wiley, pesadas e levadas ao laboratório de
295 análises de solos da Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA, para a determinação dos
296 teores de nutrientes, conforme descrito por Silva (2009). Os nutrientes fósforo (P),
297 potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) foram extraídos por digestão nítrico perclórica
298 e as determinações foram por fotometria de chama para P e K, e por microwave plasma-
299 atomic emission spectrometer (MP-AES) para Ca e Mg. O nitrogênio (N) foi extraído por
300 digestão sulfúrica e determinados pelo método kjeldahl.

301

302 **Análise estatística**

303 O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com oito
304 tratamentos (sete isolados de rizobactérias e um controle sem rizobactéria) e cinco
305 repetições. Os dados de crescimento e biomassa foram submetidos à análise de
306 agrupamento usando os valores médios de cada indivíduo e o grau de similaridade foi
307 obtido pela distância Euclidiana padrão. Os grupos foram submetidas à análise de

308 variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste Student-Newman-Keuls
 309 (SNK), $P < 0,05$, usando o software R versão 3.1.

310

311 2.3 Resultados

312 Seleção dos isolados de rizobactérias para promoção de crescimento

313 Todos os isolados testados promoveram o crescimento das mudas de açaizeiro
 314 (Figura 1 e 2). A análise de agrupamento revelou a formação de três grupos, onde o
 315 tratamento controle composto pelo grupo 1 foi inferior para todas as variáveis de
 316 promoção de crescimento em relação aos grupos 2 e 3, composto pelas isolados R-35; R-
 317 38; R-58; R-61; R-92; BRM-32111 e BRM-32113, respectivamente. Para as variáveis de
 318 crescimento, o aumento variou entre 31 e 38% para a altura de planta, em 14 e 21% para
 319 o diâmetro do coleto, em até 33% para o número de folhas, em 53 e 112% para a área
 320 foliar, em 17 e 23% para o índice de robustez e, em até 36% para o comprimento da raiz
 321 nos isolados dos grupos 2 e 3, respectivamente. Para as variáveis de biomassa o aumento
 322 variou entre 69 e 67% para a massa seca de raízes, em 53 e 113% para a massa seca do
 323 limbo foliar, em 64 e 110% para a massa seca da parte aérea e, em 65 e 95% para a massa
 324 seca total nos isolados dos grupos 2 e 3, respectivamente. A razão raiz/parte aérea foi
 325 menor em 22% para os isolados do grupo 3 em relação ao controle e, sem diferença entre
 326 os isolados dos grupos 1 e 2 (Tabela 1).

327

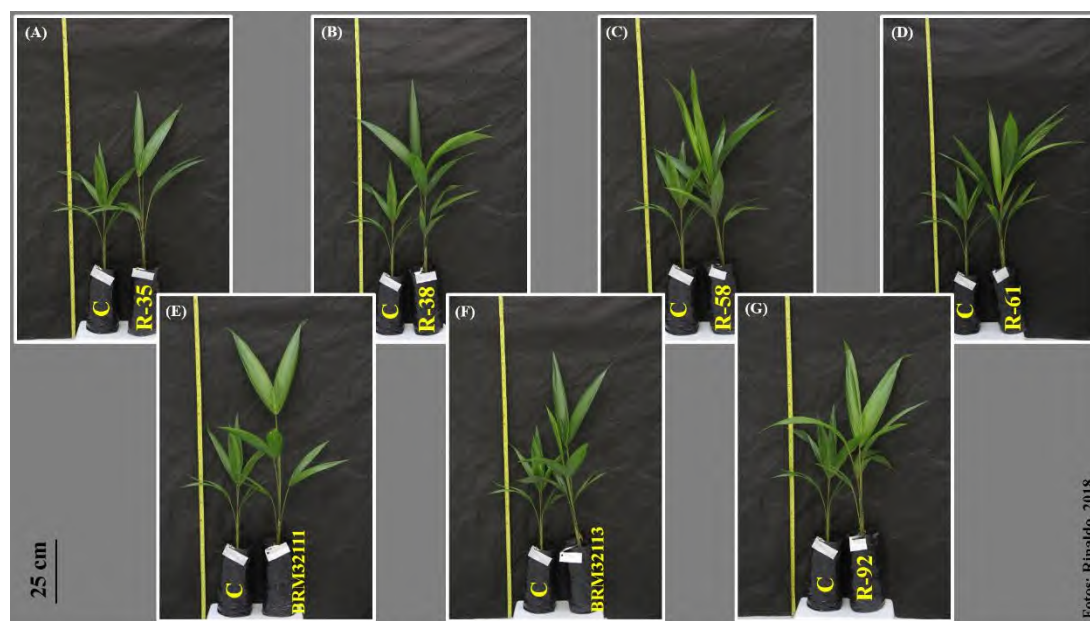


Figura 1. Aspecto visual da parte aérea das mudas de açaizeiro (cinco meses de idade) inoculadas com rizobactérias: R-35 (A), R-38 (B), R-58 (C); R-61 (D); BRM32111 (E), BRM32113 (F) e R-92 (G) em relação ao controle - C. Figura elaborada pelo autor a partir de imagens registradas por Rinaldo Viana, 2018.

328

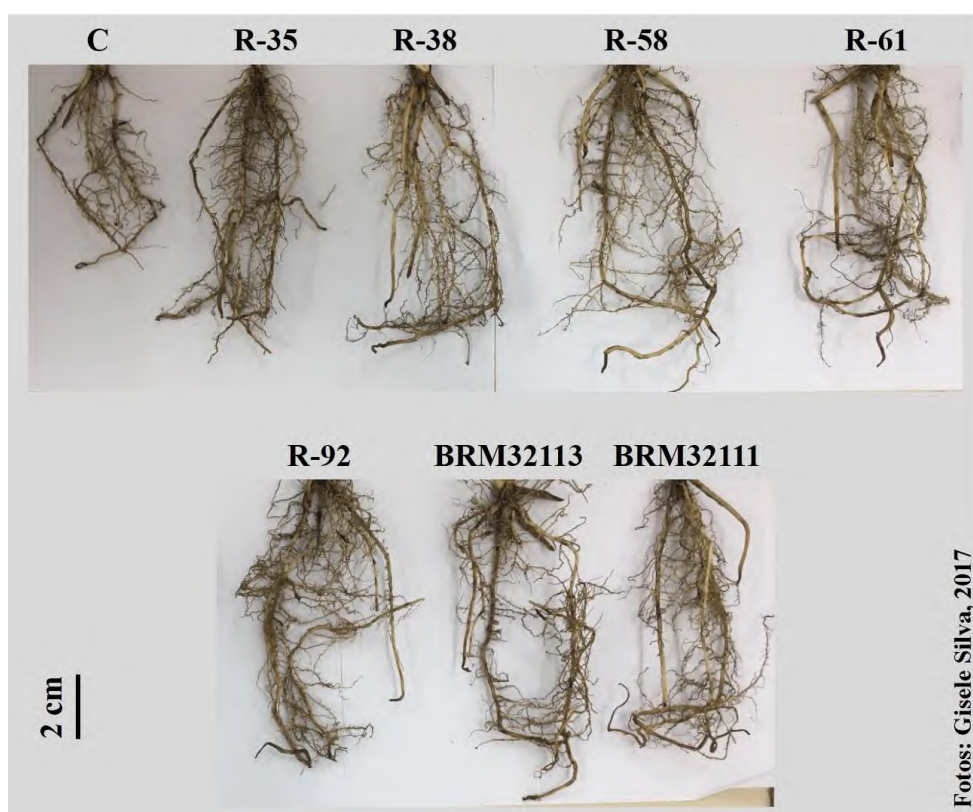


Figura 2. Aspecto visual das raízes das mudas de açazeiro (cinco meses de idade) inoculadas com rizobactérias: R-35, R-38, R-58; R-61; R-92; BRM32111 e BRM32113 em relação ao controle - C. Figura elaborada pelo autor a partir de imagens registradas por Gisele Silva, 2017.

329

Tabela 1. Biometria e biomassa em mudas de açazeiro (cinco meses de idade) inoculadas com rizobactérias: R-35, R-38, R-58, R-61, R-92, BRM-32111 e BRM-32113.

Variáveis / Isolados ^a	Grupos		
	1	2	3
	Controle	R-35; R-38; R-58; R-61; R-92; BRM-32111	BRM-32113
Biometria			
Altura da planta (cm)	34,26 B*	44,88 A	47,34 A
Diâmetro do coleto (mm)	6,36 C	7,25 B	7,67 A
Número de folhas	3,0 B	3,0 B	4,0 A
Area foliar (cm ²)	183,46 C	281,15 B	388,88 A
Comprimento da raiz (cm)	22,70 B	30,76 A	30,08 A
Índice de robustez	5,16 B	6,07 A	6,37 A
Biomassa			
Massa seca de raízes (g)	0,72 B*	1,22 A	1,20 A
Massa seca de folhas (g)	0,78 C	1,19 B	1,66 A
Massa seca da parte aérea (g)	1,42 C	2,33 B	2,98 A
Massa seca total (g)	2,14 C	3,54 B	4,18 A
Razão raiz/parte aérea	0,51 A	0,52 A	0,40 B

^a Os isolados foram agrupados de acordo com a matriz de similaridade Euclidiana. * Médias com letras iguais não diferem significativamente de acordo com o teste de Student-Newman-Keuls ($P \leq 0,05$).

330

331 **Identificação molecular dos isolados provenientes de açazeiro**

332 A reação em cadeia da polimerase amplificou a região V4 do gene 16S e gerou o
 333 produto cujo tamanho ficou entre 400-500 pb. A Tabela 2 apresenta o resultado do
 334 sequenciamento e análise das sequencias no BLAST. A Figura 3 mostra as distâncias
 335 genéticas entre os isolados sequenciados e outras sequencias disponíveis no GenBank.

336

Tabela 2. Caracterização molecular dos isolados através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA (fragmentos de aproximadamente 400-500 pares de bases).

Isolados	Base de dados			
	NCBI*	E-value**	IS***	Acesso nº
R-38	<i>Pseudoruegeria sabulilitoris</i> strain GJMS-35	0,0	86%	NZ_LOAS01000105.1
R-35	<i>Pseudoruegeria sabulilitoris</i> strain GJMS-35	0,0	87%	NZ_LOAS01000105.1
R-58	<i>Bacillus thuringiensis</i> YBT-1518	0,0	99%	NC_022873.1
R-61	<i>Bacillus thuringiensis</i> YBT-1518	0,0	100%	NC_022873.1
R-92	<i>Pseudoruegeria sabulilitoris</i> strain GJMS-35	0,0	99%	NZ_LOAS01000105.1

*National Center for Biotechnology Information; ** O valor do E-value sugere que quanto mais próximo de zero este estiver, mais confiável é o alinhamento das sequências; ***Índice de similaridade: 0-100%.

337

338

339

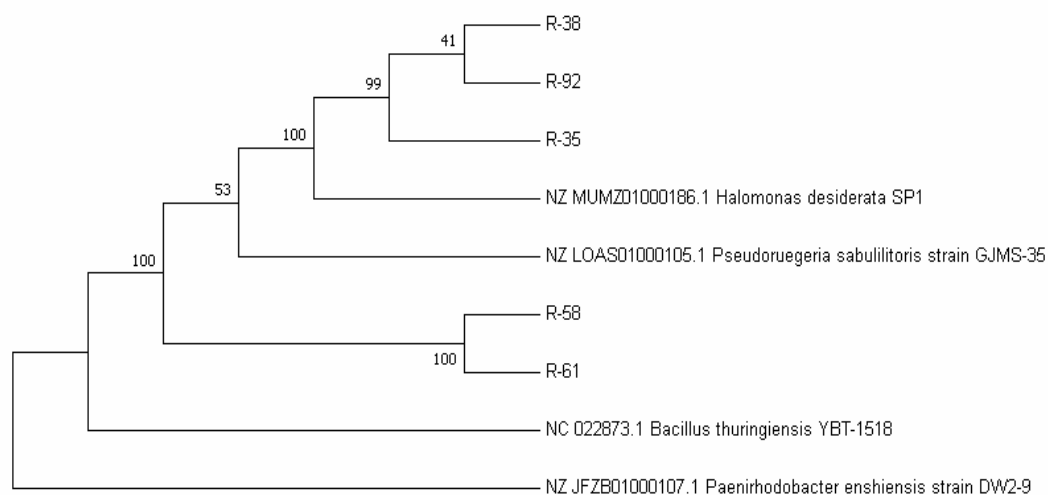


Figura 3. Árvore filogenética para as sequencias parciais do gene 16S rRNA mostrando as relações entre as rizobactérias deste estudo e gêneros relacionados. Os números do banco de acesso da base de dados são indicados após os nomes bacterianos.

340

341

342

343 **Trocas gasosas**

344 Todas os isolados dos grupos 2 e 3 induziram aumento nas trocas gasosas em
 345 comparação ao grupo 1 (controle). Os aumentos variaram entre 31 e 33% para A , em 50
 346 e 64% para g_s , em 39 e 46% para E e, em 66 e 114% para A/C_i nos grupos 2 e 3,
 347 respectivamente. O C_i aumentou em 19% e 32% para os grupos 2 e 3, respectivamente
 348 (Figura 4). As diferenças do grupo 1 com os grupos 2 e 3 foram mais contundentes quando
 349 se estimou A_{total} e E_{total} com base na área foliar total das plantas. Para A_{total} , o incremento
 350 foi em 96 e 181% em relação aos grupos 2 e 3, respectivamente, enquanto que para E_{total}
 351 o incremento foi em 114% (grupo 2) e 248% (grupo 3) (Figura 5).

352

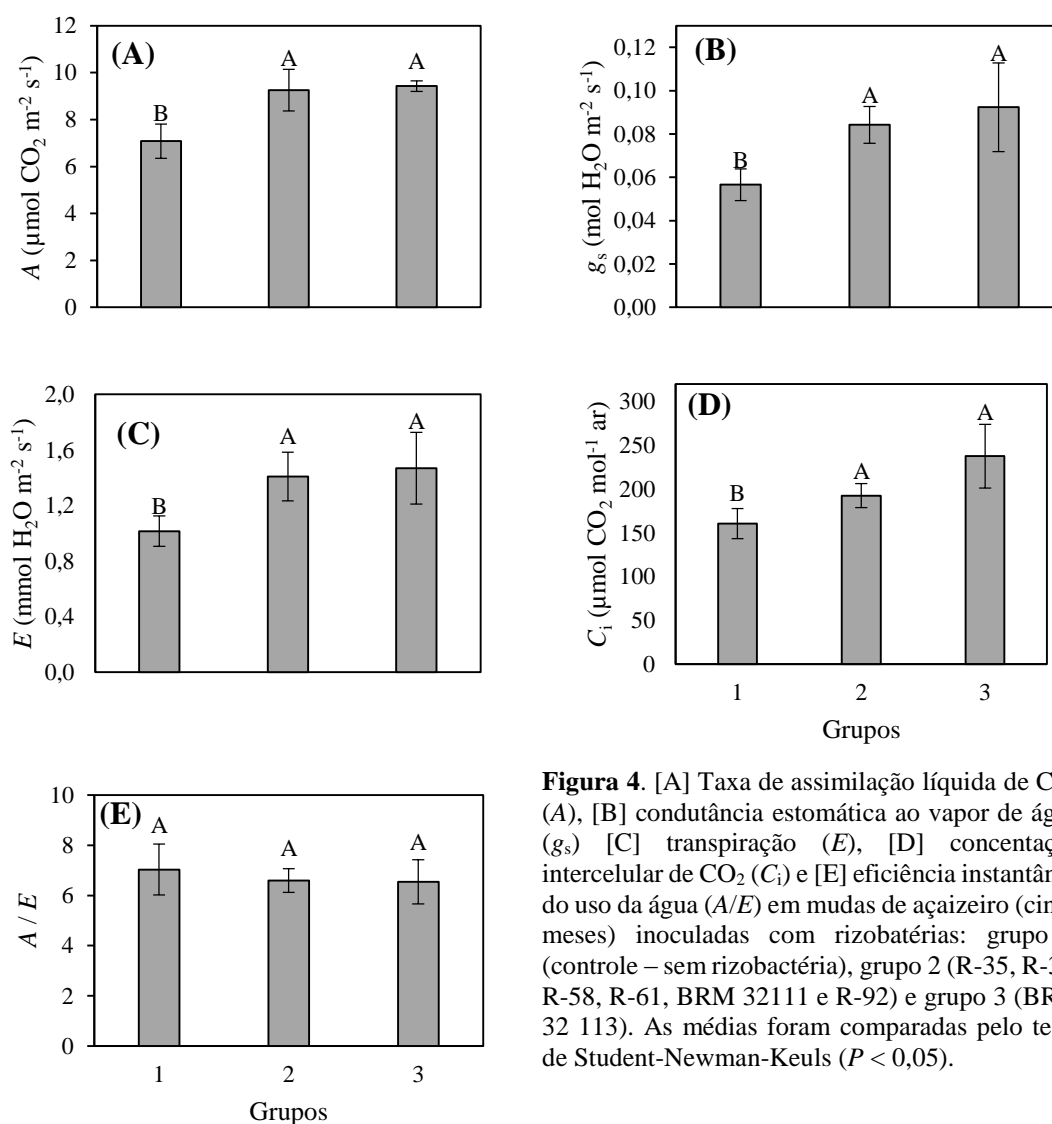


Figura 4. [A] Taxa de assimilação líquida de CO_2 (A), [B] condutância estomática ao vapor de água (g_s) [C] transpiração (E), [D] concentração intercelular de CO_2 (C_i) e [E] eficiência instantânea do uso da água (A/E) em mudas de açaizeiro (cinco meses) inoculadas com rizobactérias: grupo 1 (controle – sem rizobactéria), grupo 2 (R-35, R-38, R-58, R-61, BRM 32111 e R-92) e grupo 3 (BRM 32 113). As médias foram comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$).

353

354

355

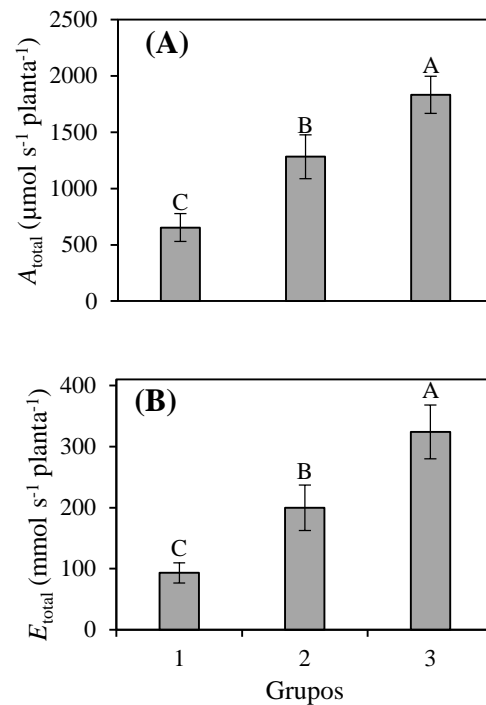


Figura 5. [A] Taxa de assimilação líquida de CO₂ total (A_{total}) e [B] transpiração total (E_{total}) em mudas de açaizeiro (cinco meses) inoculadas com rizobactérias: grupo 1 (controle – sem rizobactéria), grupo 2 (R-35, R-38, R-58, R-61, BRM 32111 e R-92) e grupo 3 (BRM 32 113). As médias foram comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$).

356

357 Conteúdo de clorofilas

358 Todas as rizobactérias induziram aumento nos teores de clorofilas. Comparado ao
 359 grupo 1, o incremento variou entre 10 e 13% para Chl_a , em 7 e 9% para Chl_b , em 8 e 11%
 360 para Chl_{a+b} e, em 7 e 10% para Chl_a/Chl_b nos grupos 2 e 3, respectivamente (Figura 6).
 361 Considerando a área foliar total das plantas, o aumento nos teores totais de clorofilas foi
 362 em maior magnitude entre as plantas inoculadas com as rizobactérias dos grupos 2 e 3 em
 363 relação as plantas controle. Esse incremento variou entre 62% e 137% para Chl_a total, em
 364 55% e 124% para Chl_b total, em 60% e 133% para Chl_{a+b} total e, acima de 6% para a razão
 365 Chl_a total / Chl_b total para os grupos 2 e 3, respectivamente (Figura 7).

366

367

368

369

370

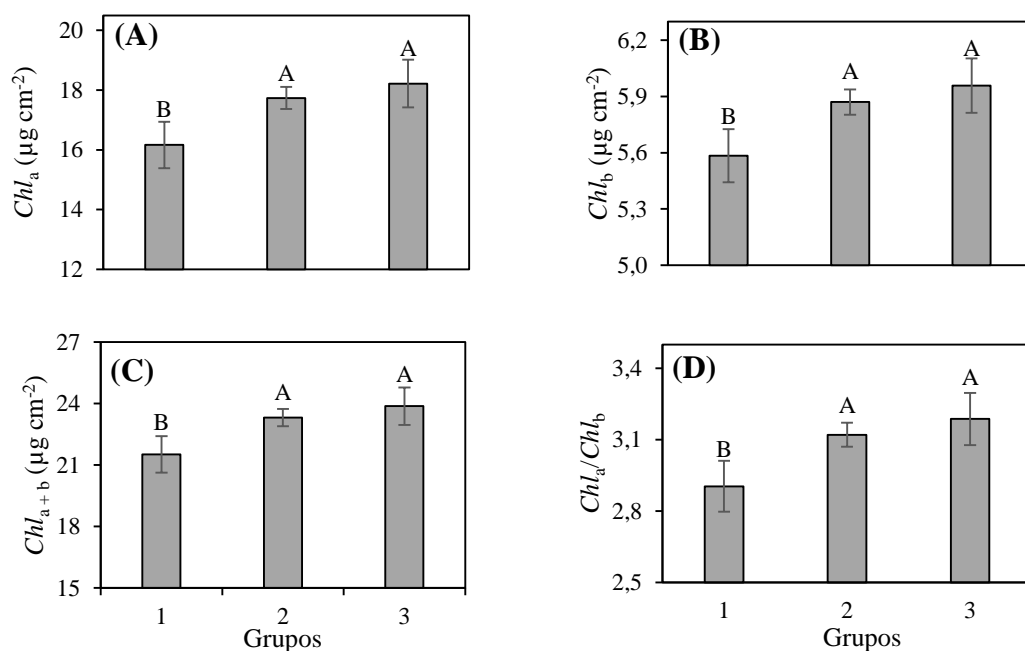


Figura 6. [A] Teores de clorofila *a* (Chl_a), [B] clorofila *b* (Chl_b), [C] clorofila *a* + clorofila *b* (Chl_{a+b}) e [D] razão entre Chl_a e Chl_b (Chl_a/Chl_b) em folhas de mudas de açazeiro (cinco meses de idade) inoculadas com rizobactérias: grupo 1 (controle – sem rizobactéria), grupo 2 (R-35, R-38, R-58, R-61, BRM-32111 e R-92) e grupo 3 (BRM-32113). As médias foram comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$)

371

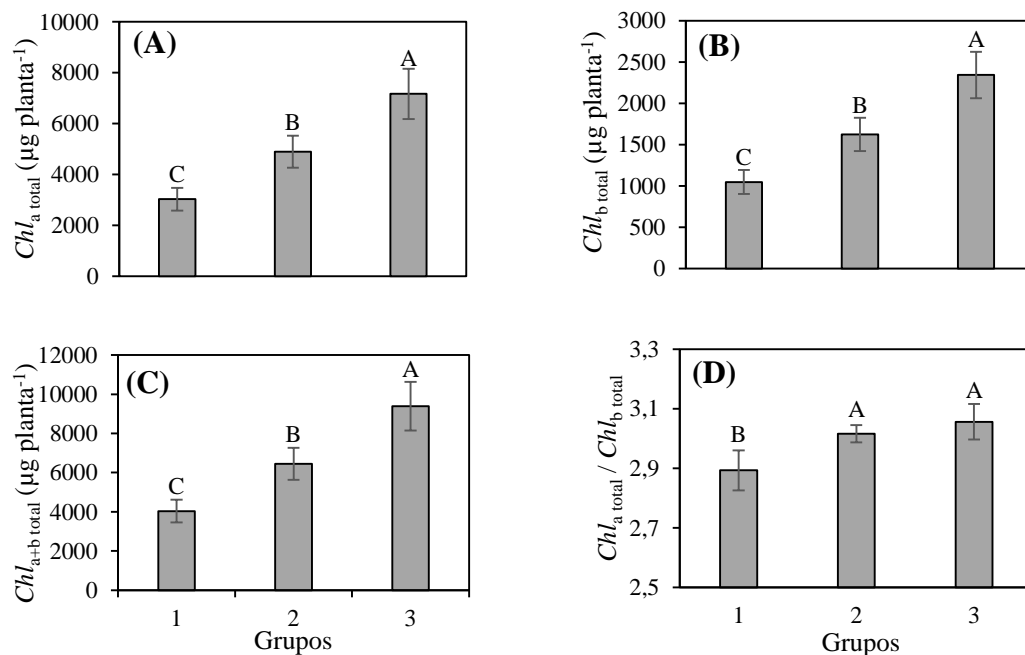


Figura 7. [A] Teores totais de clorofila *a* ($Chl_{a\ total}$), [B] clorofila *b* ($Chl_{b\ total}$), [C] clorofila *a* total + clorofila *b* total ($Chl_{a+b\ totais}$) e [D] razão entre Chl_a e Chl_b totais ($Chl_{a\ total}/Chl_{b\ total}$) em folhas de mudas de açazeiro (cinco meses de idade) inoculadas com rizobactérias: grupo 1 (controle – sem rizobactéria), grupo 2 (R-35, R-38, R-58, R-61, BRM-32111 e R-92) e grupo 3 (BRM-32113). As médias foram comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$).

372

373

374

375

376 **Fluorescência da clorofila *a***

377 Todos os isolados de rizobactérias induziram reduções médias de 54% para F_o e
 378 6% para q_N em relação as plantas controle. Por outro lado, todas as outras variáveis
 379 aumentaram nos grupos 2 e 3 em comparação ao grupo 1. O incremento foi superior a
 380 81% para F_m , entre 343 e 565% para F_v/F_o , entre 13 e 17% para F_v'/F_m' , em 31 e 44%
 381 para q_p , e em 51 e 66% para ETR nos grupos 2 e 3, respectivamente (Figura 6).

382

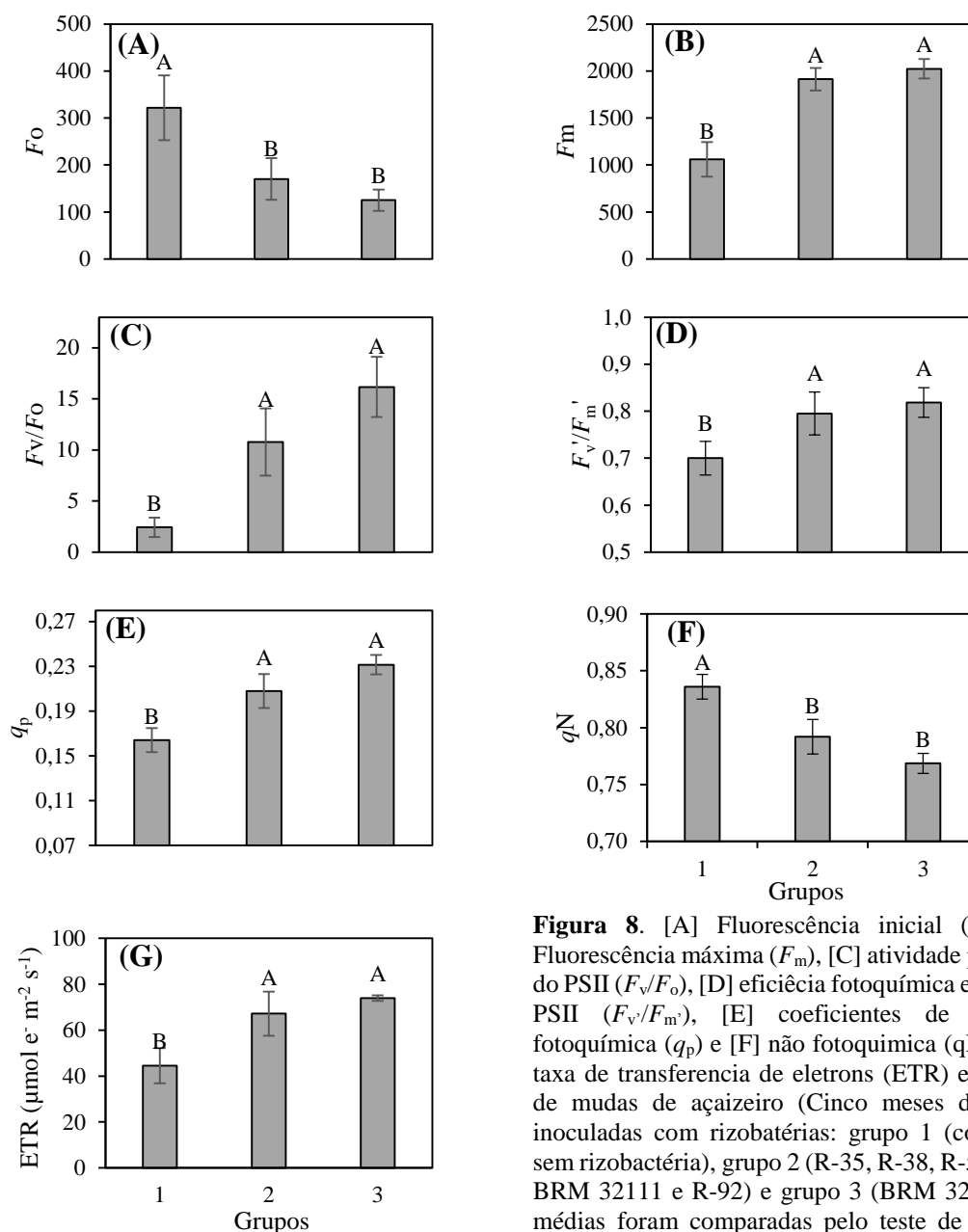


Figura 8. [A] Fluorescência inicial (F_o), [B] Fluorescência máxima (F_m), [C] atividade potencial do PSII (F_v/F_o), [D] eficiência fotoquímica efetiva do PSII (F_v'/F_m'), [E] coeficientes de extinção fotoquímica (q_p) e [F] não fotoquímica (q_N), e [G] taxa de transferência de elétrons (ETR) em folhas de mudas de açaizeiro (Cinco meses de idade) inoculadas com rizobactérias: grupo 1 (controle – sem rizobactéria), grupo 2 (R-35, R-38, R-58, R-61, BRM 32111 e R-92) e grupo 3 (BRM 32113). As médias foram comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$).

383

384

385

386

387 **Conteúdo de nutrientes**

388 Todas as rizobactérias induziram aumento no conteúdo dos nutrientes na parte
 389 aérea das mudas de açaizeiro, exceto para cálcio (Ca) e magnésio (Mg). Em comparação
 390 ao controle, as mudas inoculadas com rizobactérias tiveram aumento em 12 e 18% para
 391 nitrogênio (N), em 24 e 73% para fósforo (P) e, em 11 e 14% para potássio (K) para os
 392 grupos 2 e 3, respectivamente (Tabela 3).

393

Tabela 3. Teores de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) em folhas de mudas de açaizeiro sem inoculação (grupo 1) e com inoculação das rizobactérias (grupo 2 e 3).

Grupos	Isolados	Conteúdo de nutrientes (g kg ⁻¹ parte aérea)				
		N	P	K	Ca	Mg
1	Controle	13,31 b	2,13 c	52,95 b	6,71 a	2,22 a
2	R-35, R-38, R-58, BRM 32111, R-61 e R-92	14,84 a	2,64 b	58,55 a	7,33 a	2,43 a
3	BRM 32113	15,74 a	3,69 a	60,47 a	6,95 a	2,35 a
CV(%)		4,90	12,64	4,57	7,10	8,52

Os valores são as médias de quatro repetições. Letras minúsculas iguais na coluna indicam diferenças não significativas pelo teste de SNK ($p < 0,05$).

394

395

396

397

398

399

400

401

402

403

404

405

406

407

408

409

410 2.4 Discussão

411 O presente estudo relata pela primeira vez a promoção de crescimento, acúmulo
412 de biomassa e nutrientes e, melhor desempenho fotossintético em mudas de açaizeiro
413 inoculadas com as rizobactérias R-35, R-38, R-58, R-61, R-92, BRM32111 (grupo 2) e
414 BRM32113 (grupo 3). Os benefícios da inoculação das rizobactérias na promoção do
415 crescimento já foram relatados em monocotiledôneas como palma de óleo (Om et al. 2009),
416 coco (George et al. 2013) e arroz (Filippi et al. 2011; Rais et al. 2016), que resultou em
417 aumento no crescimento do sistema radicular e eficiência na absorção de água e
418 nutrientes.

419 A bactéria *Pseudoruegeria sabulilitoris*, semelhante em 90% com as rizobactérias
420 R-35, R-38 e R-92, foi isolada da areia de praia em Geoje Island, Coreia do Sul (Park et
421 al. 2014) e, ainda não possui registro como promotora de crescimento de plantas. A
422 bactéria *Bacillus thuringiensis*, 99,5% similar às rizobactérias R-58 e R-61, foi isolada de
423 solos da China (Yu et al. 2008) e, tem sido amplamente utilizada como biopesticida para
424 controle de insetos agrícola e fitonematoides (Wang et al. 2014). As bactérias
425 *Pseudomonas fluorescens* (BRM32111) e *Burkholderia pyrrocinia* (BRM32113) são
426 amplamente utilizadas como promotoras de crescimento de plantas, como tomate (Gül et
427 al. 2016), amendoim (Prasad e Babu, 2017) e arroz (Souza et al. 2018).

428 As raízes atraem as rizobactérias pela liberação de exsudados como carboidratos,
429 aminoácidos, ácidos orgânicos, proteínas, lipídeos, vitaminas e compostos fenólicos, e
430 essa interação constitui em um mecanismo conhecido como efeito *priming* da rizosfera,
431 o qual favorece a nutrição e crescimento da bactéria para a formação de *quorum sense*
432 (Bais et al. 2006; Van Loon 2007), e iniciará o processo de trocas de sinais e colonização
433 das raízes pelas rizobactérias (Haldar and Sengupta 2015). O resultado dessa interação
434 planta-rizobactéria tem sido nomeado como bioestimulante, biofertilizantes e/ou
435 fitoestimuladores.

436 No presente estudo, todas as rizobactérias induziram aumento do crescimento de
437 raízes primária, secundária e terciária e biomassa da raiz de mudas de açaí, o qual pode
438 ser atribuído aos mecanismos diretos quando as rizobactérias atuam na solubilização
439 direta de fontes de P insolúveis, fixação de N e/ou regulação da concentração de
440 reguladores de crescimento de plantas, como ácido indol-acético (AIA) produzidos pelas
441 rizobactérias R-61 do grupo 2 e BRM 32113 do grupo 3 (Nascente et al. 2016), e
442 mecanismos indiretos quando as rizobactérias (grupo 2) disponibilizam precursores,
443 como o aminoácido triptofano, para biossíntese do AIA na planta. Outra forma indireta
444 pode ocorrer quando a planta disponibiliza o triptofano, através dos exsudados

445 radiculares, para ser convertido em AIA pelas rizobactérias (Glick 2012) e serem
446 utilizadas na indução do crescimento radicular (Ahmad et al. 2005). Em mudas de palma
447 de óleo inoculadas com rizobactérias foi observado aumento no crescimento das raízes
448 primárias e secundárias, e foi atribuído a maior síntese de AIA (Astriani et al. 2016).
449 Além disso, o maior crescimento radicular pode ser atribuído a capacidade das
450 rizobactérias de sintetizar a enzima ACC-desaminase, a qual diminui os níveis do
451 hormônio etileno que atua como inibidor do crescimento, aumentando a relação AIA/
452 etileno (Aslantaş et al. 2007; Van Loon 2007).

453 O desenvolvimento do sistema radicular induzido pelas rizobactérias (grupo 2 e
454 3) foi diretamente associado com o crescimento na parte aérea das mudas de açaizeiro, o
455 qual pode ser atribuído a maior absorção de água e translocação de nutrientes resultantes
456 da maior área de contato das raízes com o solo e maior volume de pelos radiculares (Amir
457 et al. 2005). A BRM 32113 induziu o maior diâmetro do coleto, entretanto, todas as
458 rizobactérias induziram o aumento do índice de robustez das mudas de açaí, parâmetro
459 que está relacionado ao maior vigor das mudas, como observado em mudas de coco
460 inoculadas rizobactérias (George et al. 2013).

461 O crescimento da parte aérea, assim como do número de folhas e área foliar pode
462 ser atribuído a capacidade das rizobactérias de induzir a síntese de giberelinas e
463 citocininas que regulam a expansão foliar e síntese de clorofilas (Dodd et al. 2010; Kang
464 et al. 2014). No presente estudo, o maior número de folhas foi obtido apenas com a BRM-
465 32113, entretanto as demais rizobactérias do grupo 2 induziram maior área foliar que
466 resultou em maior crescimento da parte aérea e acúmulo de biomassa das folhas. Esses
467 benefícios podem ser atribuídos a capacidade das rizobactérias de sinalizar a rota de
468 biossíntese de giberelina e citocinina (Chauhan et al. 2015), como encontrado em mudas
469 de tomate inoculadas com rizobactérias (Kang et al. 2012).

470 A maior área foliar influencia diretamente na maior captação de luz e assimilação
471 de CO₂ (Zhang et al. 2017). No presente estudo, todas as rizobactérias induziram aumento
472 na assimilação líquida de CO₂ (*A*) em relação as plantas controle, porém, essas diferenças
473 foram mais contundentes quando estimadas em função da área foliar total, sendo maior
474 para a BRM 32113. O maior valor de *A* pode ser atribuído ao maior grau de abertura dos
475 estômatos (*g_s*), o qual permite a maior entrada de CO₂ nas folhas e favorece o aumento
476 da fotossíntese líquida. Em plantas de arroz inoculadas com rizobactérias foi observado
477 aumento na taxa de fotossíntese líquida, o qual foi atribuído a influência positiva na
478 abertura e fechamento dos estômatos, que afetou diretamente as trocas gasosas e
479 contribuiu para o crescimento da planta (Nascente et al. 2016).

480 A maior abertura estomática, além de favorecer a entrada de CO₂ nas folhas,
481 influencia diretamente na maior perda de água pela transpiração (Silva et al. 2017). No
482 presente estudo, a maior taxa de transpiração pode ser atribuída a maior abertura
483 estomática induzida por todas as rizobactérias. Entretanto, a maior taxa de transpiração
484 total induzida pela BRM 32113 pode ser atribuída, além da abertura estomática, a maior
485 área foliar total e menor razão raiz / parte aérea. Quando a água é abundante e a radiação
486 solar incidente nas folhas favorece a alta atividade fotossintética, há elevada demanda por
487 CO₂ dentro da folha, e os poros estomáticas se abrem amplamente, diminuindo a
488 resistência estomática à difusão do CO₂ (Flexas et al. 2012). Nessas condições, há elevada
489 perda de água por transpiração, porém, uma vez que o suprimento hídrico é abundante,
490 torna-se vantajoso para a planta intercambiar a água por produtos da fotossíntese,
491 resultando em ganho no crescimento (Fan et al. 2015).

492 As alterações na concentração intercelular de CO₂ (C_i), evidenciam que os
493 isolados de rizobactérias aumentam a atividade de carboxilação da Rubisco através da
494 regulação da abertura estomática que favorece a fixação de CO₂ mesofílico. Resultados
495 semelhantes foram encontrados para outros biopromotores de crescimento, como
496 *Trichoderma* spp. inoculados em plantas de arroz (Doni et al. 2014). Esses benefícios
497 podem resultar em maior produção de fotoassimilados, como sacarose e rafinose, os quais
498 podem ser alocados para órgãos heterotróficos das plantas para sustentar o crescimento
499 ou serem convertidos em produtos de reservas (Shi et al. 2010) ou ser utilizados pelas
500 rizobactérias pelos exsudados radiculares (Bais et al. 2006).

501 Entretanto, a maior atividade de carboxilação para fixação do CO₂ depende de um
502 suprimento constante de energia química na forma de ATP e NADPH gerados a partir da
503 absorção de luz pelas clorofilas (Zhang et al. 2017). Em plantas de arroz inoculadas com
504 rizobactérias o aumento da fotossíntese líquida foi associado ao aumento do teor de
505 clorofilas (Alam et al. 2001). Resultados semelhantes foram observados no presente
506 estudo, onde todas as rizobactérias induziram aumento nos teores de *Chl_a*, *Chl_b*, razão
507 *Chl_a/Chl_b* e *Chl_{total}*. Entretanto, a estimativa dos teores totais de *Chl_a*, *Chl_b* e *Chl_{total}* por
508 planta foi maior para a BRM 32113 devido a maior área foliar total induzida por essa
509 rizobactéria, sugerindo que as rizobactérias aumentam a fotossíntese líquida por induzir
510 incrementos do conteúdo de clorofilas, que por sua vez, aumentam a eficiência da
511 conversão de luz em energia química para sustentar o gasto energético da maior atividade
512 de carboxilação para a fixação de CO₂ nas folhas.

513 O maior conteúdo de clorofilas (*Chl_a* e *Chl_b*) induzidos por todas as rizobactérias
514 podem ter contribuído para a maior eficiência na absorção de luz, transferência de energia,

515 transferência de elétrons e maior controle na dissipação do excedente de energia térmica.
516 Isso pode ser demonstrado pelos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*, como os
517 incrementos na eficiência fotoquímica efetiva do PSII (F_v'/F_m') e no aumento da atividade
518 potência do PSII (F_v/F_o), como observado em plantas de pimenta inoculadas com *Bacillus*
519 spp. (Samaniego-Gómez et al. 2016). No presente estudo, os incrementos na taxa de
520 transferência de elétrons (ETR) e coeficientes de dissipação fotoquímica (qP), indicam
521 maior capacidade de utilização da luz e maior eficiência dos fotossistemas I e II, o qual
522 pode ter contribuído para menor geração e dissipação de energia de excitação não
523 fotoquímica (qN).

524 Lucas et al. (2014), relatam que o incremento de F_v'/F_m' está associada a
525 integridade das proteínas D1, as quais são responsáveis pela transferência de elétrons da
526 água para a *Chl_a* associada ao PSII. Os incrementos de ETR podem indicar maior
527 capacidade das plastoquinona para realizar as reações de oxido-redução (Suresh et al.
528 2012), enquanto menores valores de qN indicam o melhor controle dos mecanismo de
529 fotoproteção dos pigmentos fotossintéticos (Krause and Weis 1991). No presente estudo,
530 as mudas de açaizeiro inoculadas com rizobactérias aumentaram qP e ETR, que
531 influenciaram na diminuição de qN .

532 Os benefícios induzido por todas as rizobactérias na promoção do crescimento,
533 trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* podem ser associados ao melhor estado
534 nutricional das mudas de açaí, demonstrado pelo acúmulo de nitrogênio (N), fósforo (P) e
535 potássio (K) nas folhas. Resultados semelhantes foram observados em planta de arroz
536 inoculadas com rizobactérias, onde o maior acúmulo de N, P e K, que influenciou
537 positivamente nas trocas gasosas e aumentou o desempenho fotossintético, contribuindo
538 para o maior crescimento e acúmulo de biomassa (Nascente et al. 2016).

539 O nitrogênio é um dos elementos de maior importância na nutrição de plantas,
540 pois é utilizado na síntese de compostos celulares, como as clorofilas (Wolff and Floss
541 2008). No presente estudo, o acúmulo de N influenciou positivamente no maior conteúdo
542 de clorofilas nas folhas das mudas inoculadas com as rizobactérias, o qual pode ser
543 atribuído a capacidade de fixação do N pelas rizobactérias R-35, R-38 e R-58, ou a outros
544 mecanismos envolvidos na maior eficiência de absorção de N pelas outras rizobactérias.
545 Resultados semelhantes foram observados em mudas de palma de óleo inoculadas com
546 rizobactérias (Amir et al. 2003).

547 O fósforo (P) é o principal nutriente que influencia no crescimento das plantas,
548 pois é o elemento essencial na composição das proteínas, ácidos nucleicos, membranas e
549 moléculas de energia, como ATP, GTP e NADPH (Acevedo et al. 2014). Um dos

550 mecanismos de ação das rizobactérias para promover o crescimento é a solubilização de
551 fosfato (Velásquez and Rodríguez-Barrueco 2007). No presente estudo, a maior teor de
552 fósforo nas folhas contribuiu para o crescimento e acúmulo de biomassa nas mudas
553 inoculadas com rizobactérias. As R-35 e BRM-32111 foram positivas para solubilização
554 de fosfato, enquanto que para as outras rizobactérias a solubilização do fosfato pode ter
555 ocorrido através de mecanismos que envolvem a secreção de ácidos orgânicos e
556 inorgânicos, como observado em palma de óleo inoculadas com rizobactérias (Amir et al.
557 2005).

558 O potássio (K) estar relacionado com a ativação enzimática, transporte de
559 carboidratos e regulação da abertura estomática (Pan et al. 2017). As PGPR podem
560 beneficiar as plantas através da sua capacidade de solubilizar o potássio e disponibilizá-
561 lo para a planta, contribuindo para o maior crescimento (Chaudhary and Sindhu 2016; Hu
562 et al. 2006), como observado no presente estudo, onde a inoculação das rizobactérias
563 induziram o acúmulo de K nas folhas e influenciaram positivamente no crescimento das
564 mudas de açaizeiro. Em plantas de arroz inoculadas com rizobactérias a maior eficiência
565 na absorção de potássio contribuiu para o maior crescimento das raízes e parte aérea
566 (Duarah et al. 2011).

567

568 **2.5 Conclusões**

569 As rizobactérias aceleram o crescimento, aumentam a eficiência fotossintética e
570 induzem o acúmulo de nutrientes foliar em mudas de açaizeiro; contribuindo para
571 diminuir o tempo de obtenção das mudas (5 meses) no padrão de qualidade para campo.

572 A rizobactéria BRM32113 apresenta destaque (superior) em todos os parâmetros
573 avaliados.

574 A inoculação das rizobactérias pode contribuir para o manejo sustentável da
575 produção de mudas de açaizeiro em viveiros.

576

577

578

579

580

581

582 **2.6 Material suplementar**

Tabela suplementar. Código de identificação, origem, cor, características bioquímicas e classificação taxonômica dos sete isolados de rizobactérias inoculados nas mudas de açaizeiro.

Código ^a	Origem ^b	Cor ^c	Bioquímica ^c					Taxonomia ^c
			AIA ^d	Celu. ^e	Fosf. ^f	Sider. ^g	Fix. N ^h	
R-35	AM/Brasil	Creme	-	-	+	-	+	<i>Pseudoruegeria sabulitoris</i>
R-38	AM/Brasil	Branca	-	+	-	-	+	<i>Pseudoruegeria sabulitoris</i>
BRM32113	PA/Brasil	Rosa	+	+	-	+	-	<i>Burkholderia pyrocinia</i> *
BRM32111	PA/Brasil	Amarela	-	+	+	+	-	<i>Pseudomonas fluorescens</i> *
R-58	AM/Brasil	Amarelo	-	+	-	-	-	<i>Bacillus thuringiensis</i>
R-61	AM/Brasil	Creme	+	+	-	-	+	<i>Bacillus thuringiensis</i>
R-92	AM/Brasil	Amarelo	-	-	-	-	-	<i>Pseudoruegeria sabulitoris</i>

^aCódigo de identificação das rizobactérias na coleção de microrganismos do Laboratório de Proteção de Plantas da Universidade Federal Rural da Amazônia. ^bOrigem geográfica de cada rizobactéria. ^cCor da colônia (Malke 1991). ^dClassificação taxonômica (*Nascente et al. 2016). ^eProdução de ácido indol acético (Cattelan 1999). ^fProdução de celulase (Teather and Wood 1982). ^gSolubilização de fosfato (Sylvester-Bradley et al. 1982). ^hProdução de sideróforos e ^hFixação de nitrogênio (Döbereiner and Day 1976).

583

584

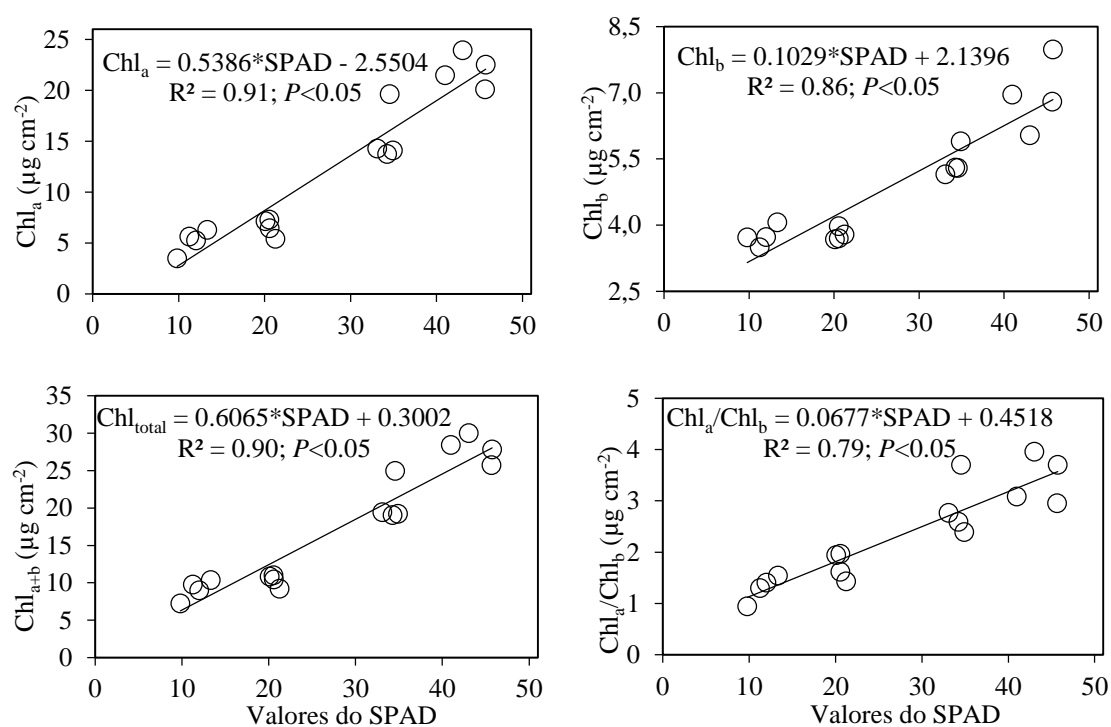


Figura suplementar. Relação entre os valores de SPAD e os teores de clorofila *a* (Chl_a), clorofila *b* (Chl_b), clorofila *a* mais clorofila *b* (Chl_{a+b}) e razão $\text{Chl}_a/\text{Chl}_b$ por unidade de área em folhas de mudas de açaizeiro. Cada ponto representa a média de seis leituras por folha.

585

586 **REFERÊNCIAS**

- 587 Acevedo E, Galindo-Castañeda T, Prada F, et al (2014) Phosphate-solubilizing
588 microorganisms associated with the rhizosphere of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)
589 in Colombia. *Appl Soil Ecol* 80:26–33. doi: 10.1016/j.apsoil.2014.03.011
- 590 Ahmad F, Ahmad I, Khan MS (2005) Indole Acetic Acid Production by the Indigenous
591 Isolates of *Azotobacter* and Fluorescent *Pseudomonas* in the Presence and Absence
592 of Tryptophan. *Turk J Biol* 29:29–34.
- 593 Alam S, Cui Z-J, Yamagishi T, Ishii R (2001) Grain yield and related physiological
594 characteristics of rice plants (*Oryza sativa* L.) inoculated with free-living
595 rhizobacteria. *Plant Prod Sci* 4:126–130. doi: 10.1626/pp.s.4.126
- 596 Amir HG, Shamsuddin ZH, Halimi MS, et al (2005) Enhancement in Nutrient
597 Accumulation and Growth of Oil Palm Seedlings Caused by PGPR Under Field
598 Nursery Conditions. *Commun Soil Sci Plant Anal* 36:2059–2066. doi:
599 10.1080/00103620500194270
- 600 Amir HG, Shamsuddin ZH, Halimi MS, et al (2003) N₂ fixation, nutrient accumulation
601 and plant growth promotion by rhizobacteria in association with oil palm seedlings.
602 *Pakistan J. Biol. Sci.* 6:1269–1272.
- 603 Apprill, A., McNally, S., Parsons, R., & Weber, L. (2015). Minor revision to V4 region
604 SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11
605 bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 75(2), 129–137.
- 606 Asari S, Tarkowská D, Rolčik J, et al (2016) Analysis of plant growth-promoting
607 properties of *Bacillus amyloliquefaciens* UCMB5113 using *Arabidopsis thaliana* as
608 host plant. *Planta* 15–30. doi: 10.1007/s00425-016-2580-9
- 609 Aslantaş R, Çakmakçı R, Şahin F (2007) Effect of plant growth promoting rhizobacteria
610 on young apple tree growth and fruit yield under orchard conditions. *Sci Hortic*
611 (Amsterdam) 111:371–377. doi: 10.1016/j.scienta.2006.12.016
- 612 Astriani M, Mubarik N, Tjahjoleksono A (2016) Selection of bacteria producing indole-
613 3-Acetic acid and its application on oil palm seedlings (*Elaeis guineensis* Jacq.).
614 *Malays J Microbiol* 12:147–154. doi: <http://dx.doi.org/10.21161/mjm.74615>
- 615 Bais HP, Weir TL, Perry LG, et al (2006) the Role of Root Exudates in Rhizosphere
616 Interactions With Plants and Other Organisms. *Annu Rev Plant Biol* 57:233–266.

- 617 doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159
- 618 Benincasa MMP (1988) *Análise de crescimento de plantas: noções básicas*. FUNEP,
619 Jaboticabal
- 620 Cantu-Jungles TM, Iacomini M, Cipriani TR, Cordeiro LMC (2017) Extraction and
621 characterization of pectins from primary cell walls of edible açai (*Euterpe oleraceae*)
622 berries, fruits of a monocotyledon palm. *Carbohydr Polym* 158:37–43. doi:
623 10.1016/j.carbpol.2016.11.090
- 624 Cattelan AJ (1999) *Métodos Qualitativos para Determinação de Características*
625 *Bioquímicas e Fisiológicas Associadas com Bactérias Promotoras do Crescimento*
626 *Vegetal*. Embrapa Soja 139:36.
- 627 Chaudhary SR, Sindhu SS (2016) Growth stimulation of clusterbean (*Cyamopsis*
628 *tetragonoloba*) by coinoculation with rhizosphere bacteria and *Rhizobium*. *Legum*
629 *Res - An Int J* 39:1003–1012. doi: 10.18805/lr.v0iOF.8605
- 630 Chauhan H, Bagyaraj DJ, Selvakumar G, Sundaram SP (2015) Novel plant growth
631 promoting rhizobacteria—Prospects and potential. *Appl Soil Ecol* 95:38–53. doi:
632 10.1016/j.apsoil.2015.05.011
- 633 Costa MR, Oliveira MDSP De, Ohaze MMM (2004) Divergência Genética No Açazeiro
634 Com Base Em Marcadores Rapd. *REv Ciênc Agrár* 41:89–95.
- 635 Döbereiner J, Day J (1976) Associative symbioses in tropical grasses: characterization of
636 microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: *Proceedings of the 1st international*
637 *symposium on nitrogen fixation*. Washington State University Press Pullman, pp
638 518–538
- 639 Dodd IC, Zinovkina NY, Safronova VI, Belimov AA (2010) Rhizobacterial mediation of
640 plant hormone status. *Ann Appl Biol* 157:361–379. doi: 10.1111/j.1744-
641 7348.2010.00439.x
- 642 Doni F, Isahak A, Che Mohd Zain CR, Wan Yusoff WM (2014) Physiological and growth
643 response of rice plants (*Oryza sativa* L.) to *Trichoderma* spp. inoculants. *AMB*
644 *Express* 4:45. doi: 10.1186/s13568-014-0045-8
- 645 Duarah I, Deka M, Saikia N, Deka Boruah HP (2011) Phosphate solubilizers enhance
646 NPK fertilizer use efficiency in rice and legume cultivation. *3 Biotech* 1:227–238.
647 doi: 10.1007/s13205-011-0028-2

- 648 Fan X, Hu H, Huang G, et al (2015) Soil inoculation with *Burkholderia* sp. LD-11 has
649 positive effect on water-use efficiency in inbred lines of maize. *Plant Soil* 390:337–
650 349. doi: 10.1007/s11104-015-2410-z
- 651 Filippi MCC, da Silva GB, Silva-Lobo VL, et al (2011) Leaf blast (*Magnaporthe oryzae*)
652 suppression and growth promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil. *Biol*
653 *Control* 58:160–166. doi: 10.1016/j.biocontrol.2011.04.016
- 654 Flexas J, Barbour MM, Brendel O, et al (2012) Mesophyll diffusion conductance to CO₂:
655 An unappreciated central player in photosynthesis. *Plant Sci* 193-194:70–84. doi:
656 10.1016/j.plantsci.2012.05.009
- 657 George P, Gupta A, Gopal M, et al (2013) Multifarious beneficial traits and plant growth
658 promoting potential of *Serratia marcescens* KiSII and *Enterobacter* sp. RNF 267
659 isolated from the rhizosphere of coconut palms (*Cocos nucifera* L.). *World J*
660 *Microbiol Biotechnol* 29:109–117. doi: 10.1007/s11274-012-1163-6
- 661 Glick BR (2012) *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications*.
662 *Scientifica* (Cairo) 2012:1–15. doi: 10.6064/2012/963401
- 663 Gül A, Özaktan H, Yolageldi L, Çakır B (2016) Rhizobacteria promoted growth and yield
664 of tomato plants and control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. In III
665 International Symposium on Organic Greenhouse Horticulture 1164 (pp. 345-352).
- 666 Haldar S, Sengupta S (2015) Plant-microbe Cross-talk in the Rhizosphere: Insight and
667 Biotechnological Potential. *Open Microbiol J* 9:1–7. doi:
668 10.2174/1874285801509010001
- 669 Hu X, Chen J, Guo J (2006) Two phosphate- and potassium-solubilizing bacteria isolated
670 from Tianmu Mountain, Zhejiang, China. *World J Microbiol Biotechnol* 22:983–
671 990. doi: 10.1007/s11274-006-9144-2
- 672 Jesus SV De, Marengo RA (2008) O SPAD-502 como alternativa para a determinação
673 dos teores de clorofila em espécies frutíferas. *Acta Amaz* 38:815–818. doi:
674 10.1590/S0044-59672008000400029
- 675 Kado CI, Heskett MG (1970) Selective Media for Isolation of *Agrobacterium*,
676 *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. *Phytopathology*
677 60:969. doi: 10.1094/Phyto-60-969
- 678 Kang SM, Khan AL, Hamayun M, et al (2012) Gibberellin-producing

- 679 Promicromonospora sp. SE188 improves *Solanum lycopersicum* plant growth and
680 influences endogenous plant hormones. *J Microbiol* 50:902–909. doi:
681 10.1007/s12275-012-2273-4
- 682 Kang SM, Khan AL, You YH, et al (2014) Gibberellin production by newly isolated
683 strain *Leifsonia soli* SE134 and Its potential to promote plant growth. *J Microbiol*
684 *Biotechnol* 24:106–112. doi: 10.4014/jmb.1304.04015
- 685 Krause GH, Weis E (1991) Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics.
686 *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 42:313–349. doi:
687 10.1146/annurev.pp.42.060191.001525
- 688 Lucas JA, García-Cristobal J, Bonilla A, et al (2014) Beneficial rhizobacteria from rice
689 rhizosphere confers high protection against biotic and abiotic stress inducing
690 systemic resistance in rice seedlings. *Plant Physiol Biochem* 82:44–53. doi:
691 10.1016/j.plaphy.2014.05.007
- 692 Malke H (1991) Z. Klement, K. Rudolph and D. C. Sands (Editors), *Methods in*
693 *Phytobacteriology*. XIV + 568 S., 135 Abb., 62 Tab. Budapest 1990. Akadémiai
694 Kaidó. Ft 1520.0 ISBN: 963-05-4955-7. *J Basic Microbiol* 31:148–148. doi:
695 10.1002/jobm.3620310214
- 696 Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence--a practical guide. *J Exp Bot*
697 51:659–668. doi: 10.1093/jexbot/51.345.659
- 698 Nascente AS, de Filippi MCC, Lanna AC, et al (2016) Biomass, gas exchange, and
699 nutrient contents in upland rice plants affected by application forms of
700 microorganism growth promoters. *Environ Sci Pollut Res* 24:2956–2965. doi:
701 10.1007/s11356-016-8013-2
- 702 Noor Ai'shah O, Tharek M, Keyeo F, et al (2013) Influence of indole-3-acetic acid (IAA)
703 produced by diazotrophic bacteria on root development and growth of in vitro oil
704 palm shoots (*Elaeis guineensis* Jacq.). *J Oil Palm Res* 25:100–107.
- 705 Oliveira MDSP, Neto JTDF (2004) Cultivar BRS-Pará: Açaizeiro para Produção de
706 Frutos em Terra Firme. *Embrapa, Comun Técnico* 114:1–3.
- 707 Om AC, Ghazali AHA, Keng CL, Ishak Z (2009) Microbial inoculation improves growth
708 of oil palm plants (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Trop Life Sci Res* 20:71–77.
- 709 Oxborough K, Baker NR (1997) Resolving chlorophyll a fluorescence images of

- 710 photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components -
711 Calculation of qP and F_v'/F_m' without measuring F_o' . *Photosynth Res* 54:135–142.
712 doi: 10.1023/A:1005936823310
- 713 Pan Y, Lu Z, Lu J, et al (2017) Effects of low sink demand on leaf photosynthesis under
714 potassium deficiency. *Plant Physiol Biochem* 113:110–121. doi:
715 10.1016/j.plaphy.2017.01.027
- 716 Park S, Jung YT, Won SM, Yoon, JH (2014). *Pseudoruegeria sabulilitoris* sp. nov.,
717 isolated from seashore sand. *International journal of systematic and evolutionary*
718 *microbiology*, 64(9), 3276-3281
- 719 Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE (1989) Determination of accurate extinction
720 coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted
721 with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll
722 standards by atomic absorption spectroscopy. *BBA - Bioenerg* 975:384–394. doi:
723 10.1016/S0005-2728(89)80347-0
- 724 Prasad AA, Babu S (2017) Compatibility of *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas*
725 *fluorescens* in growth promotion of groundnut (*Arachis hypogea* L.). *Anais da*
726 *Academia Brasileira de Ciências*, 89(2), 1027-1040.
- 727 Rais A, Shakeel M, Hafeez FY, Hassan MN (2016) Plant growth promoting rhizobacteria
728 suppress blast disease caused by *Pyricularia oryzae* and increase grain yield of rice.
729 *BioControl* 61:769–780. doi: 10.1007/s10526-016-9763-y
- 730 Shi Y, Lou K, Li C (2010) Growth and photosynthetic efficiency promotion of sugar beet
731 (*Beta vulgaris* L.) by endophytic bacteria. *Photosynth Res* 105:5–13. doi:
732 10.1007/s11120-010-9547-7
- 733 Silva Cravo M, Viégas IJM, Brasil EC (2007) Recomendações de adubação e calagem
734 para o Estado do Pará. EMBRAPA Amazonia Oriental, Bélem, PA (Brasil)
- 735 Silva F (2009) Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Embrapa
736 Informação Tecnológica, Brasília, DF (Brasil)
- 737 Silva PA, Cosme VS, Rodrigues KCB, et al (2017) Drought tolerance in two oil palm
738 hybrids as related to adjustments in carbon metabolism and vegetative growth. *Acta*
739 *Physiol Plant* 39:58. doi: 10.1007/s11738-017-2354-4
- 740 Silvestre WVD, Pinheiro HA, Souza RORDM, Palheta LF (2016) *Revista Brasileira de*

- 741 Engenharia Agrícola e Ambiental Morphological and physiological responses of
742 açaí seedlings subjected to different watering regimes Respostas morfológicas e
743 fisiológicas de mudas de açaizeiros submetidas à diferentes regimes hídricos. 364–
744 371.
- 745 Sousa TP, Souza ACA, Filippi MCC, Lanna AC, Cortês MV, Pinheiro HA, Silva, GB
746 (2018) Bioagents and silicon promoting fast early upland rice growth.
747 Environmental Science and Pollution Research, 25(4), 3657-3668.
- 748 Suresh K, Nagamani C, Kantha DL, Kumar MK (2012) Changes in photosynthetic
749 activity in five common hybrids of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) seedlings under
750 water deficit. *Photosynthetica* 50:549–556. doi: 10.1007/s11099-012-0062-2
- 751 Sylvester-Bradley R, Asakawa N, La TS, et al (1982) Levantamento quantitativo de
752 microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas
753 forrageiras na Amazônia. *Acta Amaz* 12:15–22.
- 754 Teather RM, Wood PJ (1982) Use of Congo red-polysaccharide interactions in
755 enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen.
756 *Appl Environ Microbiol* 43:777–780. doi: 0099-2240/82/040777-04\$02.00/0
- 757 Van Loon LC (2007) Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur J Plant*
758 *Pathol* 119:243–254. doi: 10.1007/s10658-007-9165-1
- 759 Velásquez E, Rodríguez-Barrueco C (2007) First International Meeting on Microbial
760 Phosphate Solubilization. Springer Netherlands, Dordrecht
- 761 Wang, P, Zhang C, Guo, M, Guo S, Zhu Y, Zheng, J, et al. (2014) Complete genome
762 sequence of *Bacillus thuringiensis* YBT-1518, a typical strain with high toxicity to
763 nematodes. *Journal of biotechnology*, 171, 1-2
- 764 Wolff WM, Floss EL (2008) Correlação entre teores de nitrogênio e de clorofila na folha
765 com o rendimento de grãos de aveia branca. *Ciência Rural* 38:1510–1515. doi:
766 10.1590/S0103-84782008000600003
- 767 Yamaguchi KKDL, Pereira LFR, Lamarão CV, et al (2015) Amazon acai: Chemistry and
768 biological activities: A review. *Food Chem* 179:137–151. doi:
769 10.1016/j.foodchem.2015.01.055
- 770 Yu Z, Bai P, Ye W, Zhang F, Ruan L, Sun M (2008). A novel negative regulatory factor
771 for nematocidal Cry protein gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *J. Microbiol.*

772 Biotechnol, 18(6), 1033-1039.

773 Zhang K, Liu Z, Shan X, et al (2017) Physiological properties and chlorophyll
774 biosynthesis in a Pak-choi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis*) yellow leaf mutant, *pym*.
775 *Acta Physiol Plant* 39:22. doi: 10.1007/s11738-016-2321-5

776

777

778

779

780

781

782

783

784

785

786

787

788

789

790

791

792

793

794

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

**CAPÍTULO 3. RIZOBACTÉRIAS PROTEGEM O APARATO
FOTOSSINTÉTICO E ALIVIAM OS EFEITOS DO DÉFICIT HÍDRICO EM
MUDAS DE AÇAIZEIRO***

36

LISTA DE ABREVIATURAS

37

AIA	Ácido indolacético
ABA	Ácido abscísico
A/E	Eficiência instantânea do uso da água
A	Taxa de assimilação líquida de CO ₂
ACP	Análise de componentes principais
APX	Ascorbato peroxidase
ATP	Adenosina trifosfato
BRM-32111	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
BRM-32113	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>
CAT	Catalase
CC	Capacidade de campo
C _i	Concentração intercelular de CO ₂
CP1	Componente principal 1
CP2	Componente principal 2
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPV	Déficit de pressão de vapor do ar
E	Taxa de transpiração
ETR	Taxa de transporte de eletrons
F _o	Fluorescência inicial
F _m	Fluorescência máxima
F _v '/F _m '	Eficiência fotoquímica efetiva
F _v /F _o	Atividade potencial do fotossistema II
g _s	Condutância estomática ao vapor d'água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
MDA	Aldeído malônico
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida
O ₂ ⁻	Radical superóxido
HO ⁻	Radical hidroxila
PAR	Radiação fotossinteticamente ativa
PGPR	Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas
PSII	Fotossistema II
Ψ _w	Potencial hídrico
qP	Coefficiente de dissipação fotoquímica
qN	Coefficiente de dissipação não fotoquímica
R-58	<i>Bacillus thuringiensis</i> YBT-1518
R-92	<i>Pseudoruegeria sabulilitoris strain</i> GJMS-35
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SNK	Student-Newman-Keuls
SOD	Superóxido dismutase
UFC	Unidade Formadora de Colônia

38

LISTA DE FIGURA

39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69

Figura 1. (A) Análise de componentes principais - ACP para as variáveis de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, potencial hídrico, enzimas antioxidantes e MDA e, (B) agrupamento por ACP conforme a semelhança de comportamento das rizobactérias inoculadas em mudas de açazeiro em 50% CC.

LISTA DE TABELAS

70

71

Tabela 1. Código de identificação, origem, cor, características bioquímicas e classificação taxonômica dos sete isolados de rizobactérias utilizadas no tratamento das mudas de açaizeiro.

Tabela 2. Potencial hídrico (Ψ_w), taxa de assimilação líquida de CO_2 (A), condutância estomática ao vapor d'água (g_s), transpiração (E), concentração intercelular de CO_2 (C_i) e eficiência do uso da água (A/E) em mudas de açaizeiro (cinco meses de idade) inoculadas com rizobactérias e submetidas à 100, 75, 50 e 25% da capacidade de campo.

Tabela 3. Fluorescência inicial (F_o), fluorescência máxima (F_m), eficiência fotoquímica efetiva do PSII (F_v/F_m), atividade potencial do PSII (F_v/F_o), taxa de transferência de elétrons (ETR) e coeficiente de extinção fotoquímica (qP) e não fotoquímica (qN) em mudas de açaizeiro (cinco meses de idade) inoculadas com rizobactérias e submetidas à 100, 75, 50 e 25% da capacidade de campo.

Tabela 4 Atividades da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) e, teor de aldeído malônico (MDA) em mudas de açaizeiro (cinco meses de idade) inoculadas com rizobactérias e submetidas a 100 e 50% da Capacidade de Campo (CC).

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

85

86

87

88

89 **3. RIZOBACTÉRIAS PROTEGEM O APARATO FOTOSSINTÉTICO E**
90 **ALIVIAM OS EFEITOS DO DÉFICIT HÍDRICO EM MUDAS DE AÇAIZEIRO***

91

92 ***Artigo 2: Normas da revista Plant physiology and biochemistry**

93

94 **RESUMO**

95 A sensibilidade ao déficit hídrico diminui drasticamente a produção de mudas de
96 açaizeiro em viveiros. O objetivo do estudo foi avaliar as trocas gasosas, fluorescência da
97 clorofila *a*, peroxidação lipídica e enzimas antioxidantes em mudas de açaizeiro
98 inoculadas com rizobactérias. Foram inoculados quatro isolados de rizobactérias (R-58,
99 R-92, BRM-32111 e BRM-32113) e um controle (sem inoculação) em mudas de açaizeiro
100 submetidas as capacidades de campo (CC) de 100%, 75%, 50% e 25%. O déficit hídrico
101 reduziu o desempenho fotossintético em todas as mudas de açaizeiro, porém, em menor
102 magnitude nas mudas inoculadas com rizobactérias. Em 75% CC, todas as mudas
103 inoculadas mantiveram maior potencial hídrico, trocas gasosas e fluorescência da
104 clorofila *a* e, em 50% CC, somente as mudas inoculadas com BRM-32111 e BRM-32113
105 conseguiram manter essas vantagens em relação ao controle. Em 25%CC não houve
106 efeito da inoculação das rizobactérias. Em 50%CC o aumento de atividade da CAT foi
107 induzido pela R-58. A atividade da APX foi maior para R-92, enquanto a atividade da
108 SOD foi maior apenas BRM-32113. O teor de MDA foi maior apenas para o controle. A
109 manutenção do desempenho fotossintético e o alívio do estresse oxidativo evidenciam
110 que as mudas de açaizeiro inoculadas com rizobactérias podem atenuar os efeitos do
111 déficit hídrico, contribuindo para diminuir a taxa de mortalidade das mudas em viveiros
112 e aumentar a disponibilidade de mudas para implantação de plantios comerciais.

113

114 **Palavras-chave:** *Euterpe oleracea*, bioestimulante, fotossíntese, estresse oxidativo

115

116

117

118

119

120 **RIZOBACTERIA PROTECT THE PHOTOSYNTHETICAL APPARATUS AND**
121 **DELAYED THE WATER DEFICIT EFFECTS ON AÇAÍ PALM SEEDLINGS**

122

123 **ABSTRACT**

124 Sensitivity to water deficit drastically reduces the production of açai palm seedlings in
125 nurseries. The objective of this study was to evaluate gas exchange, chlorophyll *a*
126 fluorescence, lipid peroxidation and antioxidant enzymes in acai palm seedlings
127 inoculated with rhizobacteria. Four isolates of rhizobacteria (R-58, R-92, BRM32111 and
128 BRM32113) and one control (without inoculation) were inoculated on acai palm
129 seedlings submitted to 100%, 75%, 50 % and 25% field capacities (CC). The water deficit
130 reduced photosynthetic performance in all açai palm seedlings, but to a lesser extent in
131 seedlings inoculated with rhizobacteria. In 75% CC, all inoculated seedlings presented
132 higher water potential, gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence and, in 50% CC,
133 only the seedlings inoculated with BRM32111 and BRM32113 managed to maintain
134 these advantages in relation to the control. In 25% CC there was no effect of rhizobacteria
135 inoculation. At 50% CC the increase in CAT activity was induced by R-58. APX activity
136 was higher for R-92, whereas SOD activity was higher only for BRM-32113. MDA
137 content was higher only for control. The maintenance of the photosynthetic performance
138 and the relief of oxidative stress evidenced that açai palm seedlings inoculated with
139 rhizobacteria can alleviate the effects of water deficit, contributing to decrease the
140 mortality rate of seedlings in nurseries and to increase the availability of seedlings for
141 planting commercial plantations.

142

143 **Key words:** *Euterpe oleracea*, biostimulant, photosynthesis, oxidative stress

144

145

146

147

148

149

150

151 3.1 Introdução

152 O açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma palmeira nativa da região amazônica
153 e de grande interesse econômico no mercado nacional e internacional (Oliveira et al.
154 2016). O Brasil é o maior produtor mundial, sendo o estado do Pará o maior produtor
155 nacional do fruto de açaí (Oliveira and Neto 2004). O alto consumo dos frutos estimulou
156 a expansão dos plantios comerciais em grandes áreas de terra firme (Rufino et al. 2011).
157 Porém, a irrigação inadequada em viveiros e a alta sensibilidade das mudas de
158 açazeiro ao déficit hídrico provocam reduções drásticas na produção de mudas e limitam
159 a implantação de plantios comerciais (Silvestre et al. 2016).

160 O déficit hídrico atua como fator limitante do crescimento das plantas, pois afeta
161 as relações hídricas e ocasiona alterações nos processos fisiológicos (Calbo and Moraes
162 2000; Kasim et al. 2013; Barbosa et al. 2017). As plantas diminuem a abertura estomática
163 para reduzir a perda de água através da transpiração (Medrano et al. 2002), porém,
164 aumentam a resistência à entrada do CO₂ nas folhas e provocam reduções na fotossíntese
165 líquida (Flexas et al. 2012). Em mudas de palma de óleo submetidas ao déficit hídrico, as
166 reduções da taxa fotossintética, condutância estomática e transpiração limitaram o
167 crescimento das mudas (Silva et al. 2017).

168 Várias estratégias têm sido utilizadas para amenizar os efeitos do déficit hídrico,
169 tais como a criação de variedades tolerantes e a engenharia genética (Kasim et al. 2013).
170 Contudo, a pouca disponibilidade de sementes e material genético diferenciado dificultam
171 a criação de novas variedade de açazeiro tolerantes ao déficit hídrico. Uma estratégia
172 alternativa para induzir tolerância ao estresse hídrico pode ser o uso das rizobactérias
173 promotoras do crescimento de plantas (PGPR), pois estimulam o crescimento das raízes
174 para melhorar a eficiência de absorção de água e nutrientes, como observado em plantas
175 de arroz (Yuwono et al. 2005), milho (Gou et al. 2015) e trigo (Gontia-Mishra et al. 2016)
176 inoculadas com PGPR.

177 As PGPR podem induzir alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas que
178 são favoráveis para o aumento de tolerância ao déficit hídrico (Wang et al. 2014). O maior
179 sistema radicular induzido pelas PGPR melhora a absorção de água e nutrientes e,
180 consequentemente, amenizam os efeitos do déficit hídrico (Saravanakumar et al. 2011).
181 Para Silvestre et al. (2016), o maior sistema radicular em mudas de açazeiro é uma
182 estratégia de tolerância ao déficit hídrico e pode contribuir para a adaptação das mudas
183 durante os meses mais secos.

184 Estudos relatam que plantas inoculadas com PGPR são mais tolerantes aos efeitos
185 do déficit hídrico porque conseguem regular a abertura estomática para atenuar a

186 diminuição do potencial hídrico nas folhas (Saravanakumar et al. 2011; Wang et al. 2014).
187 As PGPR induzem alterações coordenadas na transpiração, conteúdo de ácido abscísico
188 e fotossíntese, resultando em maior eficiência do uso da água em plantas submetidas ao
189 déficit hídrico (Bresson et al. 2013). Outros benefícios induzidos pelas PGPR envolvem
190 o alívio do estresse osmótico através da produção de metabólitos osmoprotetores como
191 betaínas, prolina e trealose, e a proteção contra o estresse oxidativo provocado pelas
192 espécies reativas de oxigênio através das enzimas antioxidantes como SOD, CAT e APX
193 (Forni et al. 2016). A maior proteção do aparato fotossintético, proporcionado pelas
194 enzimas antioxidantes, influenciam na manutenção do maior desempenho fotossintético
195 em plantas submetidas ao déficit hídrico (Gagné-Bourque et al. 2016).

196 A melhoria no aparato fotossintético induzido pelas PGPR pode ser avaliada pelos
197 principais parâmetros fluorescência, como fluorescência inicial (F_o), fluorescência
198 máxima (F_m), eficiência fotoquímica máxima do PSII (F_v/F_m), atividade potencial do PSII
199 (F_v/F_o), rendimento quântico do PSII (Φ PSII), coeficientes de dissipação fotoquímica
200 (qP) e não fotoquímica (qP) e taxa de transporte de elétrons (ETR) (Baker 2008). Esses
201 parâmetros permitem descrever o desempenho fotossintético e podem ser utilizados para
202 avaliar a indução de tolerância ao déficit hídrico por PGPR.

203 A sensibilidade ao déficit hídrico diminui drasticamente a produção de mudas de
204 açaizeiro em viveiros. Contudo, a inoculação das rizobactérias pode ser uma alternativa
205 para aliviar os efeitos do déficit hídrico em mudas de açaizeiro. Objetivo do estudo foi
206 avaliar os efeitos do déficit hídrico em mudas de açaizeiro inoculadas com rizobactérias,
207 utilizando as trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a* e atividade enzimática
208 antioxidante como ferramentas para mensurar o desempenho fotossintético e o estresse
209 oxidativo.

210

211 **3.2 Materiais e métodos**

212 **Material vegetal**

213 Sementes de açaí do cultivar BRS-Pará foram semeadas em bandejas de plástico
214 contendo 2,5 L de substrato composto de fibra de coco triturada (Golden mix). Aos 32
215 dias após a germinação, as plântulas que apresentaram duas folhas expandidas e altura
216 próxima de 13 cm foram transplantadas para sacos de plástico (15 x 25 cm, comprimento
217 x altura) contendo substrato composto de 60% de Oxisol e 40% de cama de aviário
218 curtida. O cultivo foi realizado no viveiro da Universidade Federal Rural da Amazônia
219 em Belém, PA, que apresenta características climáticas do tipo AMI de acordo com a
220 classificação de Koppen-Geiger. Durante o período experimental (agosto a dezembro de

2016) as condições ambientais foram de 32 ± 2 °C de temperatura do ar, $75 \pm 5\%$ de umidade relativa, $2 \pm 0,2$ kPa de DPV do ar e $800 \pm 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiação incidente. O pH do substrato e as concentrações de macro e micronutrientes foram ajustadas conforme recomendado para açaizeiros (Silva Cravo et al. 2007). As plantas foram irrigadas diariamente por gotejamento autocompensante para repor a água perdida pela evapotranspiração e manter a umidade do solo próximo da capacidade de campo (Klar et al. 1966).

228

229 **Caracterização das rizobactérias**

230 As rizobactérias provenientes de açaizeiro (R-58 e R-92) e plantas de arroz
231 (BRM32111 e BRM32113) estão descritas na tabela 1, e estão armazenadas e preservadas
232 na coleção de microrganismos do Laboratório de Proteção de Plantas da Universidade
233 Federal Rural da Amazônia, Belém, PA, Brasil.

234

Tabela 1. Código de identificação, origem, cor, características bioquímicas e classificação taxonômica dos sete isolados de rizobactérias utilizadas no tratamento das mudas de açaizeiro.

Código ^a	Origem ^b	Cor ^c	Bioquímica ^c					Taxonomia ^c
			AIA ^d	Celu. ^e	Fosf. ^f	Sider. ^g	Fix. N ^h	
BRM-32113	PA/Brasil	Rosa	+	+	-	+	-	<i>Burkholderia pyrrocinia</i> *
BRM-32111	PA/Brasil	Amarela	-	+	+	+	-	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
R-58	AM/Brasil	Amarelo	-	+	-	-	-	<i>Bacillus thuringiensis</i>
R-92	AM/Brasil	Amarelo	-	-	-	-	-	<i>Pseudoruegeria sabulilitoris</i>

^aCódigo de identificação das rizobactérias na coleção de microrganismos do Laboratório de Proteção de Plantas da Universidade Federal Rural da Amazônia. ^bOrigem geográfica de cada rizobactéria. ^cCor da colônia (Malke 1991). ^dClassificação taxonômica (*Nascente et al. 2016). ^eProdução de ácido indol acético (Cattelan 1999). ^fProdução de celulase (Teather and Wood 1982). ^gSolubilização de fosfato (Sylvester-Bradley et al. 1982). ^hProdução de sideróforos e ⁱFixação de nitrogênio (Döbereiner and Day 1976).

235

236 **Inoculação das rizobactérias**

237 As rizobactérias foram cultivadas em meio sólido 523 (Kado and Heskett 1970)
238 durante 48 h a 28 °C. As suspensões bacterianas foram preparadas com água destilada e
239 esterilizada, e a concentração foi ajustada em espectrofotômetro para $A_{540} = 0,5$ (10^8
240 UFC). As plântulas tiveram suas raízes seccionadas para padronização do comprimento
241 radicular em 7 cm e, antes do transplante para os sacos plásticos com o substrato, foram
242 imersas em 500 ml de cada suspensão bacteriana durante 20 min. As plântulas controle

243 foram imersas em água destiladas e esterilizada. Em seguida, foi realizada uma irrigação
244 por semana durante um mês com 50 mL/plântula de cada suspensão bacteriana para
245 plantas tratadas, e com 50 mL/plântula de água destilada e esterilizada para as plantas
246 controle. Após esse período, foi mantida uma irrigação a cada mês até o terceiro mês de
247 idade das mudas de açaizeiro.

248

249 **Imposição do déficit hídrico**

250 A imposição do déficit hídrico foi realizada aos três meses após a inoculação das
251 rizobactérias. As plantas foram irrigadas diariamente para manter o solo próximo de
252 100% da capacidade de campo (CC), o qual foi obtida através da pesagem dos sacos +
253 solo + muda, conforme descrito por Klar et al. 1966. Em seguida, a irrigação foi suspensa
254 e o conjunto sacos + solo + muda foram pesados diariamente até atingirem,
255 gradativamente, as capacidades de campo (CC) de 75, 50 e 25%, onde foram realizadas
256 as avaliações para cada CC. Após a suspensão da irrigação, as capacidades de campo
257 foram alcançadas a cada dois dias, aproximadamente, totalizando oito dias para atingir
258 25% CC. As condições ambientais do viveiro foram de 34 ± 1 °C de temperatura do ar,
259 $56 \pm 5\%$ de umidade relativa do ar, $463 \pm 132 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiação incidente e déficit
260 de pressão de vapor de ar de $2,6 \pm 0,6$ kpa.

261

262 **Trocas gasosas**

263 Os parâmetros de trocas gasosas foram medidos na segunda folha
264 fisiologicamente madura e completamente expandida, do ápice para a base, aos três meses
265 após a inoculadas das rizobactérias nas mudas de açaizeiro. A assimilação líquida de CO₂
266 (*A*), condutância estomática ao vapor de água (*g_s*), concentração intercelular de CO₂ (*C_i*),
267 taxa de transpiração (*E*) e eficiência instantânea do uso da água (*A/E*) foram medidos
268 entre 08:00 e 10:00 h usando um sistema de troca de gás de fluxo aberto portátil (LI-
269 6400XT, LI-COR, Lincoln, NE) sob uma concentração externa de CO₂ de $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$
270 de ar e PAR artificial de $900 \mu\text{mol de fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Este intervalo de medição (08:00 -
271 10:00 h) foi ajustado de acordo com os resultados obtidos com a curva diurna de trocas
272 gasosas para a espécie (Silvestre et al. 2016). Todas as medidas foram realizadas com
273 temperatura do ar de 34 ± 1 ° C, umidade relativa do ar de $56 \pm 5\%$, radiação incidente
274 de $463 \pm 132 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e déficit de pressão de vapor de ar de $2,6 \pm 0,6$ kPa. A
275 quantidade de luz azul foi ajustada para 10% do PAR para otimizar a abertura estomática.

276

277 **Fluorescência da clorofila *a***

278 A fluorescência da clorofila *a* foi determinada simultaneamente com as trocas
 279 gasosas utilizando-se uma câmara de fluorescência (IG 6400-40; LI-COR Inc.) integrada
 280 ao sistema portátil de fluxo aberto de trocas gasosas. As folhas adaptadas no escuro
 281 durante 20 min foram iluminadas com um pulso de luz fraca e modulada ($0,03 \mu\text{mol m}^{-2}$
 282 s^{-1}) para obter a fluorescência inicial (F_o). Um pulso de luz branca saturante de 6.000
 283 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi aplicado durante 0,8s para garantir a máxima emissão de fluorescência
 284 (F_m). As folhas amostradas foram então iluminadas durante 300s com uma luz actínia
 285 ($250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para obter o rendimento da fluorescência no estado estacionário (F_s).
 286 Posteriormente, pulsos de luz branca saturantes foram aplicados para atingir a
 287 fluorescência máxima (F_m'). A luz actínia foi então desligada e uma iluminação
 288 vermelho-distante ($2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foi aplicado para medir a fluorescência inicial adaptada
 289 na luz (F_o'). A partir dessas medições, os seguintes parâmetros foram calculados:
 290 atividade potencial do PSII [$F_v/F_o = (F_m - F_o) / F_o$], eficiência fotoquímica efetiva do PSII
 291 [$F_v/F_m' = (F_m' - F_o') / F_m'$] (Oxborough and Baker 1997), coeficientes de dissipação
 292 fotoquímica [$q_p = (F_m' - F_s) / (F_m' - F_o')$] e não-fotoquímica [$\text{NPQ} = (F_m/F_m') - 1$] e, taxa de
 293 transferência de elétrons ($\text{ETR} = \phi\text{PSII} \cdot \text{PPFD} \cdot f \cdot \alpha$) (Maxwell and Johnson 2000).

294

295 **Potencial hídrico**

296 Simultaneamente as avaliações das trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*,
 297 a terceira folha foi coletada para a mensuração do potencial hídrico (Ψ_w), realizada com
 298 uma bomba de pressão do tipo Scholander (m 670, Pms Instrument Co., Albany, EUA)
 299 conforme descrito por Pinheiro et al. (2008).

300

301 **Peroxidação lipídica**

302 A peroxidação lipídica foi mensurada pelos teores de aldeído malônico (MDA),
 303 extraídos conforme descrito por Cakmak e Horst (1991). Amostras do tecido vegetal
 304 congeladas (20 mg) foram trituradas em tubos eppendorf e homogeneizadas em 250 μL
 305 de ácido tricloroacético 0,1% (p/v) e o homogenato centrifugado a $15.000 \times g$, por 15
 306 min, a 4°C . O sobrenadante foi coletado e a uma alíquota de 50 μL deste foi adicionado
 307 150 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5% (preparado em ácido tricloroacético 20%).
 308 Os tubos foram agitados em vórtex e incubados a 90°C , por 20 min. A reação foi
 309 paralisada por imersão dos tubos em banho de gelo e a mistura clarificada por
 310 centrifugação a $13.000 \times g$, por 4 min, a 4°C . A absorbância (ABS) das amostras foi
 311 determinada em um espectrofotômetro (Multiskan GO 3.2) a 532 e a 600 nm, em que 532
 312 nm representam a máxima absorção do complexo MDA-TBA e a ABS inespecífica (600

313 nm) descontada. O coeficiente de extinção molar do MDA ($155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) foi utilizado
314 para os cálculos e os resultados expressos em nmol MDA g^{-1} de matéria fresca (MF).

315

316 **Enzimas antioxidantes**

317 A extração da dismutase do superóxido (SOD, E.C. 1.15.1.1) foi realizada a partir
318 de 20 mg de massa fresca homogeneizados em 200 μL do meio de extração, contendo
319 100 mM de tampão fosfato de potássio (TFK; pH 7,8); 0,1 mM de EDTA; 0,1% (v/v) de
320 2-Mercaptoetanol; 0,001% (v/v) de Triton X-100; 0,001 mg de Polivinilpirrolidona
321 (PVP) e 20 mM de ascorbato. Após centrifugação a $15.000 \text{ g}/15 \text{ min}/4^\circ\text{C}$, o sobrenadante
322 foi coletado para as análises posteriores. A atividade da SOD foi determinada segundo
323 Giannopolitis e Ries (1977). O meio de reação foi constituído de: 52,5 mM de TFK (pH
324 7,8); 0,1 μM de EDTA; 13 mM de metionina (pH 7,8); 2 μM de riboflavina; 0,075 mM
325 de azul de nitrotetrazólio (NBT) e uma alíquota de 5 μL do extrato enzimático. A
326 produção de formazana azul proveniente da redução do NBT em presença de luz é
327 máxima na ausência da enzima e foi acompanhada em um espectrofotômetro,
328 monitorando-se o incremento na absorbância (ABS) a 560 nm. A atividade da SOD foi
329 relacionada à capacidade da enzima presente no extrato em inibir a produção de
330 formazana azul. Os resultados foram expressos em unidades de SOD mg^{-1} proteína,
331 considerando-se que 1 unidade de SOD é a quantidade de enzima requerida capaz de
332 reduzir em 50% a produção de formazana azul.

333 A peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11) e a catalase (CAT, EC 1.11.1.6)
334 foram extraídas a partir de 20 mg de massa fresca trituradas em, 200 μL do meio de
335 extração contendo 50 mM de TFK (pH 7,0); 2 mM de EDTA; 0,001% (v/v) de Triton X-
336 100; 14 mM de 2-Mercaptoetanol; 20 mM de ascorbato e 0,001 g de PVP. Após
337 centrifugação a $15.000 \times \text{g}$, por 15 min. a 4°C , o sobrenadante foi coletado para as análises
338 enzimáticas. A atividade da APX foi acompanhada pelo decréscimo da ABS a 290 nm
339 em um meio de reação constituído de TFK 50 mM (pH 7,0); 0,1 mM de H_2O_2 ; 0,5 mM
340 de ascorbato e 3 μL do extrato enzimático (Nakano e Asada, 1981). Para os cálculos, 1
341 unidade (U) de APX é a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μmol de ascorbato min^{-1} .
342 O meio de reação da CAT foi constituído de 50 mM de TFK (pH 7,0) e H_2O_2 12,5 mM;
343 e a reação será iniciada pela adição de 3 μL de extrato. A atividade da CAT foi
344 determinada pelo monitoramento do decréscimo da ABS a 240 nm (Havir e Mchale,
345 1987) e para os cálculos será considerado que 1 U de CAT é a quantidade de enzima
346 capaz de oxidar 1 μmol de $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}$.

347 As dosagens de proteínas para os cálculos das atividades enzimáticas da SOD,
348 APX e CAT foram realizadas segundo Bradford (1976).

349

350 **Análise estatística**

351 O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado. Os
352 tratamentos foram compostos pela inoculação dos quatro isolados de rizobactérias e um
353 controle (sem rizobactéria) em mudas de açaizeiro submetidas as capacidades de campo
354 (CC) de 100, 75, 50 e 25%. Os isolados e controle foram comparados dentro de cada CC
355 (%), pela análise de variância e teste de médias de Student-Newman-Keuls (SNK), $P \leq$
356 0,05. Os dados bioquímicos para 100 e 50% CC foram submetidos a análise de variância
357 e as médias foram comparadas pelos testes SNK, $P \leq 0,05$. A análise de componentes
358 principais (ACP) foi realizada para todos os dados em 50% CC.

359

360 **3.3 Resultados**

361 **Trocas gasosas**

362 Em 100% CC, os valores de A , g_s e E foram maiores em média de 38, 58 e 57%,
363 respectivamente, nas mudas inoculadas com rizobactérias em relação ao controle. Para C_i
364 não houve influência da inoculação e, A/E foi menor em média de 12% para BRM-32113
365 e BRM-32111 em relação ao controle. Em 75% CC, as mudas inoculadas foram
366 superiores, com aumentos médios para A , g_s , E e C_i de 43, 57, 63 e 25% em relação ao
367 controle, respectivamente. Em 50% CC, as mudas inoculadas com BRM-32113, BRM-
368 32111 e R-58 foram maiores em média de 87% para A em relação ao controle. Entretanto,
369 apenas BRM-32113 e BRM-32111 foram maiores para g_s e E , com aumentos médios de
370 58 e 16% em relação ao controle, respectivamente. O C_i foi maior em média de 44% para
371 BRM-32111, BRM-32113 e R-58 em relação ao controle. A/E foi maior em média de
372 57% para todas as mudas inoculadas em relação ao controle. Em 25% CC não houve
373 influência da inoculação das rizobactérias (Tabela 2).

374

375

376

377

378

379

380

381

Tabela 2. Potencial hídrico (Ψ_w), taxa de assimilação líquida de CO_2 (A), condutância estomática ao vapor d'água (g_s), transpiração (E), concentração intercelular de CO_2 (C_i) e eficiência do uso da água (A/E) em mudas de açaizeiro (cinco meses de idade) inoculadas com rizobactérias e submetidas à 100, 75, 50 e 25% da capacidade de campo.

^a CC (%)	^b Isolados	Parâmetros					
		Ψ_w (Mpa)	A ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	g_s ($\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	E ($\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	C_i ($\mu\text{mol mol}^{-1}$)	A/E
100	BRM32113	-0,32 a	9,42 a	0,094 a	1,66 a	200,09 a	5,68 b
	BRM32111	-0,33 a	10,23 a	0,093 a	1,69 a	223,95 a	6,07 b
	R-58	-0,30 a	9,49 a	0,088 a	1,47 a	243,63 a	6,47 ab
	R-92	-0,33 a	9,98 a	0,082 a	1,58 a	218,47 a	6,40 ab
	Controle	-0,36 a	7,08 b	0,056 b	1,01 b	237,48 a	6,69 a
	^c CV (%)	12,31	6,78	11,81	12,01	10,05	7,01
75	BRM32113	-0,97 a	7,88 a	0,067 c	1,83 b	183,51 a	4,32 a
	BRM32111	-1,14 a	8,45 a	0,087 a	2,09 a	166,55 a	4,03 b
	R-58	-0,99 a	7,95 a	0,077 b	2,07 a	201,91 a	3,84 b
	R-92	-1,05 a	7,79 a	0,080 ab	2,24 a	175,51 a	3,49 c
	Controle	-1,38 b	5,59 b	0,049 d	1,26 c	145,09 b	4,45 a
	CV (%)	11,26	5,74	6,90	7,86	13,37	3,96
50	BRM32113	-1,23 a	7,79 a	0,068 a	1,88 a	251,12 a	4,15 a
	BRM32111	-1,20 a	6,70 b	0,058 a	1,76 a	223,79 a	4,24 a
	R-58	-1,45 b	4,69 c	0,031 b	1,01 b	220,82 a	4,63 a
	R-92	-1,56 c	3,99 cd	0,027 b	0,97 b	143,34 b	4,08 a
	Controle	-1,64 c	3,45 d	0,029 b	1,21 b	161,03 b	2,72 b
	CV (%)	5,71	12,64	16,56	11,30	14,55	10,79
25	BRM32113	-1,62 a	2,56 a	0,015 a	0,55 a	300,31 a	5,35 a
	BRM32111	-1,76 a	2,42 a	0,014 a	0,49 a	306,56 a	5,21 a
	R-58	-1,80 a	1,67 a	0,008 a	0,28 a	325,87 a	5,92 a
	R-92	-1,75 a	1,58 a	0,007 a	0,26 a	312,49 a	5,15 a
	Controle	-1,70 a	1,87 a	0,009 a	0,40 a	313,96 a	4,96 a
	CV (%)	11,83	21,79	27,65	31,09	8,38	14,04

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de SNK a 5% de probabilidade. ^aCapacidade de campo (%). ^bIsolados de rizobactérias. ^cCoefficiente de variação.

382

383 Fluorescência da clorofila *a*

384 Em 100% CC, as mudas inoculadas com rizobactérias aumentaram F_m , F_v'/F_m' ,
 385 F_v/F_o , ETR e qP em médias de 14, 8, 111, 34 e 30%, respectivamente, em relação ao
 386 controle. Entretanto, F_o e qN diminuíram em média de 44 e 7%, respectivamente, em
 387 relação ao controle. Em 75% CC o comportamento foi semelhante à 100% CC para F_m ,
 388 F_v'/F_m' , F_v/F_o , ETR e qP , com aumentos médios de 19, 10, 116, 35 e 29%,
 389 respectivamente, nas mudas inoculadas em relação ao controle. Para F_o e qN , as reduções
 390 médias foram de 42 e 6%, respectivamente, nas mudas inoculadas em relação as mudas

391 controle. Em 50% CC, apenas as mudas inoculadas com BRM32113 e BRM32111
 392 aumentaram F_m , F_v/F_o e qP , em média de 28, 208 e 47%, respectivamente, em relação ao
 393 controle. Para F_o e qN , as reduções médias foram de 51 e 8%, respectivamente, em
 394 comparação ao controle. Entretanto, todas as mudas inoculadas com rizobactérias
 395 aumentaram F_v'/F_m' e ETR, em média de 9 e 59%, respectivamente, em comparação ao
 396 controle. Em 25% CC, apenas as mudas inoculadas com BRM32111 mantiveram
 397 aumentos médios de F_v'/F_m' e F_v/F_o em 8 e 45%, respectivamente, em relação ao controle
 398 (Tabela 3).
 399

Tabela 3. Fluorescência inicial (F_o), fluorescência máxima (F_m), eficiência fotoquímica efetiva do PSII (F_v'/F_m'), atividade potencial do PSII (F_v/F_o), taxa de transferência de eletrons (ETR) e coeficiente de extinção fotoquímica (qP) e não fotoquímica (qN) em mudas de açaizeiro (cindo meses de idade) inoculadas com rizobactérias e submetidas à 100, 75, 50 e 25% da capacidade de campo.

^a CC (%)	^b Isolados	Parâmetros						
		F_o	F_m	F_v'/F_m'	F_v/F_o	ETR	qP	qN
100	BRM32113	130,4 b	2009,6 a	0,84 a	14,82 a	73,3 a	0,23 a	0,77 a
	BRM32111	133,4 b	2069,9 a	0,84 a	14,66 a	79,1 a	0,25 a	0,75 a
	R-58	129,9 b	2008,4 a	0,84 a	13,46 a	78,3 a	0,23 a	0,77 a
	R-92	136,6 b	2008,5 a	0,83 a	12,57 a	78,4 a	0,24 a	0,76 a
	Controle	238,3 a	1772,8 b	0,77 b	6,56 b	57,5 b	0,18 b	0,82 b
	^c CV (%)		19,25	4,69	1,76	17,88	7,06	8,21
75	BRM32113	192,99 b	2125,67 a	0,81 a	10,28 a	66,37 a	0,23 a	0,77 b
	BRM32111	168,06 b	2289,01 a	0,83 a	13,19 a	68,68 a	0,22 a	0,77 b
	R-58	170,74 b	2223,23 a	0,83 a	12,33 a	74,47 a	0,24 a	0,76 b
	R-92	161,91 b	2102,72 a	0,83 a	12,17 a	72,41 a	0,23 a	0,76 b
	Controle	301,40 a	1843,61 b	0,75 b	5,22 b	52,14 b	0,18 b	0,81 a
	CV (%)		17,06	6,00	2,05	22,29	9,32	9,25
50	BRM32113	181,6 b	2242,8 a	0,83 a	11,84 a	62,4 a	0,21 a	0,78 b
	BRM32111	141,3 b	2174,8 a	0,84 a	14,83 b	69,9 a	0,21 a	0,78 b
	R-58	279,3 a	1695,6 b	0,75 b	5,10 c	46,1 b	0,15 b	0,85 a
	R-92	284,0 a	1878,3 b	0,76 b	5,64 c	48,2 b	0,16 b	0,84 a
	Controle	329,0 a	1723,3 b	0,73 c	4,32 c	35,6 c	0,14 b	0,85 a
	CV (%)		15,66	7,54	2,14	23,98	12,56	8,37
25	BRM32113	327,12 a	1633,73 a	0,72 ab	4,15 ab	43,68 a	0,15 a	0,85 a
	BRM32111	315,28 a	1737,51 a	0,73 a	4,59 a	41,67 a	0,14 a	0,86 a
	R-58	329,93 a	1660,17 a	0,72 ab	4,07 ab	38,77 a	0,14 a	0,86 a
	R-92	348,75 a	1628,08 a	0,71 ab	3,75 ab	42,97 a	0,15 a	0,85 a
	Controle	382,85 a	1468,09 a	0,66 b	2,86 b	38,17 a	0,13 a	0,87 a
	CV (%)		14,19	9,11	4,72	21,42	13,64	15,91

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de SNK a 5% de probabilidade. ^aCapacidade de campo. ^bIsoladas de rizobactérias. ^cCoeficiente de variação.

401 Potencial hídrico

402 Em 100% CC, a inoculação das rizobactérias não afetaram o Ψ_w das mudas de
403 açazeiro. Entretanto, em 75% CC todas as mudas inoculadas evitaram a redução do Ψ_w ,
404 com aumento médio de 34% em comparação ao controle. Em 50% CC, apenas
405 BRM32113, BRM32111 e R-58 conseguiram manter maiores Ψ_w , sendo, em média, 35%
406 maiores em relação ao controle. Em 25% CC, não houve efeito da inoculação das
407 rizobactérias (Tabela 2).

408

409 Enzimas antioxidantes e peroxidação lipídica (MDA)

410 Em 100% CC, as mudas inoculadas com BRM32113, BRM-32111 e R-92
411 aumentaram em média 71% a atividade da superóxido dismutase (SOD) em relação ao
412 controle. A atividade da catalase (CAT) foi maior em 117% apenas para as mudas
413 inoculadas com R-92 em relação ao controle, enquanto para atividade da peroxidase do
414 ascorbato (APX) e teores de aldeído malônico (MDA) não houveram influencias da
415 inoculação das rizobactérias (Tabela 4). Em 75% CC não foram realizadas análises das
416 atividades enzimáticas e teor de MDA. Os dados de trocas gasosas e fluorescência da
417 clorofila *a* revelaram semelhanças de comportamento em 100 e 75%, ou seja, todas as
418 mudas inoculadas diferem do controle.

419 Em 50% CC, apenas as mudas inoculadas com BRM32113 aumentaram em 498%
420 a atividade da SOD em relação ao controle, enquanto a atividade da CAT aumentou em
421 124% para R-58 e, a atividade da APX aumentou em 105% para R-92 em relação ao
422 controle. Os teores de MDA diminuíram em 41% nas mudas inoculadas em relação ao
423 controle (Tabela 4). Em 25% CC não foram realizadas análises das atividades enzimáticas
424 e teor de MDA. Os dados de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* revelaram que
425 não houve influência das rizobactérias.

426

427

428

429

430

431

432

433

434

Tabela 4. Atividades da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) e, teor de aldeído malônico (MDA) em mudas de açaizeiro (cinco meses de idade) inoculadas com rizobactérias e submetidas a 100 e 50% da Capacidade de Campo (CC).

^a CC (%)	^b Isolados	Variáveis			
		SOD (U mg ⁻¹ proteína)	CAT (U mg ⁻¹ proteína)	APX (U mg ⁻¹ proteína)	MDA (nmol g ⁻¹ MF)
100	BRM32113	118,43 a	0,22 b	2,34 a	38,32 a
	BRM32111	90,92 ab	0,24 b	3,04 a	32,57 a
	R-58	70,24 b	0,18 b	2,65 a	38,47 a
	R-92	84,11 ab	0,52 a	3,55 a	41,37 a
	Controle	57,17 b	0,24 b	4,41 a	44,63 a
^c CV (%)		19,12	14,49	23,28	18,95
50	BRM32113	272,46 a	0,52 b	4,95 b	43,06 b
	BRM32111	83,66 b	0,58 b	5,15 b	40,19 b
	R-58	96,35 b	0,83 a	4,01 b	42,59 b
	R-92	69,98 b	0,61 b	12,90 a	44,69 b
	Controle	45,58 b	0,37 b	6,29 b	72,85 a
CV (%)		22,28	20,32	19,21	14,84

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de SNK a 5% de probabilidade. ^aCapacidade de campo (%). ^bIsolados de rizobactérias. ^cCoefficiente de variação.

435

436 3.4 Análise de componentes principais (ACP)

437 A análise de componentes principais realizada com os dados de trocas gasosas,
 438 fluorescência da clorofila *a*, atividade das enzimas antioxidantes e teor de MDA,
 439 revelou dois componentes principais que explicaram 96% da variabilidade total dos
 440 dados, sendo 86% para componente principal 1 (CP1) e 10% para a componente principal
 441 2 (CP2). O CP1 foi influenciado principalmente por A , g_s , E , F_m , F_v'/F_m' , F_v/F_o , qP , ETR,
 442 P_w e SOD com autovetores positivos e, C_i , F_o , qN e APX com autovetores negativos. O
 443 CP2 foi influenciado por CAT e WUE com autovetores positivos e, antagônicos à MDA
 444 (Figura 1A).

445 O agrupamento realizado por ACP permitiu separar três grupos distintos conforme
 446 o comportamento das rizobactérias. O grupo 1 foi formado pelo controle, o grupo 2 foi
 447 formado pelas rizobactérias R-58 e R-92 e, o grupo 3 foi formado pelas rizobactérias
 448 BRM32113 e BRM32111. O grupo 1 influencia negativamente nas CP1 e CP2. Os
 449 isolados do grupo 2 são semelhantes no comportamento das variáveis que influenciam
 450 positivamente no CP2, enquanto os isolados do grupo 3 são semelhantes no
 451 comportamento das variáveis que influenciam positivamente o CP1 (Figura 1B).

452

453

454

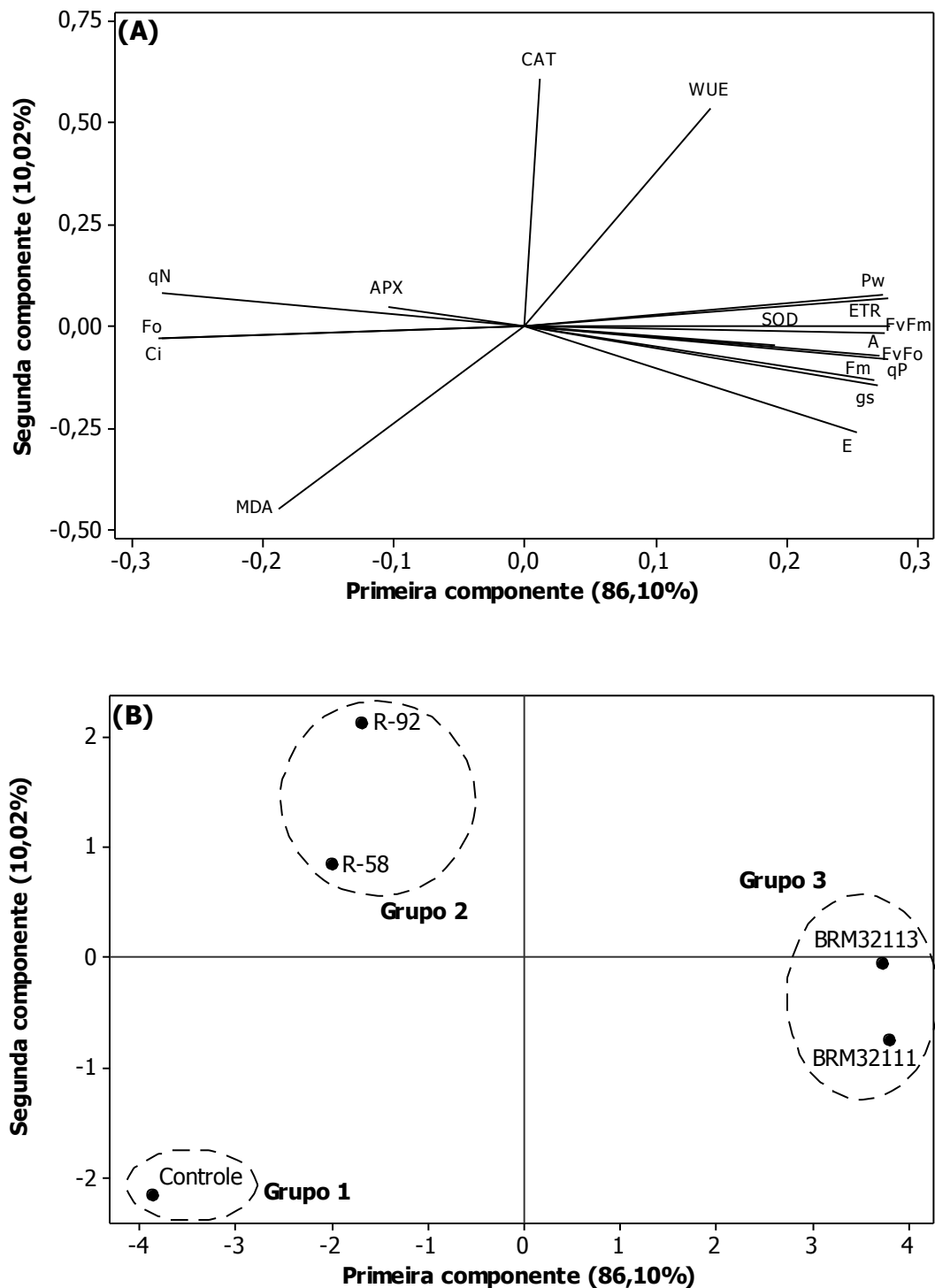


Figura 1. (A) Análise de componentes principais - ACP para as variáveis de trocas gasosas, fluorescência da clorofila *a*, potencial hídrico, enzimas antioxidantes e MDA e, (B) agrupamento por ACP conforme a semelhança de comportamento das rizobactérias inoculadas em mudas de açazeiro em 50% CC.

455

456

457

458

459

460 3.5 Discussão

461 O presente estudo relata pela primeira vez a indução de tolerância ao déficit
462 hídrico em mudas de açaizeiro por rizobactérias promotoras do crescimento de plantas
463 (PGPR). A maior tolerância ao déficit hídrico induzidas pelas PGPR já foi relatada em
464 outras culturas, como arroz (Yuwono et al. 2005), trigo (Kasim et al. 2013) e milho (Gou
465 et al. 2015). As PGPR induzem alterações morfofisiológicas e bioquímicas que
466 contribuem para a adaptação das plantas durante o período de limitação hídrica, tais como
467 acúmulo de solutos osmorreguladores (Mohammadi et al. 2016), ativação do sistema
468 enzimático antioxidante (Wang et al. 2012) e alterações no balanço dos hormônios que
469 influenciam no maior crescimento das raízes e melhor desempenho fotossintético
470 (Bresson et al. 2013; Wang et al. 2014; Fan et al. 2015).

471 No presente estudo, a inoculação das PGPR resultou em melhoria do desempenho
472 fotossintético nas mudas de açaizeiro. Em 100% CC, as maiores taxas de assimilação de
473 CO₂ (*A*) e transpiração (*E*) foram favorecidos pelo maior grau de abertura dos estômatos
474 (*g_s*). O *C_i* não foi alterado, porém, as maiores taxas fotossintéticas sugerem uma melhor
475 eficiência na assimilação do CO₂ mesofílico em mudas inoculadas com PGPR, como
476 observado em plantas de arroz inoculadas com PGPR (Nascente et al. 2017). Para BRM-
477 32111 e BRM-32113, as maiores *g_s* e *E* influenciaram em menor uso eficiente da água
478 (*A/E*), evidenciando que em condições de abundancia hídrica pode haver aumento de
479 consumo de água para melhorar os processos fisiológicos. Para Flexas et al. (2015), a
480 maior disponibilidade hídrico e radiação solar favorecem a maior abertura estomática,
481 que diminui a resistência à difusão do CO₂ e contribuem para manter maiores taxas
482 fotossintética. Nessa condição, a maior perda de água pela transpiração pode ser vantajoso
483 para planta intercambiar a água perdida por produtos da fotossíntese, que resultam em
484 maior crescimento e acúmulo de biomassa (Fan et al. 2015).

485 Em 75% CC, o aumento da *g_s* em resposta a inoculação das PGPR influenciou na
486 menor resistência à entrada do CO₂ e, conseqüentemente, aumentou a concentração do
487 CO₂ mesofílico e favoreceu a maior assimilação do CO₂ (*A*). Entretanto, semelhante à
488 100% CC, as maiores *g_s* e *E* das mudas inoculadas com BRM32111, R-58 e R-92 podem
489 ser relacionadas à menor *A/E*. Resultados semelhantes foram demonstrados em plantas de
490 trigo inoculadas com PGPR, onde a maior abertura estomática influenciou nas maiores
491 taxas fotossintéticas durante a suspensão da irrigação (Timmusk et al. 2014). No presente
492 estudo, as mudas inoculadas com PGPR conseguiram manter maiores Ψ_w em 75% CC,
493 indicando maior eficiência na absorção de água pelas raízes, como observado em mudas
494 de palma de óleo inoculadas com PGPR, onde o maior sistema radicular contribuiu para

495 aumentar a área de contato das raízes com o solo e aumentou a absorção de água e
496 translocação de nutrientes (Amir et al. 2005). Para Astriani et al. (2016), o aumento do
497 sistema radicular em resposta a inoculação das PGPR pode ser relacionado à produção
498 e/ou sinalização da rota de biossíntese do hormônio ácido indolacético (AIA) nas raízes
499 das plantas.

500 Em 50% CC, as maiores g_s em resposta a inoculação de BRM-32113, BRM-32111
501 e R-58 contribuíram para aumentar o acúmulo de CO_2 mesofílico (C_i) e manter as maiores
502 taxas de assimilação de CO_2 (A). Em plantas de arroz inoculadas com o promotor de
503 crescimento *Trichoderma*, o incremento em A foi relacionado com a maior atividade de
504 carboxilação para fixação do CO_2 (Doni et al. 2014). No presente estudo, a transpiração
505 (E) aumentou nas mudas inoculadas com BRM-32113 e BRM-32111 em 50% CC, porém,
506 o nível de abertura estomática (g_s) foi eficiente para intercambiar a água perdida por mais
507 CO_2 fixado, que influenciou em maior A/E . Para Rolli et al. (2015), aumentos de A e E
508 regulados pelas PGPR influenciam no aumento do A/E e contribuem para melhorar
509 tolerância das plantas ao déficit hídrico.

510 As altas taxas de fixação do CO_2 pela Rubisco requerem um alto consumo de
511 energia química na forma de ATP e NADPH, o qual é gerado na etapa fotoquímica da
512 fotossíntese através da eficiência na captação, absorção e transferência de energia
513 luminosa pelas moléculas de clorofilas que compõem os fotossistemas I e II (Zhang et al.
514 2017). A eficiência na conversão de energia luminosa em energia química influencia no
515 desempenho fotossintético e pode ser avaliada pelos parâmetros de fluorescência da
516 clorofila a , como F_o , F_m , F_v/F_m , F_v/F_o , $\phi PSII$, ETR, qP e qP (Maxwell and Johnson 2000;
517 Baker 2008).

518 A fluorescência inicial ou mínima (F_o) representa a emissão de luz pelas
519 moléculas de clorofilas a excitadas, antes da energia ser dissipada para o centro de reação
520 do PSII, podendo aumentar quando os centros de reações são prejudicados por estresses
521 ambientais (Campostrini, 2001). No presente estudo, os maiores valores de F_o nas mudas
522 controle indicam possíveis danos ao centro de reação do PSII. Porém, a inoculação de
523 todas as PGPR em 75% CC e apenas BRM-32113 e BRM-32111 em 50% CC atenuaram
524 o aumento de F_o e, contribuiu para a maior atividade potencial do PSII (F_v/F_o).
525 Samaniego-Gómez et al. (2016), relatam que o elevado F_v/F_o induzidos por PGPR podem
526 indicar maior atenuação dos danos aos centros de reação do PSII em plantas submetidas
527 ao déficit hídrico.

528 O F_m indica o nível máximo de luz emitida pelas moléculas de clorofilas a
529 excitadas, que ocorre antes das reações fotoquímicas e, valores elevados relevam um

530 declínio no processo fotoquímico (Zhou et al. 2016). Entretanto, o aumento de F_m pode
531 ser relacionado com o maior conteúdo de clorofilas (Zhang et al. 2017). No presente
532 estudo, os maiores valores de F_m em 100, 75 e 50% CC não influenciaram no declínio do
533 processo fotoquímico em mudas inoculadas com PGPR. Os aumentos de F_v'/F_m' , ETR e
534 qP revelam maior eficiência das reações fotoquímica nas mudas inoculadas com PGPR.
535 O F_v'/F_m' representa a eficiência de captura da excitação pelos centros de reação abertos
536 do PSII e, está relacionada à dissipação da energia térmica no complexo antena (Schreiber
537 et al, 1994). Para Zhou et al. (2016), a manutenção do maior F_v'/F_m' em condições de
538 déficit hídrico pode estar associado a proteção das moléculas clorofilas nas plantas
539 inoculadas com PGPR.

540 Em 100% CC, a ausência de condições estressantes sugerem que o incremento da
541 taxa de transporte de elétrons (ETR) é uma consequência do efeito positivo da inoculação
542 das PGPR. De acordo com Samaniego-Gãmez et al. (2016), maiores ETRs indicam que
543 o acceptor quinona (Qa) é altamente oxidado e sua energia de excitação é utilizada no
544 transporte de elétrons, evitando assim os fotodanos. Entretanto, os estresses ambientais
545 podem reduzir e/ou inibir o ETR devido aos danos no aparato fotossintético (Li et al.
546 2007). No presente estudo, a limitação hídrica em 75 e 50% CC provocou redução de
547 ETR apenas nas mudas controle, sugerindo que as PGPR induziram a proteção do aparato
548 e aliviaram os danos oxidativos.

549 O incremento da dissipação fotoquímico (qP) em 100% CC sugerem que as PGPR
550 melhoram captura de energia de excitação e aumentam a utilização de energia para
551 redução do NADP. Krause e Weis (1991) relatam que o aumento de qP pode indicar maior
552 captura da energia de excitação por armadilhas abertas, que são convertidas em energia
553 química no centro de reação do PSII. Entretanto, em condições de déficit hídrico a
554 redução de qP podem relevar danos foto-oxidativos ao centro de reação do PSII (Zhang
555 et al. 2017). No presente estudo, a inoculação de todas as PGPR em 75% CC e, apenas
556 BRM-32113 e BRM-32111 em 50% CC, influenciou na manutenção dos maiores qP ,
557 revelando maior proteção do aparato fotossintético.

558 Em condições de déficit hídrico, a limitação estomática diminui a concentração
559 de CO_2 mesofílico e prejudica a atividade de carboxilação do ciclo de Calvin (Steffen,
560 1991). Consequentemente, o ATP e NADPH gerados nas reações fotoquímicas deixam
561 de ser consumidos e o elétrons livres reagem com o oxigênio molecular livre, gerando as
562 espécies reativas de oxigênio (ROS); como os radicais superóxido (O_2^-), hidroxila (OH^-)
563 e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Baisak et al. 1994; Vranová et al. 2002).

564 O acúmulo das ROS provoca diversos danos à célula, pois reagem com moléculas
565 de DNA, RNA, proteínas e lipídeos de membrana, que resultam no estresse oxidativo
566 (Hung et al., 2005). Entretanto, as plantas podem aliviar os efeitos do estresse oxidativo
567 através da ativação das enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD),
568 catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) (Alscher et al. 2002). A SOD constitui
569 a primeira linha de defesa contra as ROS, transformando o radical O_2^- em H_2O_2 . A CAT
570 e APX constituem a segunda linha de defesa e atuam na quebra do H_2O_2 (Mizuno et al.
571 1998).

572 Em 100% CC, o aumento da atividade da SOD para BRM-32113, BRM-32111 e
573 R-92 e, CAT para R-92 pode ser relacionada à uma intensa atividade fotossintética, que
574 normalmente aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio. Stefan et al. (2013)
575 relataram aumentos das atividades da SOD e Peroxidase por PGPR para desintoxicar o
576 H_2O_2 acumulado durante a intensa atividade fotossintética. A inoculação das PGPR pode
577 prevenir o estresse oxidativo e aumentar a tolerância ao estresse.

578 Em 50% CC, a maior atividade da SOD para BRM-32113 contribuiu para
579 diminuir os teores de MDA, indicando menor peroxidação lipídica e alívio do estresse
580 oxidativo. Para R-58 a atenuação da peroxidação lipídica pode ser relacionada com a
581 maior atividade da CAT, enquanto para R-92 esse mesmo efeito pode ser relacionado
582 com a maior atividade da APX, sugerindo que cada PGPR ativa uma rota metabólica
583 diferente para aliviar os danos oxidativos. A análise ACP revelou influência positiva entre
584 as enzimas antioxidantes e os parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a*,
585 indicando maior proteção do aparato fotossintético induzida pelas PGPR. Para Wang et
586 al. (2012), a indução das enzimas antioxidantes pelas PGPR confere tolerância sistêmica
587 ao estresse hídrico, protegem as células e mantem a eficiência fotossintética.

588

589 **3.5 Conclusões**

590 As rizobactérias atenuam os danos do déficit hídrico em mudas de açaizeiro por
591 alívio do estresse oxidativo e manutenção do desempenho fotossintético.

592 As mudas inoculadas com BRM-32113 e BRM-32111 foram superiores até 50%
593 da Capacidade de campo.

594 A análise de componentes principais revela que Ψ_w , A , g_s , E , F_m , F_v/F_m , ETR, qP
595 e SOD estão fortemente associados e influenciam positivamente na atenuação dos efeitos
596 do déficit hídrico em mudas de açaizeiro inoculados com as rizobactérias BRM-32113 e
597 BRM-32111.

598

599 **REFERÊNCIAS**

600

601 Alscher NG, Erturk, NE (2002) Role of superoxide dismutase (SODs) in controlling
602 oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, v. 53, p. 1331-1341

603

604 Baker NR (2008) Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu Rev*
605 *Plant Biol* 59:89–113. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759

606 Baisak R, Rana D, Acharya PBB, Kar M (1994) Alterations in the activities of active
607 oxygen scavenging enzymes of wheat leaves subjected to water stress. *Plant and Cell*
608 *Physiology*, 35, p. 489-495.

609

610 Barbosa M, Lobato A, Pereira T, et al (2017) Antioxidant system is insufficient to prevent
611 cell damages in *Euterpe oleracea* exposed to water deficit. *Emirates J Food Agric*
612 29:206. doi: 10.9755/ejfa.2016-09-1217

613 Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
614 quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical*
615 *Biochemistry*, v. 72, p.248–254

616 Bresson J, Varoquaux F, Bontpart T, et al (2013) The PGPR strain *Phyllobacterium*
617 *brassicacearum* STM196 induces a reproductive delay and physiological changes
618 that result in improved drought tolerance in *Arabidopsis*. *New Phytol* 200:558–569.
619 doi: 10.1111/nph.12383

620 Calbo MER, Moraes JAPV De (2000) Efeitos da deficiência de água em plantas de
621 *Euterpe oleracea* (açai). *Rev Bras Botânica* 23:225–230. doi: 10.1590/S0100-
622 84042000000300001

623 Cakmak I, Horst J (1991) Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide
624 dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine Max*).
625 *Physiology Plant*, v.83, p.463–468

626 Cattelan AJ (1999) Métodos Qualitativos para Determinação de Características
627 Bioquímicas e Fisiológicas Associadas com Bactérias Promotoras do Crescimento
628 Vegetal. *Embrapa Soja* 139:36.

629 Döbereiner J, Day J (1976) Associative symbioses in tropical grasses: characterization of
630 microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: *Proceedings of the 1st international*
631 *symposium on nitrogen fixation*. Washington State University Press Pullman, pp
632 518–538

633 Doni F, Isahak A, Che Mohd Zain CR, Wan Yusoff WM (2014) Physiological and growth
634 response of rice plants (*Oryza sativa* L.) to *Trichoderma* spp. inoculants. *AMB*
635 *Express* 4:45. doi: 10.1186/s13568-014-0045-8

636 Fan X, Hu H, Huang G, et al (2015) Soil inoculation with *Burkholderia* sp. LD-11 has
637 positive effect on water-use efficiency in inbred lines of maize. *Plant Soil* 390:337–
638 349. doi: 10.1007/s11104-015-2410-z

639 Flexas J, Barbour MM, Brendel O, et al (2012) Mesophyll diffusion conductance to CO₂:
640 An unappreciated central player in photosynthesis. *Plant Sci* 193-194:70–84. doi:
641 10.1016/j.plantsci.2012.05.009

642 Forni C, Duca D, Glick BR (2016) Mechanisms of plant response to salt and drought
643 stress and their alteration by rhizobacteria. *Plant Soil* 1–22. doi: 10.1007/s11104-

- 644 016-3007-x
- 645 Gagné-Bourque F, Bertrand A, Claessens A, et al (2016) Alleviation of Drought Stress
646 and Metabolic Changes in Timothy (*Phleum pratense* L.) Colonized with *Bacillus*
647 *subtilis* B26. *Front Plant Sci* 7:1–16. doi: 10.3389/fpls.2016.00584
- 648 Gontia-Mishra I, Sapre S, Sharma A, Tiwari S (2016) Amelioration of drought tolerance
649 in wheat by the interaction of plant growth promoting rhizobacteria. *Plant Biol*
650 18:992–1000. doi: 10.1111/plb.12505
- 651 Gou W, Tian L, Ruan Z, et al (2015) Accumulation of choline and glycinebetaine and
652 drought stress tolerance induced in maize (*Zea mays*) by three plant growth
653 promoting rhizobacteria (PGPR) strains. *Pakistan J Bot* 47:581–586.
- 654 Havar EA, Mchale NA (1987) Biochemical and developmental characterization of
655 multiple forms of catalas in tobacco leaves. *Plant Physiology*, v.84, p.450-455
- 656 Hung SH, Yu CW, Lin CH (2005) Hydrogen peroxide functions as a stress signal in
657 plants. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, v.46, p. 1-10
- 658 Kado CI, Heskett MG (1970) Selective Media for Isolation of *Agrobacterium*,
659 *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. *Phytopathology*
660 60:969. doi: 10.1094/Phyto-60-969
- 661 Kasim WA, Osman ME, Omar MN, et al (2013) Control of Drought Stress in Wheat
662 Using Plant-Growth-Promoting Bacteria. *J Plant Growth Regul* 32:122–130. doi:
663 10.1007/s00344-012-9283-7
- 664 Kaushal M, Wani SP (2016) Plant-growth-promoting rhizobacteria: drought stress
665 alleviators to ameliorate crop production in drylands. *Ann Microbiol* 66:35–42. doi:
666 10.1007/s13213-015-1112-3
- 667 Klar AE, Villa Nova NA, Marcos ZZ, Cervellini A (1966) Determinação da umidade do
668 solo pelo método das pesagens. *An da Esc Super Agric Luiz Queiroz* 23:15–30. doi:
669 10.1590/S0071-12761966000100003
- 670 Li W, Zhang S, Shan L (2007) Responsibility of non-stomatal limitations for the reduction
671 of photosynthesis-response of photosynthesis and antioxidant enzyme
672 characteristics in alfalfa (*Medicago sativa* L.) seedlings to water stress and
673 rehydration. *Front Agric China* 1:255–264. doi: 10.1007/s11703-007-0044-5
- 674 Malke H (1991) Z. Klement, K. Rudolph and D. C. Sands (Editors), *Methods in*
675 *Phytobacteriology*. XIV + 568 S., 135 Abb., 62 Tab. Budapest 1990. Akadémiai
676 Kaidó. Ft 1520.0 ISBN: 963-05-4955-7. *J Basic Microbiol* 31:148–148. doi:
677 10.1002/jobm.3620310214
- 678 Maxwell K, Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence--a practical guide. *J Exp Bot*
679 51:659–668. doi: 10.1093/jexbot/51.345.659
- 680 Medrano H, Escalona JM, Bota J, et al (2002) Regulation of photosynthesis of C3 plants
681 in response to progressive drought: Stomatal conductance as a reference parameter.
682 *Ann Bot* 89:895–905. doi: 10.1093/aob/mcf079
- 683 Mohammadi H, Dashi R, Farzaneh M, et al (2016) Effects of beneficial root *pseudomonas*
684 on morphological, physiological, and phytochemical characteristics of *Satureja*
685 *hortensis* (Lamiaceae) under water stress. *Brazilian J Bot.* doi: 10.1007/s40415-016-
686 0319-2

- 687 Mizuno M, Kamei M, Tsuchida H (1998) Ascorbate peroxidase and catalase cooperate
688 for protection against hydrogen peroxide generated in potato tubers during low-
689 temperature storage. *IUBMB Life*, v. 44, p. 717-726
- 690 Nascente AS, de Filippi MCC, Lanna AC, et al (2016) Biomass, gas exchange, and
691 nutrient contents in upland rice plants affected by application forms of
692 microorganism growth promoters. *Environ Sci Pollut Res* 24:2956–2965. doi:
693 10.1007/s11356-016-8013-2
- 694 Nakano, Y Asada H (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific
695 peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiology*, v.22, p.867-880
- 696 Oliveira LC, De Oliveira MDSP, Davide LC, Torres GA (2016) Karyotype and genome
697 size in *Euterpe Mart.* (Arecaceae) species. *Comp Cytogenet* 10:17–25. doi:
698 10.3897/CompCytogen.v10i1.5522
- 699 Oliveira MDSP, Neto JTDF (2004) Cultivar BRS-Pará: Açaizeiro para Produção de
700 Frutos em Terra Firme. *Embrapa, Comun Técnico* 114:1–3.
- 701 Oxborough K, Baker NR (1997) Resolving chlorophyll a fluorescence images of
702 photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components -
703 Calculation of qP and F_v'/F_m' without measuring F_o' . *Photosynth Res* 54:135–142.
704 doi: 10.1023/A:1005936823310
- 705 Pinheiro HA, Silva JV, Endres L, et al (2008) Leaf gas exchange, chloroplastic pigments
706 and dry matter accumulation in castor bean (*Ricinus communis* L) seedlings
707 subjected to salt stress conditions. *Ind Crops Prod* 27:385–392. doi:
708 10.1016/j.indcrop.2007.10.003
- 709 Rolli E, Marasco R, Vigani G, et al (2015) Improved plant resistance to drought is
710 promoted by the root-associated microbiome as a water stress-dependent trait.
711 *Environ Microbiol* 17:316–331. doi: 10.1111/1462-2920.12439
- 712 Rufino M do SM, Pérez-Jiménez J, Arranz S, et al (2011) Açaí (*Euterpe oleraceae*) “BRS
713 Pará”: A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant
714 capacity oil. *Food Res Int* 44:2100–2106. doi: 10.1016/j.foodres.2010.09.011
- 715 Samaniego-Gómez BY, Garruña R, Tun-Suárez JM, et al (2016) *Bacillus* spp. inoculation
716 improves photosystem II efficiency and enhances photosynthesis in pepper plants.
717 *Chil J Agric Res* 76:409–416. doi: 10.4067/S0718-58392016000400003
- 718 Saravanakumar D, Kavino M, Raguchander T, et al (2011) Plant growth promoting
719 bacteria enhance water stress resistance in green gram plants. *Acta Physiol Plant*
720 33:203–209. doi: 10.1007/s11738-010-0539-1
- 721 Shi Y, Lou K, Li C (2010) Growth and photosynthetic efficiency promotion of sugar beet
722 (*Beta vulgaris* L.) by endophytic bacteria. *Photosynth Res* 105:5–13. doi:
723 10.1007/s11120-010-9547-7
- 724 Silva Cravo M, Viégas IJM, Brasil EC (2007) Recomendações de adubação e calagem
725 para o Estado do Pará. EMBRAPA Amazonia Oriental, Belém, PA (Brasil)
- 726 Silva PA, Cosme VS, Rodrigues KCB, et al (2017) Drought tolerance in two oil palm
727 hybrids as related to adjustments in carbon metabolism and vegetative growth. *Acta*
728 *Physiol Plant* 39:58. doi: 10.1007/s11738-017-2354-4
- 729 Silvestre WVD, Pinheiro HA, Souza RORDM, Palheta LF (2016) *Revista Brasileira de*
730 *Engenharia Agrícola e Ambiental* Morphological and physiological responses of

- 731 açai seedlings subjected to different watering regimes Respostas morfológicas e
732 fisiológicas de mudas de açazeiros submetidas à diferentes regimes hídricos. 364–
733 371.
- 734 Silvestre WVD, Silva PA, Palheta LF, et al (2017) Differential tolerance to water deficit
735 in two açai (*Euterpe oleracea* Mart.) plant materials. *Acta Physiol Plant* 39:4. doi:
736 10.1007/s11738-016-2301-9
- 737 Steffen KL (1991) Avoidance of photooxidative stress: Balancing energy flux within the
738 chloroplast. In: “Active Oxygen/Oxidative Stress and Plant Metabolism” (Pell E.,
739 Steffen K. L. eds), Rockville, p. 119-130
- 740 Sylvester-Bradley R, Asakawa N, La TS, et al (1982) Levantamento quantitativo de
741 microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas
742 forrageiras na Amazônia. *Acta Amaz* 12:15–22.
- 743 Teather RM, Wood PJ (1982) Use of Congo red-polysaccharide interactions in
744 enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen.
745 *Appl Environ Microbiol* 43:777–780. doi: 0099-2240/82/040777-04\$02.00/0
- 746 Timmusk S, Abd El-Daim IA, Copolovici L, et al (2014) Drought-tolerance of wheat
747 improved by rhizosphere bacteria from harsh environments: Enhanced biomass
748 production and reduced emissions of stress volatiles. *PLoS One*. doi:
749 10.1371/journal.pone.0096086
- 750 Vranová E, Inzé D, Van Breusegem F (2002) Signal transduction during oxidative stress.
751 *Journal of Experimental Botany*, v. 53, p.1227-1236
- 752 Wang CJ, Yang W, Wang C, et al (2012) Induction of Drought Tolerance in Cucumber
753 Plants by a Consortium of Three Plant Growth-Promoting Rhizobacterium Strains.
754 *PLoS One* 7:1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0052565
- 755 Wang S, Ouyang L, Ju X, et al (2014) Survey of Plant Drought-Resistance Promoting
756 Bacteria from *Populus euphratica* Tree Living in Arid Area. *Indian J Microbiol*
757 54:419–426. doi: 10.1007/s12088-014-0479-3
- 758 Wang CJ, Yang W, Wang C, Gu C, Niu DD, Liu HX, et al. (2012). Induction of drought
759 tolerance in cucumber plants by a consortium of three plant growth-promoting
760 rhizobacterium strains. *PLoS One*, 7(12), e52565
- 761 Yuwono T, Handayani D, Soedarsono J (2005) The role of osmotolerant rhizobacteria in
762 rice growth under different drought conditions. *Aust J Agric Res* 56:715–721. doi:
763 10.1071/AR04082
- 764 Zhang K, Liu Z, Shan X, et al (2017) Physiological properties and chlorophyll
765 biosynthesis in a Pak-choi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis*) yellow leaf mutant, *pylm*.
766 *Acta Physiol Plant* 39:22. doi: 10.1007/s11738-016-2321-5
- 767 Zhou C, Ma Z, Zhu L, et al (2016) Rhizobacterial strain *Bacillus megaterium* BOFC15
768 induces cellular polyamine changes that improve plant growth and drought
769 resistance. *Int J Mol Sci*. doi: 10.3390/ijms17060976
- 770
- 771
- 772
- 773

1 **4. ANTHRACNOSE IN AÇAÍ PALM LEAVES REDUCES LEAF GAS**
2 **EXCHANGE AND CHLOROPHYLL A FLUORESCENCE***

3

4 ***Artigo 3: Normas da revista Tropical Plant Pathology**

5 **(Versão aceita para publicação)**

6

7 **ABSTRACT**

8 Leaf spots caused by *Colletotrichum* sp. decrease photosynthesis rate and hamper the
9 growth of açai seedlings in nurseries. The objective of the study was to quantify the
10 changes in the photosynthetic performance of açai leaves inoculated with *Colletotrichum*
11 sp. through measurements of gas exchange, chlorophyll *a* fluorescence, and
12 photosynthetic pigments. The rate of net CO₂ assimilation, stomatal conductance,
13 transpiration rate, chlorophyll *a* and *b*, ratio of chlorophyll *a/b* and total chlorophyll
14 decreased, but the intercellular CO₂ concentration increased in inoculated plants
15 compared with non-inoculated plants. Changes in chlorophyll *a* fluorescence began at 3
16 days after inoculation (dai) and increased with the number of injuries. The maximum
17 photochemical efficiency ratio (F_v/F_m) declined sharply as well as other characteristics
18 of chlorophyll *a* fluorescence, such as the photochemical quenching coefficient, effective
19 quantum yield of PSII, quantum yield of non-regulated energy dissipation and electron
20 transfer rate. Infection by *Colletotrichum* sp. reduces the photosynthetic performance due
21 to reduced light capture and assimilation of CO₂ in the mesophyll.

22

23 **Keywords:** *Euterpe oleracea*, *Colletotrichum* sp., photosynthesis.

24

25

26

27

28 **RESUMO**

29 Manchas foliares causadas por *Colletotrichum* sp. diminuem a taxa de fotossíntese e
30 dificultam o crescimento de mudas de açaí em viveiros. O objetivo do estudo foi
31 quantificar as alterações no desempenho fotossintético de folhas de açaí inoculadas com
32 *Colletotrichum* sp. através de medições de troca gasosa, fluorescência da clorofila *a* e
33 pigmentos fotossintéticos. A taxa de assimilação líquida de CO₂, condutância estomática,
34 taxa de transpiração, clorofila *a* e *b*, razão de clorofila *a/b* e clorofila total diminuíram,
35 mas a concentração intercelular de CO₂ aumentou em plantas inoculadas em comparação
36 com plantas não inoculadas. As alterações na fluorescência da clorofila *a* começaram aos
37 3 dias após a inoculação (dai) e aumentaram com o número de lesões. A taxa máxima de
38 eficiência fotoquímica (F_v/F_m) diminuiu acentuadamente, assim como outras
39 características da fluorescência da clorofila *a*, como o coeficiente de extinção
40 fotoquímica, o rendimento quântico efetivo de PSII, o rendimento quântico de dissipação
41 de energia não regulada e a taxa de transferência de elétrons. Infecção por *Colletotrichum*
42 sp. reduz o desempenho fotossintético devido à redução da captação de luz e assimilação
43 de CO₂ no mesófilo.

44 **Palavras-chave:** *Euterpe oleracea*, *Colletotrichum* sp., fotossíntese

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54 4.1 INTRODUCTION

55 Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) is a native palm in the Amazon region and Brazil
56 is the world's largest producer of the fruit (Oliveira et al. 2016). The high consumption
57 of the fruit at national and international levels required changes to the production system
58 from an extractive activity to a commercially grown crop on large areas (Pérez-Jiménez
59 et al. 2011). Consequently, there was an increase in the demand for seedlings. In nurseries,
60 seedling production is limited by the long time (about 6 to 8 months) to reach a proper
61 stage for transplanting (Silvestre et al. 2016) and by the incidence of foliar diseases such
62 as anthracnose (Ferreira et al. 2012).

63 Anthracnose, caused by the hemibiotrophic fungus *Colletotrichum* sp., is a major
64 disease causing losses of up to 70% of açaí seedlings in nurseries (Ferreira et al. 2012;
65 Nogueira et al. 2013). Symptoms on the leaves start as small dots of circular or elliptical
66 patches of brown color, with light central area and chlorotic halo. High humidity and
67 moderate temperatures favor the occurrence of anthracnose in nurseries (Bovi et al. 1977).
68 Disease control has been accomplished with the application of fungicides. However, no
69 fungicide is registered at the Brazilian Ministry of Agriculture to be used in açaí seedlings
70 (Oliveira et al. 2000). Proper fertilization and well-spaced seedlings can reduce the
71 incidence of anthracnose in nurseries (Oliveira et al. 2002).

72 Leaf pathogens can cause various physiological changes in the host, which may
73 occur directly via the secretion of lytic enzymes and toxins (Debona et al. 2014) or
74 indirectly through induced host responses by the pathogen (Pinkard and Mohammed,
75 2005). Photosynthesis is considered one of the main drivers of growth and crop
76 development and one of the most affected physiological process by leaf pathogens
77 (Tatagiba et al. 2015). Many studies (Resende et al. 2012; Rios et al. 2014) have
78 demonstrated a decrease in photosynthetic rate and changes in photosynthetic apparatus

79 caused by pathogen infection. These changes may be due to a down regulation or damage
80 to the photosynthetic apparatus (Alves et al., 2011).

81 Damage sustained in photosynthetic processes such as gas exchange and
82 chlorophyll *a* fluorescence are useful indicators of the activity of the photosynthetic
83 apparatus in leaves of cotton infected by pathogens (Guerra et al. 2014). Recently,
84 Dallagnol et al. (2015) quantified the changes in gas exchange and chlorophyll *a*
85 fluorescence in rice leaves infected with *Bipolaris oryzae*. They have shown significant
86 reductions in the rate of photosynthesis and photochemical efficiency of photosystem II
87 (PSII). *B. oryzae* infection compromises the absorption of CO₂ by reducing the stomatal
88 conductance, and negatively affecting some biochemical or photochemical step in
89 photosynthesis.

90 Chlorophyll *a* fluorescence analysis can be used to assess the changes in the
91 efficiency of photosynthetic processes induced by pathogens (Meyer et al. 2001).
92 Generally, the maximal fluorescence (F_m), photochemical efficiency (F_v/F_m) and electron
93 transport rate (ETR) of leaves kept in the dark decrease during the infection process, as
94 described in infected corn leaves by *Stenocarpella macrospora* (Bermúdez-Cardona et al.
95 2015). Other characteristics of chlorophyll *a* fluorescence, such as the photochemical
96 quenching coefficient (q_p), photochemical yield (Y[II]) and the efficiency of energy
97 dissipation of regulation (Y[NPQ]) are also harmed by infection with leaf pathogens
98 (Tatagiba et al. 2015).

99 Incidence of anthracnose in açai palm leaves is increasing and can limit the
100 development of seedlings in nurseries. This study was designed to examine how the
101 infection by *Colletotrichum* sp. affects the photosynthetic performance of plants using a
102 combination of gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence measurements along with
103 an analysis of chlorophyll concentration.

105 4.2 MATERIAL AND METHODS

106 **Plant growth**

107 Açai seeds Cv. BRS-Para were surface sterilized by sodium hypochlorite solution
108 1% (v/v) for 1 min and washed with sterilized water for 2 min. Seeds were sown in plastic
109 trays containing 2.7 L of substrate composed of shredded coconut fiber (Golden mix).
110 After 35 days seedlings have reached approximately 5 cm – high and were transplanted
111 to plastic bags (15 x 25 cm, diameter x height) containing substrate composed of 60% of
112 Oxisol and 40% of chicken manure. The plants were grown in greenhouse (32 ± 2 ° C
113 during the day and 25 ± 2 ° C during the night, and $75 \pm 5\%$ relative humidity) from April
114 to July 2015. The substrate pH and the concentrations of macro and micronutrients were
115 adjusted as recommended for açai palm (Cravo et al. 2010). The plants were irrigated
116 daily to replace water lost by evapotranspiration.

117

118 **Pathogenicity test**

119 Ten *Colletotrichum* sp. isolates were obtained from 10 açai palm with symptoms
120 of anthracnose, from a nursery at the Federal Rural University of Amazonia. The isolates
121 were cultured in Petri plates with Potato Dextrose Agar medium (PDA) for seven days at
122 25 - 26 °C and 12 h photoperiod. The mycelium was carefully removed from the Petri
123 plates using a Drigalski handle, and plates were kept in a growth chamber at 25 °C under
124 continuous light to induce sporulation. Açai palm leaves were inoculated with a 10^6
125 conidia mL⁻¹ suspension at 90 days after emergence. An atomizer was used to apply 20
126 ml of the suspension as a fine mist in the adaxial and abaxial leaf blades until runoff.
127 After inoculation, plants were packed in a plastic box and transferred to an incubator at
128 25 ± 1 °C where they remained for seven days. Inside the chamber the relative humidity
129 (90%) was measured with a thermohygrometer, model 5203 (Incoterm). *Colletotrichum*
130 sp. was re-isolated from symptomatic leaves.

131 The *Colletotrichum* sp. isolate obtained was used to inoculate the plants used for
132 assessing the effects of the disease on the variables associated with photosynthesis. The
133 inoculation was conducted as described above. The leaves were spray-inoculated (10^6
134 conidia mL^{-1}) at 120 days after emergence. After inoculation, plants were transferred to
135 a plastic growth chamber inside the greenhouse, where they remained for 8 days. The
136 chamber was constructed with aluminum foil (0.6 m wide, 0.8 m high and 1 m length)
137 and covered with transparent plastic 100 mm thick. The temperature and relative humidity
138 inside the chamber were maintained at 25 ± 3 ° C and 90%, respectively, using
139 thermohygrometer, model 5203 (Incoterm).

140

141 **Assessment of disease intensity**

142 Disease intensity in açai palm leaves was estimated by direct counting of the
143 number of lesions / leaves after 2, 3, 4, 5 and 8 days after inoculation (dai).

144

145 **Determination of gas exchange in leaves**

146 The gas exchange variables were measured in the first expanded leaf from apex
147 to the base of the plant. Inoculated and non-inoculated plants were assessed at 3, 4, 5 and
148 8 dai. Each replicate was assessed independently. The net CO_2 assimilation rate (A),
149 stomatal conductance to water vapor (g_s), intercellular CO_2 concentration (C_i) and
150 transpiration rate (E) were measured between 08:00h and 10:00h using a portable open-
151 flow gas exchange system (LI-6400XT, LI-COR, Lincoln, NE) under an external CO_2
152 concentration of $400 \mu\text{mol mol}^{-1}$ of air and artificial PAR $1,000 \mu\text{mol of photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.
153 This measurement interval (08:00h – 10:00h) was set according with the results obtained
154 with the diurnal curve of gas exchange for the species (Silvestre et al. 2016). All of the
155 measurements were performed at 28°C , and the vapor pressure deficit was maintained at

156 approximately 1.3 kPa; the amount of blue light was adjusted to 10% of the
157 photosynthetic photon irradiance to optimize the stomatal aperture.

158

159 **Determination of chlorophyll *a* fluorescence**

160 The chlorophyll *a* fluorescence was determined on the first leaf (apex to base) at
161 3, 4, 5 and 8 dai using a fluorescence chamber head (IG 6400-40; LI-COR Inc.) integrated
162 to a portable open-flow gas exchange system. The maximum photochemical efficiency
163 ratio (F_v/F_m) was calculated from initial fluorescence (F_0) and maximum fluorescence
164 emissions (F_m), as described by Oxborough and Baker (1997). Other variables like the
165 steady state fluorescence yield (F_s), maximum fluorescence (F_m') and light-adapted initial
166 fluorescence (F_0') were used to calculate the quantum yield of nonregulated energy
167 dissipation (Y[NO]), photochemical quenching coefficient (q_p), quantum yield of
168 regulated energy dissipation (Y[NPQ]), effective quantum yield of PSII (Y[II]) and
169 electron transfer rate (ETR), as described by Maxwell and Johnson (2000).

170

171 **Determination of the content of chlorophylls**

172 The chlorophyll content was determined in injured tissue of the first leaf (apex to
173 base) of the plants at 3, 4, 5 and 8 dai. The non-inoculated plants were also evaluated at
174 these times. The leaf samples were kept in a cooler with ice during sampling and then
175 stored at -80 °C. In total, 20 mg of leaf tissue (seven 0.5 cm diameter disks) was macerated
176 with 250 μ L 98% ethanol (v/v) in a room with reduced light intensity. The macerated
177 tissue was incubated for 20 min at 80 ° C and subsequently centrifuged at 14,000 rpm for
178 5 min at 4 ° C. The supernatant was collected and the residue washed twice using 200 μ L
179 of ethanol. The first wash used 80% ethanol and the second 50% ethanol. The volume
180 was adjusted to 600 μ L with the same solvent in a volumetric flask. A 20 μ L aliquot of
181 ethyl extract of each sample was added to a reaction medium containing 120 μ L of EtOH

182 98% and 40 uL of ethyl mix (final volume of 180 uL per well / sample). The absorbance
183 of the samples was recorded at 645 and 665 nm and the concentrations of chlorophyll *a*
184 (Chl_{*a*}), chlorophyll *b* (Chl_{*b*}), chlorophyll *a*/chlorophyll *b* ratio (Chl_{*a*}/Chl_{*b*}) and total
185 chlorophylls(Chl_{*a+b*}) were estimated according to formulas A and B described by Porra et
186 al., (1989), subsequently normalized to fresh weight of each sample.

187 (A) *Chlorophyll a* = 5.48*Abs665 – 2.16*Abs645(μg/well)

188 (B) *Chlorophyll b* = 9.67*Abs645 – 3.04*Abs665(μg/well)

189

190 **Experimental design and statistical analysis**

191 The experiment was conducted in completely randomized design with two
192 treatments (inoculated and non-inoculated plants) and 10 replicates to evaluate the
193 relationship between the number of lesions, gas exchange measurements, and Chlorophyll
194 *a* fluorescence. This experiment was repeated once. Each experimental unit was
195 represented by a plant per pot. The second experiment was performed to obtain leaves to
196 assess chlorophyll content, which consisted of non-inoculated and inoculated plants and
197 was arranged in a completely randomized design with 10 replications and repeated once.
198 In total, 50 plants were used in each experiment, with 10 plants for each sampling time
199 (0, 3, 4, 5 and 8 days after inoculation). The data for the number of lesions, gas exchange,
200 chlorophyll *a* fluorescence, and chlorophyll concentrations were combined after
201 determination of the homogeneity of variance by Cochran's test. The treatment means
202 were compared by the t test ($P \leq 0.05$) using R software (version 3.1.2 for Windows). The
203 data were correlated using linear correlation Pearson analysis.

204

205

206

207

208 4.3 RESULTS

209 Number of lesions (NL)

210 The NL increased by 714.3% from 2 dai (1.4 lesions) to 8 dai (11.4 lesions) (Fig.
211 1). The NL was negatively correlated with A , g_s , and E (Table 1), as with q_p , ETR, $Y(II)$,
212 $Y(NPQ)$, Chl_a and Chl_{a+b} (Table 2).

213

214 Leaf gas exchange

215 The parameters A , g_s and E dramatically decreased in the inoculated plants
216 compared with the non-inoculated plants during the assessment time course (Fig. 2A to
217 C). For A , significant decreases of 35% (3 dai) to 48% (8 dai) were observed for the
218 inoculated plants compared with the non-inoculated plants. The g_s decreased by 53% at 3
219 dai and by 69% at 8 dai compared with non-inoculated plants. E significantly decreased
220 in inoculated plants compared with non-inoculated plants at 40, 55, and 67% at 3, 5 and
221 8 dai, respectively. The C_i significantly increased by 55% at 3 dai and by 57% at 8 dai in
222 inoculated plants compared with non-inoculated plants (Fig. 2D). In the inoculated plants,
223 A was positively correlated with g_s and E , and g_s was positively correlated with E .
224 However, A , g_s and E were negatively correlated with C_i and NL (Table 1).

225

226 Chlorophyll a fluorescence

227 There was no significant difference for F_o between inoculated and non-inoculated
228 plants at different dai (Fig. 3A). However, the F_m , F_v/F_m and q_p decreased significantly in
229 inoculated compared with non-inoculated plants (Fig. 3B to D). There was a reduction in
230 F_m by 6% (3 dai), 8% (5 dai) and 9% (8 dai) in the inoculated compared with non-
231 inoculated plants. The F_v/F_m also showed significant decrease of 13% at 8 dai in the
232 inoculated compared with non-inoculated plants. The q_p significantly decreased in the

233 inoculated plants compared with non-inoculated plants: 36, 32, 23 and 22% at 3, 4, 5 and
234 8 dai, respectively.

235 The variables TTE, Y(II) and Y(NO) significantly decreased in the inoculated
236 compared with non-inoculated plants (Fig. 4A to C). TTE decreased by 34, 28, 27 and
237 26% at 3, 4, 5 and 8 dai, respectively. The Y(II) decreased by 43, 33 and 31% at 3, 4 and
238 8 dai, respectively. Y(NO) decreased by 17% (3 dai) to 35% (8 dai). The Y(NPQ)
239 significantly increased in inoculated compared with non-inoculated plants by 26, 25 and
240 24% at 3, 5 and 8 dai, respectively (Fig 4D).

241 F_v/F_m was positively correlated with Y(II). The variable q_p was positively
242 correlated with ETR, Y(II) and Y(NPQ). Similarly, ETR was positively correlated with
243 Y(II) and Y(NPQ). Negative correlations were observed between Y(NO) with q_p and ETR
244 (Table 2).

245

246 **Content of chlorophylls**

247 The content of Chl_a, Chl_b, Chl_{a+b} and Chl_a/Chl_b significantly decreased in the
248 inoculated compared with non-inoculated plants (Fig. 4A to C). The Chl_a decreased by
249 39, 46 and 49% at 3, 5 and 8 dai, respectively. Chl_b decreased by 23, 18 and 27% at 3, 5
250 and 8 dai, respectively. The concentration of Chl_{a+b} reduced by 35% at 3 dai and by 50%
251 at 8 dai. The Chl_a/Chl_b ratio decreased by 21% at 3 dai and by 45% 8 dai, indicating a
252 greater loss of chlorophyll *a* in relation to chlorophyll *b*. The concentrations of Chl_a were
253 positively correlated with Chl_{a/b} and Chl_{a+b} (Table 2).

254

255

256

257

258

259 4.4 DISCUSSION

260 *Colletotrichum* sp. causes leaf spot in açai palm and other palms (BOVI et al.
261 1977, 1987), reducing the leaf area and the growth of seedlings (Santos et al. 2005). In
262 other species, such as beans (Meyer et al. 2001) and sorghum (Resende et al. 2012)
263 anthracnose causes damage in the photosynthetic apparatus. This study demonstrated for
264 the first time the loss of photosynthetic performance, through the parameters of gas
265 exchange and chlorophyll *a* fluorescence in *E. oleracea* seedling leaves infected with
266 *Colletotrichum* sp.

267 A decrease in *A* was followed by a decrease in g_s . These reductions were
268 accompanied by sharp increases in C_i during the infection process, which suggests that
269 reductions in *A* could not be associated with a lower CO₂ entry in the stomata, but were
270 related in large part to the damage in the ability of light capture and the reduction of CO₂
271 fixation capacity in the mesophyll. These results are in agreement with what was observed
272 in eucalyptus plants infected with *Puccinia pisidii*, where g_s reduction did not prevent
273 CO₂ penetration in the leaves, so that the decrease in *A* was associated with photochemical
274 or biochemical limitations occurring in CO₂ sequestration in the chloroplasts (Alves et al.
275 2011). Similar results were also reported in rice-*Bipolaris oryzae* (Dallagnol et al. 2011)
276 and eucalyptus-*Mycosphaerella* sp. (Pinkard and Mohammed, 2006).

277 The decrease in g_s may also have caused reduction in *E*, which may be due to
278 destruction of the stomata and rupture of the leaf blade caused by the infection by
279 *Colletotrichum* sp. in açai palm leaves. In leaf area infected, the tissue death causes
280 stomatal closure because these tissues are unable to carry water, solutes and
281 photosynthesis products (Guerra et al. 2014). In bean leaves reduction of g_s caused by *C.*
282 *lindemuthianum* also resulted in drastic reductions in *E* (Polanco et al. 2014).

283 The increase in NL was followed by decreasing chl_{*a+b*} concentrations, especially
284 in chl_{*a*}. The chl_{*b*} concentrations also decreased, however, the increased damaged leaf area

285 and the decrease in the chl_a/chl_b ratio indicate that the pathogen may have preference for
286 chl_a. This result is in agreement with what has been reported in maize leaves infected by
287 *Stenocarpella macrospora* (Bermúdez-Cardona et al. 2015). In the present study the
288 reduction or destruction of chlorophyll or chloroplasts molecules may have affected the
289 ability to capture and dissipate light by leaves. This can be explained by the negative
290 correlation ($r = -0.84$) between the observed decrease in electron transport rate (ETR) and
291 increased energy dissipation as heat (Y[NPQ]) (Tatagiba et al. 2015). In addition, the
292 effective quantum yield of PSII (Y[II]) decreased with the reduction of photochemical
293 quenching coefficient (q_p). This reduction in q_p can be attributed to a smaller fraction of
294 light absorbed which is dissipated photochemically (Krause et al. 1991) or can also
295 specify photoinhibitory damage to PSII (Lima et al. 2002).

296 The damage to the photosynthetic apparatus, caused by pathogens, can also be
297 observed by a decline in maximum photochemical efficiency ratio (F_v/F_m) (Rolfe and
298 Scholes, 2010). In this study, decrease in F_v/F_m was followed by decrease in q_p , Y(II) and
299 TTE. The reduction in these variables are assigned to loss of photoprotective capacity of
300 the PSII due the oxidative damage caused by non regulation of the surplus of dissipated
301 energy in leaf tissue infected by the pathogen (Bassanezi et al, 2002; Tatagiba et al. 2015).

302 The variables initial fluorescence (F_0) and maximum fluorescence (F_m) are used
303 to estimate the F_v/F_m ratio, however, these variables are not always good indicators to
304 assess the damage caused of PSII (Iqbal et al. 2012). In the present study, the reductions
305 in F_m may have influenced the decreases in F_v/F_m ratio, suggesting that various energy
306 harvesting stages and distribution of electrons were affected by the infection with
307 *Colletotrichum* sp. Similar results were found in rice leaves infected with *Bipolaris*
308 *oryzae* (Dallagnol et al. 2015).

309

310

311 **4.5 Conclusion**

312 In conclusion, the photosynthesis in açai palm leaves is affected by the infection
313 of *Colletotrichum* sp. and the effects are mainly associated with the photochemical
314 limitations and the reductions in the CO₂ fixation ability in mesophyll. It has been proven
315 that gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence are excellent tools to quantify the loss
316 of photosynthetic functionality. These limitations imposed by anthracnose can cause
317 reduction in growth and increase the time to obtaining açai seedlings. Therefore,
318 management measures combining chemical control, biological, genetic and cultural
319 should be taken to reduce the anthracnose severity in nurseries of açai palm.

320

321 **ACKNOWLEDGMENTS**

322 The authors thank the Higher Education Personnel Improvement Coordination
323 (CAPES) for their fellowships and to the Plant Protection Laboratory (LPP) of Federal
324 Rural University of Amazonia for their logistical support.

325

326

327

328

329

330

331

332

333

334

335

336

337 **LITERATURE CITED**

- 338 Alves AA, Guimarães LMS, Chaves ARM, DaMatta FM, Alfenas AC (2011) Leaf gas
339 exchange and chlorophyll *a* fluorescence of *Eucalyptus urophylla* in response to *Puccinia*
340 *psidii* infection. *Acta Physiologiae Plantarum* 33:1831-1839.
- 341 Bermúdez-Cardona MB, Filho JAW, Rodrigues FA (2015) Leaf gas exchange and
342 chlorophyll *a* fluorescence in maize leaves infected with *Stenocarpella macrospora*.
343 *Phytopathology* 105:26-34.
- 344 Bassanezi RB, Amorim L, Bergamin Filho A, Berger RD (2002) Gas exchange and
345 emission of chlorophyll fluorescence during the monocycle of rust, angular leaf spot and
346 anthracnose on bean leaves as a function of their trophic characteristics. *Phytopathology*
347 150:37-47.
- 348 Bovi MLA, Soave J, Sugimori MH, Moraes SA, Ribeiro IA, Paradela Filho O, Cardoso
349 M (1977) Occurrence of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz (Von Arx.) on seedlings
350 of different palm species (*Euterpe Edulis* Mart., *Euterpe Oleracea* Mart. and *Euterpe*
351 *Badiocarpa* Barb. Rodr.). *Summa Phytopathologica* 3:93-95.
- 352 Bovi MLA, Júnior GG, Sáes LA (1987) Interspecific hybrids of heart of palm plant
353 (*Euterpe oleracea* x *Euterpe edulis*). *Bragantia* 46:343-363.
- 354 Cravo MS, Viégas IJM, Brasil EC (2010) Recommendations of fertilization and liming
355 to the state of Pará. 1th Ed. Eastern Amazonia Embrapa, Belém, PA. (In Portuguese).
- 356 Dallagnol LJ, Rodrigues FA, Martins SCV, Cavatte PC, DaMatta FM (2011) Alteration
357 on rice leaf physiology during infection by *Bipolaris oryzae*. *Australasian Plant Pathology*
358 40:360-365.
- 359 Dallagnol LJ, Martins SCV, DaMatta FM, Rodrigues FA (2015) Brown spot negatively
360 affects gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence in rice leaves. *Tropical plant*
361 *pathology* 40:275-278.

- 362 Debona D, Rodrigues FA, Rios JA, Martins SCV, Pereira LF, Damatta FM (2014)
363 Limitations to photosynthesis in leaves of wheat plants infected by *Pyricularia oryzae*.
364 Phytopathology 104:34-39.
- 365 Ferreira JB, Neves YYB, Nascimento GO, Figueiredo ALV, Venturin N (2012) Essential
366 oils in control of *Colletotrichum gloeosporioides*, the causal agent of anthracnose in
367 palms. Enciclopédia Biosfera 14:751-760. (In Portuguese).
- 368 Guerra AMNM, Rodrigues FA, Lima TC, Berger PG, Barros AF, Silva YCR (2014)
369 Photosynthetic capacity of cotton boll rot infected plants and supplied with silicon.
370 Bragantia 73:50-64. (In Portuguese).
- 371 Iqbal MJ, Goodwin PH, Leonardos ED, Grodzinski B (2012) Spatial and temporal
372 changes in chlorophyll fluorescence images of *Nicotiana benthamiana* leaves following
373 inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. Plant Pathology 61:1052-1062.
- 374 Krause GH and Weis E (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics.
375 Annual review of plant biology 42:313-349.
- 376 Lima ALS, DaMatta FM, Pinheiro HA, Totola MR, Loureiro ME (2002) Photochemical
377 responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit
378 conditions. Environmental Experimental Botany 47:239-247.
- 379 Maxwell K and Johnson GN (2000) Chlorophyll fluorescence - a practical guide. Journal
380 of experimental botany 51:659-668.
- 381 Meyer S, Saccardy-adjji K, Rizza F, Genty B (2001) Inhibition of photosynthesis by
382 *Colletotrichum lindemuthianum* in bean leaves determined by chlorophyll fluorescence
383 imaging. Plant, Cell & Environment 24:947-956.
- 384 Nogueira SR, Macedo PEFD, Neto RCA, Gonçalves RC, Lunz AMP (2013) Anthracnose
385 in *Euterpe precatoria* seedlings in Acre. In: 46° Brazilian Congress of Phytopathology,
386 Abstracts, Ouro Preto. MG. p. 347. (In Portuguese).

- 387 Oliveira LC, Oliveira MSP, Davide LC, Torres GA (2016) Karyotype and genome size
388 in *Euterpe* Mart. (*Arecaceae*) species. Comparative cytogenetics 10:17-25.
- 389 Oliveira MSP, Carvalho JEU, Nascimento WMO (2000) Açai (*Euterpe oleracea* Mart.).
390 Jaboticabal. SP. Funep. 49p.
- 391 Oliveira MSP, Carvalho JEU, Nascimento WMO, Muller CH (2002) Açai cultivation to
392 fruit production. Eastern Amazonia Embrapa. PA. Technique circular 26. 18p. (In
393 Portuguese).
- 394 Oxborough K and Baker NR (1997) Resolving chlorophyll *a* fluorescence images of
395 photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components
396 calculation of q_p and F_v/F_m ; without measuring F_o . Photosynthesis research 54:135-142.
- 397 Pinkard EA and Mohammed CL (2006) Photosynthesis of *Eucalyptus globulus* with
398 *Mycosphaerella* leaf disease. New Phytologist 170:119-127.
- 399 Polanco LR, Rodrigues FA, Nascimento KJT, Cruz MFA, Curvelo CRS, DaMatta FM,
400 Vale FXR (2014) Photosynthetic gas exchange and antioxidative system in common bean
401 plants infected by *Colletotrichum lindemuthianum* and supplied with silicon. Tropical
402 Plant Pathology 39:35-42.
- 403 Pérez-Jiménez J, Arranz S, Alves ER, Brito ES, Oliveira MSP, Saura-Calixto F (2011)
404 Açai (*Euterpe oleraceae*) ‘BRS Pará’: A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber
405 and high antioxidant capacity oil. Food Research International 44:2100-2106.
- 406 Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE (1989) Determination of accurate extinction
407 coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with
408 four different solvents: Verification of the concentration of chlorophyll standards by
409 atomic absorption spectroscopy. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Bioenergetics
410 975:384-394.

411 Resende RS, Rodrigues FA, Cavatte PC, Martins SCV, Moreira WR, Chaves ARM,
412 DaMatta FM (2012) Leaf gas exchange and oxidative Stress in sorghum plants supplied
413 with silicon and infected by *Colletotrichum sublineolum*. Phytopathology 102: 892-898.

414 Rios JA, Rodrigues FA, Debona D, Silva LC (2014) Photosynthetic gas exchange in
415 leaves of wheat plants supplied with silicon and infected with *Pyricularia oryzae*. Acta
416 physiologiae plantarum 36:371-379.

417 Rolfe SA and Scholes JD (2010) Chlorophyll fluorescence imaging of plant-pathogen
418 interactions. Protoplasma 247:163-175.

419 Santos AF, Tessmann D J, Silva AJC, Vida JB, Mafacioli R (2005) Diseases in palm tree
420 for palmetto. In: Embrapa Forests - Article in conference annals: Protection news seminar
421 forest. Blumenau. Abstracts. FURB. (In portuguese).

422 Silvestre WV, Pinheiro HA, Souza RODM, Palheta LF (2016) Morphological and
423 physiological responses of açaí seedlings subjected to different watering regimes. Revista
424 Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental 20:364-371.

425 Tatagiba SD, DaMatta FM, Rodrigues FA (2015) Leaf gas exchange and chlorophyll *a*
426 fluorescence imaging of rice leaves infected with *Monographella albescens*.
427 Phytopathology 105:180-188.

428

429

430

431

432

433

434

435

436

TABLES

437

438

439 **Table 1** Correlation coefficients (below diagonal) and their respective p values (above
 440 diagonal) among the net carbon assimilation rate (A), stomatal conductance to water vapor
 441 (g_s), intercellular CO₂ concentration (C_i), transpiration rate (E), and number of lesions
 442 (NL) in leaves of açai palm inoculated *Colletotrichum* sp.

Variables	A	g_s	E	C_i	NL
A	-	0.002	0.036	0.012	0.002
g_s	0.984*	-	0.016	0.038	0.006
E	0.903*	0.942*	-	0.066	0.018
C_i	-0.952*	-0.899*	-0.854 ^{ns}	-	0.010
NL	-0.986*	-0.971*	-0.939*	0.959*	-

443 * = significant with $p \leq 0.05$ and ^{ns} = not significant.

444

445

446

447

448

449

450

451

452

453

454

455

456 **Table 2** Correlation coefficients (below diagonal) and their respective p values (above diagonal) among the initial fluorescence (F_0), maximum
 457 fluorescence (F_m), maximum photochemical efficiency ratio (F_v/F_m), coefficient for photochemical quenching (q_p), electron transport rate (ETR),
 458 effective quantum yield of PSII [Y(II)], quantum yield of regulated energy dissipation [Y(NPQ)], quantum yield of non-regulated energy dissipation
 459 [Y(NO)], concentrations of chlorophyll a (Chl $_a$), chlorophyll b (Chl $_b$), chlorophyll a/b ratio (Chl $_{a/b}$), total chlorophyll (Chl $_{a+b}$), and number of
 460 lesions (NL) in leaves of açai palm inoculated *Colletotrichum* sp.

Variables	F_0	F_m	F_v/F_m	q_p	ETR	Y(II)	Y(NPQ)	Y(NO)	Chl $_a$	Chl $_b$	Chl $_{a/b}$	Chl $_{a+b}$	NL
F_0	-	0.061	0.001	0.129	0.145	0.068	0.607	0.591	0.165	0.080	0.442	0.188	0.250
F_m	-0.861*	-	0.035	0.246	0.322	0.225	0.185	0.744	0.031	0.058	0.133	0.022	0.219
F_v/F_m	-0.992*	0.905*	-	0.164	0.197	0.101	0.711	0.694	0.272	0.050	0.406	0.158	0.283
q_p	-0.768*	0.639 ^{ns}	0.728 ^{ns}	-	0.002	0.003	0.122	0.119	0.272	0.188	0.497	0.263	0.037
ETR	-0.749*	0.564 ^{ns}	0.690 ^{ns}	0.987*	-	0.003	0.079	0.077	0.310	0.284	0.543	0.324	0.041
Y(II)	-0.850*	0.660 ^{ns}	0.804*	0.983*	0.982*	-	0.173	0.168	0.277	0.173	0.548	0.287	0.070
Y(NPQ)	-0.314 ^{ns}	0.765 ^{ns}	0.229 ^{ns}	0.777*	0.834*	0.717 ^{ns}	-	0.001	0.503	0.860	0.564	0.541	0.070
Y(NO)	0.327 ^{ns}	-0.202 ^{ns}	-0.243 ^{ns}	-0.781*	-0.838*	-0.723 ^{ns}	-0.999*	-	0.481	0.850	0.543	0.521	0.065
Chl $_a$	-0.726 ^{ns}	0.911*	0.747 ^{ns}	0.613 ^{ns}	0.575 ^{ns}	0.608 ^{ns}	0.401 ^{ns}	-0.420 ^{ns}	-	0.271	0.016	0.002	0.106
Chl $_b$	-0.833*	0.866*	0.878*	0.700 ^{ns}	0.600 ^{ns}	0.717 ^{ns}	0.110 ^{ns}	-0.118 ^{ns}	0.614 ^{ns}	-	0.518	0.209	0.359
Chl $_{a/b}$	-0.454 ^{ns}	0.764*	0.486 ^{ns}	0.407 ^{ns}	0.368 ^{ns}	0.363 ^{ns}	0.349 ^{ns}	-0.368 ^{ns}	0.942*	0.389 ^{ns}	-	0.018	0.178
Chl $_{a+b}$	-0.700 ^{ns}	0.930*	0.734 ^{ns}	0.622 ^{ns}	0.562 ^{ns}	0.598 ^{ns}	0.369 ^{ns}	-0.386 ^{ns}	0.988*	0.677 ^{ns}	0.938*	-	0.108
NL	0.634 ^{ns}	-0.667 ^{ns}	-0.602 ^{ns}	-0.900*	-0.893*	-0.847*	-0.847*	0.855*	-0.797*	-0.530 ^{ns}	-0.711 ^{ns}	-0.795*	-

461 * = significant with $p \leq 0.1$ and ^{ns} = not significant.

462

463

464

465

LIST OF FIGURES

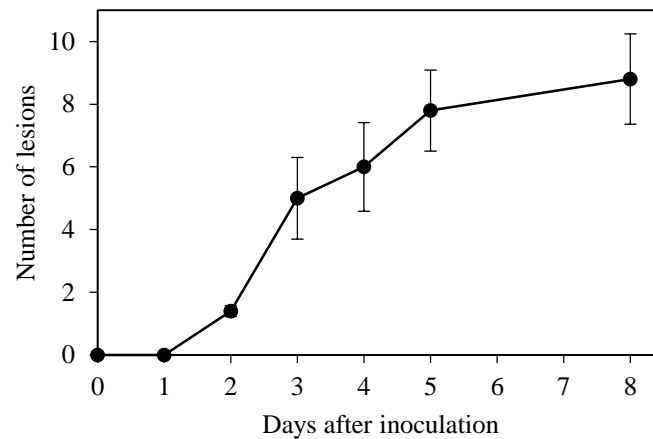


Fig. 1. Number of lesions (NL) of anthracnose in *Euterpe oleracea* leaves of plants at different days after inoculation with *Colletotrichum* sp. Error bars represent standard deviation of the means; $n = 10$.

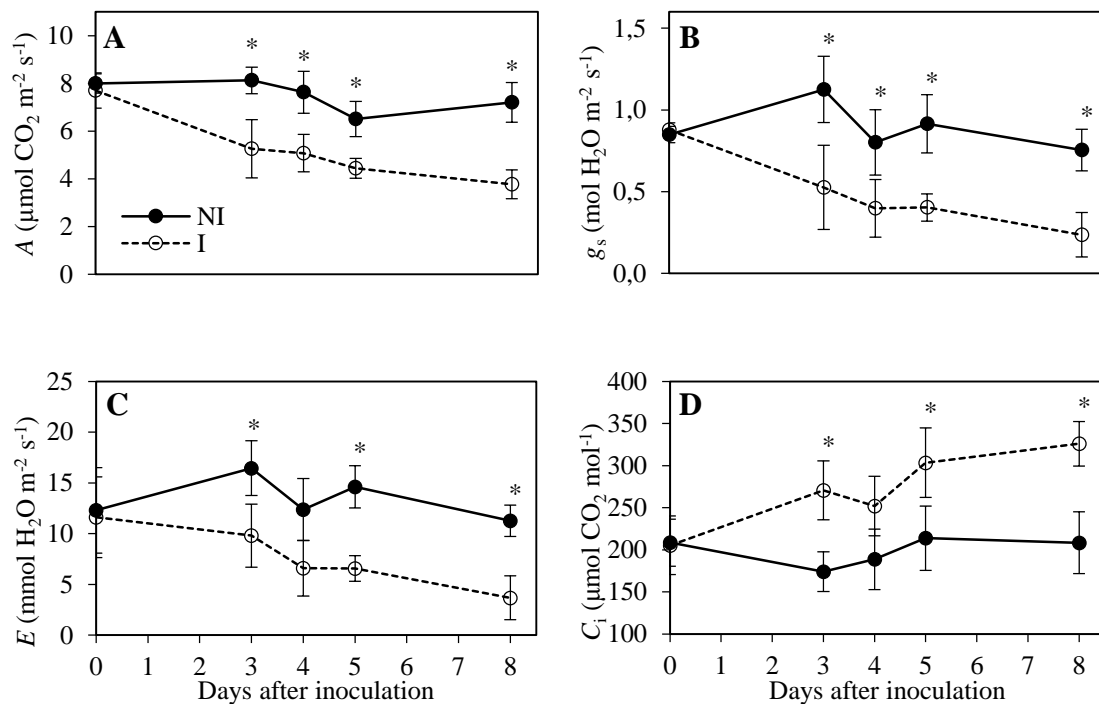


Fig. 2. **A**, Net CO_2 assimilation rate (A); **B**, stomatal conductance to water vapor (g_s); **C**, transpiration rate (E) and **D**, intercellular CO_2 concentration (C_i) determined on the leaves of *Euterpe oleracea* plants inoculated (I) or non-inoculated (NI) with *Colletotrichum* sp. Means for I and NI treatments followed by an asterisks (*) for each evaluation time are

significantly different according to the t test ($P < 0.05$). Bars represent the standard deviations of the means, $n = 10$.

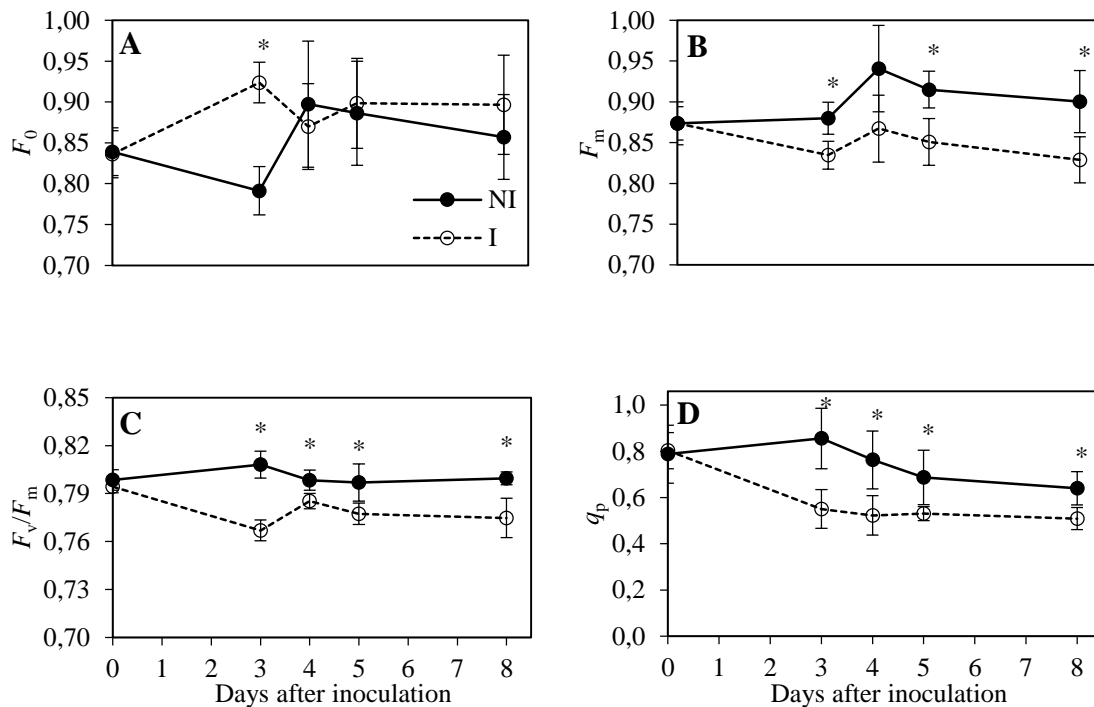


Fig. 3. **A**, Initial fluorescence (F_0); **B**, maximal fluorescence (F_m); **C**, maximum photochemical efficiency ratio (F_v/F_m); and **D**, photochemical quenching coefficient (q_p) determined on the leaves of *Euterpe oleracea* plants inoculated (I) or non-inoculated (NI) with *Colletotrichum* sp. Means for I and NI treatments followed by an asterisks (*) for each evaluation time are significantly different according to the t test ($P < 0.05$). Bars represent the standard deviations of the means, $n = 10$.

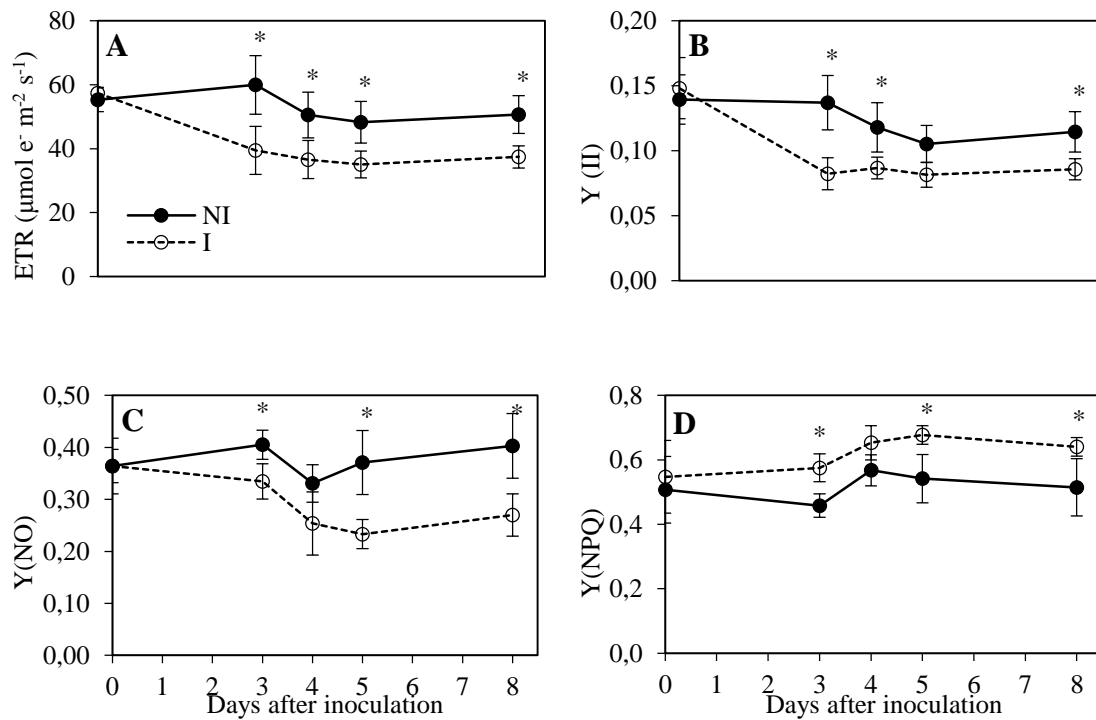


Fig. 4. **A**, Electron transfer rate (ETR); **B**, effective quantum yield of PSII [Y(II)]; **C**, quantum yield of non-regulated energy dissipation [Y (NO)]; and **D**, quantum yield of regulated energy dissipation [Y (NPQ)] determined on the leaves of *Euterpe oleracea* plants inoculated (I) or non-inoculated (NI) with *Colletotrichum* sp. Means for I and NI treatments followed by an asterisks (*) for each evaluation time are significantly different according to the *t* test ($P < 0.05$). Bars represent the standard deviations of the means, $n = 10$.

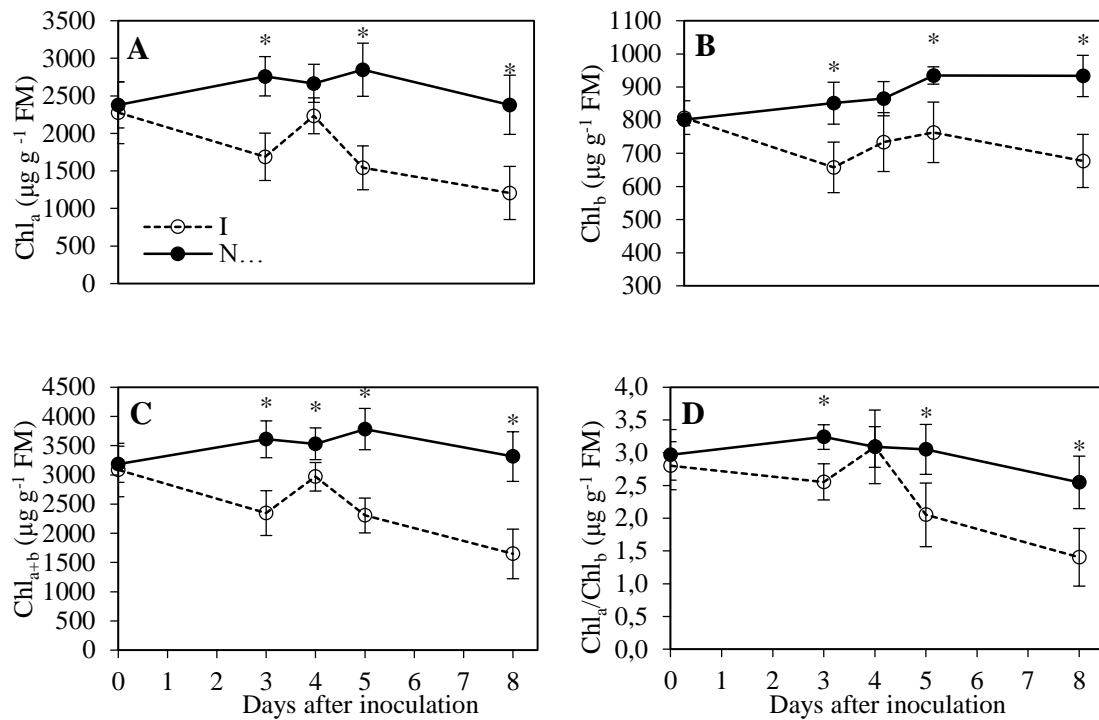


Fig. 5. **A**, Concentration of chlorophyll *a* (Chl_a); **B**, chlorophyll *b* (Chl_b); **C**, total chlorophylls (Chl_{a+b}) and **D** chlorophyll *a*/ chlorophyll *b* ratio (Chl_a/Chl_b) in the leaves of *Euterpe oleracea* plants inoculated (I) or not inoculated (NI) with *Colletotrichum* sp. Means for I and NI treatments followed by an asterisk (*) for each evaluation time are significantly different by the *t* test ($P \leq 0.05$). Bars represent the standard deviations of the means. FM = fresh matter; $n = 10$.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

CAPÍTULO 5. RIZOBACTÉRIA REDUZ ANTRACNOSE E PROTEGE O APARATO FOTOSSINTÉTICO EM MUDAS DE AÇAIZEIRO

36

LISTA DE ABREVIATURAS

37

AJ	Ácido jasmônico
AS	Ácido salicílico
AT	Etileno
A	Taxa de assimilação líquida de CO ₂
ASCPD	Área sob curva de progresso da doença
ATP	Adenosina trifosfato
BDA	Batata-Dextrose-Ágar
BRM-32111	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
BRM-32113	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>
C _i	Concentração intercelular de CO ₂
<i>Chl_a</i>	Clorofila <i>a</i>
<i>Colletotrichum</i> sp.	Fungo hemibiotrófico
DAMPs	Padrões moleculares associados ao danos
DPV	Déficit de pressão de vapor do ar
<i>E</i>	Taxa de transpiração
ETR	Taxa de transporte de elétrons
<i>F_o</i>	Fluorescência inicial
<i>F_m</i>	Fluorescência máxima
<i>F_v/F_m</i>	Eficiência fotoquímica máxima
<i>F_v/F_o</i>	Atividade potencial do fotossistema II
<i>g_s</i>	Condutância estomática ao vapor d'água
ISR	Resistência sistêmica induzida
MAMPs	Padrões moleculares associados aos microrganismos
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NPQ	Coefficiente de dissipação não fotoquímica
PAMPs	Padrões moleculares associados aos patógenos
PAR	Radiação fotossinteticamente ativa
PGPR	Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas
PSII	Fotossistema II
<i>Priming</i>	Estado fisiológico induzido pela rizobactéria
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
<i>qP</i>	Coefficiente de dissipação fotoquímica
R-61	<i>Bacillus thuringiensis</i> YBT-1518
R-92	<i>Pseudoruegeria sabulilitoris</i> strain GJMS-35
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SAR	Resistência sistêmica adquirida
UFC	Unidade Formadora de Colônia
Y(II)	Rendimento quântico efetivo do PSII
Y(NO)	Rendimento quântico da dissipação de energia não regulada
ΦPSII	Rendimento quântico do fotossistema II

38

39

40

41

LISTA DE FIGURAS

42

Figura 1. (A) Número de lesões por folha e (B) área sob a curva de progresso da doença (ASCPD) em folhas de mudas de açaizeiro inoculadas (cinco meses de idade) com rizobactérias e infectadas *Colletotrichum* sp. Grupo 1 (controle), grupo 2 (BRM-32111, BRM-32113 e R-61) e grupo 3 (R-92). As médias foram comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$).

Figura 2. [A] Taxa de assimilação líquida de CO_2 (A), [B] condutância estomática ao vapor de água (g_s), [C] concentração intercelular de CO_2 (C_i) e [D] taxa de transpiração em mudas de açaizeiro (cinco meses de idade) tratadas com rizobactérias e desafiadas por *Colletotrichum* sp. Grupo 1 (controle), grupo 2 (BRM-32111, BRM-32113 e R-61) e grupo 3 (R-92). As médias foram comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$).

Figura 3. [A] Fluorescência inicial (F_o), [B] Fluorescência máxima (F_m), [C] atividade potencial do PSII (F_v/F_o), [D] eficiência fotoquímica máxima do PSII (F_v/F_m), [E] coeficientes de extinção fotoquímica (qP) e [F] não fotoquímica (NPQ), [G] taxa de transferência de elétrons (ETR), [H] rendimento quântico do PSII (ϕPSII), [I] rendimento quântico da dissipação de energia não regulada $Y(NO)$ e [J] rendimento quântico efetivo do PSII $Y(II)$ em folhas de mudas de açaizeiro (cinco meses de idade) tratadas com rizobactérias e desafiadas por *Colletotrichum* sp. Grupo 1 (controle), grupo 2 (BRM-32111, BRM-32113 e R-61) e grupo 3 (R-92). As médias foram comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$)

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

LISTA DE TABELA

57

58

Tabela 1. Código de identificação, origem, cor, características bioquímicas e classificação taxonômica dos quatro isolados de rizobactérias inoculados em mudas de açaizeiro.

59

60

61

62

63

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

85

86

87

88

89 **5. RIZOBACTÉRIA REDUZ ANTRACNOSE E PROTEGE O APARATO**
90 **FOTOSSINTÉTICO EM MUDAS DE AÇAIZEIRO***

91 ***Artigo 4: Normas da revista Plant Pathology**

92

93 **RESUMO**

94 A antracnose causada por *Colletotrichum* sp. diminui o desempenho fotossintético e
95 prejudica a produção de mudas de açaizeiro em viveiros. Atualmente, não há fungicidas
96 registrados para o controle de *Colletotrichum* sp. em açaizeiro. Entretanto, a utilização
97 das rizobactérias pode ser uma estratégia eficiente para reduzir as machas foliares
98 causadas por patógenos. O objetivo do estudo foi avaliar a severidade de *Colletotrichum*
99 sp., e as alterações nas trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* em mudas de açaizeiro
100 inoculadas com rizobactérias. Foram inoculados quatro isolados de rizobactérias e um
101 controle (sem inoculação) em raízes de mudas de açaizeiro. Após 120 as folhas foram
102 pulverizadas suspensão de *Colletotrichum* sp. (3×10^5 conídios ml^{-1}). Os dados de
103 severidade e ASCPD foram submetidos à análise de agrupamento para separar os isolados
104 em grupos de acordo com o grau de similaridade. Foram formados três grupos, sendo o
105 grupo 1 composto pelo controle, o grupo 2 composto pelas rizobactérias BRM-32111,
106 BRM-32113 e R-61 e grupo 3 composto pela rizobactéria R-92. Todas as rizobactérias
107 dos grupos 2 e 3 reduziram a severidade e a ASCPD da antracnose e, aliviaram a
108 insuficiência fotossintético em relação ao controle. Essas rizobactérias melhoram a
109 proteção do aparato fotossintético e podem ser utilizadas como alternativa de manejo da
110 antracnose causa por *Colletotrichum* sp.

111

112 **Palavras-chave:** *Euterpe oleracea*, *Colletotrichum* sp. Controle biológico, Fotossíntese.

113

114

115

116

117

118

119

120

121

122

123

124 **ABSTRACT**

125 Anthracnose caused by *Colletotrichum* sp. decreases the photosynthetic performance and
126 drastically damages the production of açai seedlings in nurseries. Currently, there are no
127 fungicides registered for the control of *Colletotrichum* sp. in açai. However, the use of
128 rhizobacteria may be an efficient strategy to reduce leaf manure caused by pathogens. The
129 objective of the study was to evaluate the severity of *Colletotrichum* sp., And the changes
130 in gaseous changes and fluorescence of chlorophyll *a* in acai palm seedlings inoculated
131 with rhizobacteria. Were inoculated four rhizobacteria isolates and one control (not
132 inoculated) in roots of açazeiro seedlings. At 120 days after inoculation of the
133 rhizobacteria in the leaves were infected with *Colletotrichum* sp. The severity and ASCPD
134 data were submitted to cluster analysis to separate the isolates into groups according to the
135 degree of similarity. Were formed three groups, with group 1 composed of the control,
136 group 2 composed of rhizobacteria BRM-32111, BRM-32113 and R-61 and group 3
137 composed of rhizobacteria R-92. All group 2 and 3 rhizobacteria reduced severity and
138 ASCPD. All the rhizobacteria of 2 and 3 groups reduced the severity and the ASCPD of
139 the anthracnose and alleviated the photosynthetic insufficiency in relation to the control.
140 These rhizobacteria improve the protection of the photosynthetic apparatus and can be used
141 as an alternative to control the anthracnose caused by *Colletotrichum* sp.

142

143 **Key words:** *Euterpe oleracea*, *Colletotrichum* sp. Biological control, Photosynthesis

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

156

157

158

159 5.1 Introdução

160 O açaizeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma palmeira originária da região
161 Amazônia e de grande interesse econômico no mercado nacional e internacional (Oliveira
162 et al. 2016). A demanda pela polpa do fruto é crescente devido a sua riqueza nutricional
163 e benefícios a saúde humanas (Silva Santos et al. 2014). Entretanto, a incidência da
164 antracnose causada pelo fungo *Colletotrichum* sp., prejudica a produção de mudas de
165 açaizeiro em viveiros (Oliveira and Neto 2004) e limita a expansão dos plantios
166 comerciais em terra firme (Castro et al. 2017).

167 O *Colletotrichum* sp. é um fungo hemibiotrófico que infecta as folhas e provoca
168 redução da aérea foliar sadia. Os sintomas começam como pequenos pontos de manchas
169 circulares ou elípticas de cor marrom, com área central clara e halo clorótico (Bovi et al.
170 1977). Em viveiros, a incidência da antracnose é favorecida pela alta umidade,
171 temperaturas amenas, adensamento de plantas e deficiência nutricional (Leão et al. 1987).
172 O controle do *Colletotrichum* sp. tem sido realizado com aplicação de fungicidas. Porém,
173 apresentam baixa eficiência e não são registrados pelo Ministério da Agricultura
174 brasileiro para o controle da antracnose em mudas de açaizeiro (Oliveira and Carvalho
175 2000).

176 O uso excessivo de fungicidas pode ser evitada com a adoção de tecnologias que
177 auxiliam as plantas no controle das doenças e preservam o meio ambiente. O uso das
178 rizobactérias pode ser uma estratégia promissora para alcançar uma agricultura
179 ecologicamente sustentável. (ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006; JHA et
180 al., 2013). BUENO et al. (2017) reportaram que a inoculação da *B. pyrrocinia* e *P.*
181 *fluorescens* suprimiram a expansão das lesões da escaldadura em plantas de arroz, essa
182 resposta foi acompanhada de maiores atividades das enzimas peroxidases e catalase e,
183 maior proteção do aparato fotossintético.

184 As plantas são organismos sésseis e, portanto, não podem escapar de ameaças
185 potenciais por agentes patogênicos ou condições ambientais adversas. Contudo, as plantas
186 desenvolveram diversos mecanismos de defesa. A primeira linha envolve a capacidade
187 da planta de reconhecer uma grande variedade de padrões moleculares associados a
188 microrganismo (MAMPs ou PAMPs), como flagelina, quitina, glicoproteínas,
189 polissacarídeos e lipopolissacarídeos, por receptores da membrana plasmática da célula
190 vegetal, denominado de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (PIETERSE et
191 al, 2012). Este reconhecimento ativa a imunidade de defesa desencadeada por MAMPs
192 ou defesa basal não específica (JONES & DANGL, 2006; SPOEL & DONG, 2012). Além
193 dos MAMPs, as PRRs também reconhecem moléculas endógenas denominados padrões

194 moleculares associados a danos (DAMPs), que também leva a ativação de respostas
195 imunes (LIU et al, 2013).

196 A segunda linha de defesa diz respeito a dois mecanismos descritos de SAR
197 (resistência sistêmica adquirida) que são induzidos após a infecção por patógenos e a ISR
198 (resistência sistêmica induzida) que é desencadeada por microrganismo benéficos como
199 as PGPRs. O SAR desenvolve-se vários dias depois da infecção inicial e o principal sinal
200 endógeno envolvido é ácido salicílico (AS). Ao contrário da SAR, a ISR é dependente de
201 AS, mas requer componentes das vias de sinalização do ácido jasmônico (AJ) e etileno
202 (ET) para o controle do patógeno (VAN LOON et al., 2006, TAIZ & ZEIGER, 2013).

203 Uma característica comum as respostas da resistência induzida por microrganismo
204 benéfico é o efeito priming. Esta condição indica que plantas tratadas com PGPRs são
205 mais tolerantes as doenças porque são capazes de desencadear o seu metabolismo
206 defensivo de forma preventiva, um estado fisiológico denominado de priming, onde as
207 plantas mostram ativação mais rápida e mais forte das respostas de defesa quando
208 desafiadas com patógenos (ZHANG; REDDY; KLOEPPER, 2004; BARRIUSO;
209 SOLANO; GUTIÉRREZ MAÑERO, 2008; CONRATH, 2011, CONRATH et al., 2015).

210 Plantas de arroz infectadas com *Magnaporthe oryzae* e *Monographella albescens*
211 apresentaram maior atividade das enzimas de defesa catalase, peroxidase, quitinase e
212 beta-1,3-glucanase pelas PGPR, contribuindo para a redução da severidade da brusone e
213 da escaldadura (FILIPPI et al., 2011; BUENO et al, 2017). Esse resultado mostra que o
214 priming é uma alternativa à ativação da resistência induzida de longa duração, pois atenua
215 os mecanismos de resistência das plantas (CONRATH et al., 2015). O priming é
216 considerado um mecanismo de custo relativamente baixo no avanço para a defesa da
217 planta (CONRATH, 2011, CONRATH et al., 2015; HOLESKI et al., 2012).

218 Atualmente não existem estudos sobre o controle de *Colletotrichum* sp. por
219 PGPRs em mudas de açaizeiro. O objetivo do estudo foi avaliar a severidade de
220 *Colletotrichum* sp., e as alterações nas trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* em
221 mudas de açaizeiro inoculadas com rizobactérias.

222

223 **5.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

224 **Crescimento da planta**

225 As sementes de açaizeiro foram semeadas em bandejas plásticas contendo como
226 substrato fibra de coco triturado. Aos 32 dias após a germinação, as mudas que
227 apresentaram duas folhas expandidas e altura próxima de 13 cm foram transplantadas
228 para sacos de plástico (15 x 25 cm, comprimento x altura) contendo substrato composto

229 de 60% de Latossolo e 40% de cama de aviário curtida. O cultivo foi realizado no viveiro
 230 da Universidade Federal Rural da Amazônia em Belém, PA, que apresenta características
 231 climáticas do tipo AMI de acordo com a classificação de Koppen-Geiger. Durante o
 232 período experimental as condições ambientais foram de 30 ± 2 °C de temperatura do ar,
 233 $75 \pm 5\%$ de umidade relativa, $2 \pm 0,2$ kPa de DPV do ar e 700 ± 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de
 234 radiação incidente. O pH do substrato e as concentrações de macro e micronutrientes
 235 foram ajustadas conforme recomendado para açaizeiros (Silva Cravo et al. 2007). As
 236 plantas foram irrigadas diariamente por microaspersão para repor a água perdida pela
 237 evapotranspiração e manter a umidade do solo próximo da capacidade de campo (Klar et
 238 al. 1966).

239

240 **Caracterização das rizobactérias**

241 As rizobactérias provenientes de plantas de açaizeiro (R-61 e R-92) e plantas de
 242 arroz: *Pseudomonas fluorescens* (BRM-32111) e *Burkholderia pyrrocinia* (BRM-32113)
 243 estão descritas na Tabela 1 e estão armazenadas e preservadas na coleção de
 244 microrganismos do Laboratório de Proteção de Plantas da Universidade Federal Rural da
 245 Amazônia, Belém, PA, Brasil.

246

247 **Tabela 1.** Código de identificação, origem, cor, características bioquímicas e classificação taxonômica dos
 248 quatro isolados de rizobactérias inoculados em mudas de açaizeiro.

249

Código ^a	Origem ^b	Cor ^c	Bioquímica					Taxonomia ^e
			AIA ^d	Celu. ^e	Fosf. ^f	Sider. ^g	Fix. N ^h	
BRM32111	PA/Brasil	Amarela	-	+	+	+	-	<i>Pseudomonas Fluorescence*</i>
BRM32113	PA/Brasil	Rosa	+	+	-	+	-	<i>Burkholderia Pyrrocinia*</i>
R-61	AM/Brasil	Creme	+	+	-	-	+	<i>Bacillus thuringiensis</i>
R-92	AM/Brasil	Amarelo	-	-	-	-	-	<i>Pseudoruegeria sabulilitoris</i>

250

251 ^aCódigo de identificação das rizobactérias na coleção de microrganismos do Laboratório de Proteção de
 252 Plantas da Universidade Federal Rural da Amazônia. ^bOrigem geográfica de cada rizobactéria. ^cCor da
 253 colônia (MALKE 1991). ^eClassificação taxonômica (*NASCENTE et al. 2016). ^dProdução de ácido indol
 254 acético (CATTELAN 1999). ^eProdução de celulase (TEATHER and WOOD 1982). ^fSolubilização de
 255 fosfato (SYLVESTER-BRADLEY et al. 1982). ^gProdução de sideróforos e ^hFixação de nitrogênio
 256 (DÖBEREINER and DAY 1976).

257

258

259

260 **Inoculação das rizobactérias em mudas de açaizeiro**

261 As rizobactérias foram cultivadas em meio sólido 523 (KADO and HESKETT
262 1970) durante 48 h a 28 °C. As suspensões bacterianas foram preparadas com água
263 destilada e esterilizada, e a concentração foi ajustada em espectrofotômetro para
264 absorvância de 540 = 0,5 (10⁸ UFC). As plântulas tiveram suas raízes seccionadas para
265 padronização do comprimento radicular em 7 cm e, antes do transplântio para os sacos
266 plásticos com o substrato, foram imersas em 500 mL de cada suspensão bacteriana
267 durante 30 min. As plântulas controle foram imersas em água destiladas e esterilizada.
268 Em seguida, foi realizada uma irrigação por semana durante um mês com 50 mL/plântula
269 de cada suspensão bacteriana para plantas tratadas, e com 50 mL/plântula de água
270 destilada e esterilizada para as plantas controle. Após esse período, foi mantida uma
271 irrigação a cada mês até o terceiro mês de idade das mudas de açazeiro.

272

273 **Inoculação do *Colletotrichum* sp. em mudas de açazeiro**

274 O fungo *Colletotrichum* sp. foi obtido de mudas de açazeiro que apresentaram
275 sintomas característicos da antracnose no viveiro da UFRA. As folhas com sintomas
276 foram levadas para o Laboratório de Proteção de Plantas para identificação e isolamento
277 do fungo. O isolado foi cultivado em placas de Petri contendo meio BDA (batata, dextrose
278 e ágar) e incubado a 28 °C durante 7 dias com luz fluorescente para estimular a
279 esporulação. A inoculação por pulverização foi feita com a suspensão do *Colletotrichum*
280 sp. [3x10⁶] aos 112 dias após o semeio das mudas de açazeiro.

281

282 **Avaliação da intensidade da doença**

283 A severidade da antracnose em folhas do açazeiro foi estimada pela contagem
284 direta do número de lesões aos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 dias após a inoculação. Os valores
285 de 10 dias após a inoculação foram utilizados para calcular a área sob a curva de progresso
286 da doença (ASCPD) (SHANER AND FINNEY, 1977).

287

288 **Trocas gasosas**

289 Os parâmetros de trocas gasosas foram mensurados na primeira folha
290 fisiologicamente madura, completamente expandida e com sintomas da mancha de
291 *Colletotrichum* sp., do ápice para a base, aos cinco meses após inoculação das
292 rizobactérias. A assimilação líquida de CO₂ (*A*), condutância estomática ao vapor de água
293 (*g_s*), concentração intercelular de CO₂ (*C_i*) e taxa de transpiração (*E*) foram medidos entre
294 08:00 e 10:00 h usando um sistema de troca de gás de fluxo aberto portátil (LI-6400XT,
295 LI-COR, Lincoln, NE) sob uma concentração externa de CO₂ de 400 µmol mol⁻¹ de ar e

296 PAR artificial de 900 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Este intervalo de medição (08:00 - 10:00 h)
 297 foi ajustado de acordo os resultados obtidos com a curva diurna de trocas gasosas para a
 298 espécie (Silvestre et al. 2016). Todas as medidas foram realizadas com temperatura do ar
 299 de 34 ± 1 ° C, umidade relativa do ar de $56 \pm 5\%$, radiação incidente de 463 ± 132 μmol
 300 $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e déficit de pressão de vapor de ar de $2,6 \pm 0,6$ kPa. A quantidade de luz azul foi
 301 ajustada para 10% do PAR para otimizar a abertura estomática.

302

303 **Fluorescência da clorofila *a***

304 A fluorescência da clorofila *a* foi determinada simultaneamente com as trocas
 305 gasosas utilizando-se uma câmara de fluorescência (IG 6400-40; LI-COR Inc.) integrada
 306 ao sistema portátil de fluxo aberto de trocas gasosas. As folhas de açazeiro adaptadas no
 307 escuro durante 30 min foram iluminadas com um pulso de luz fraca e modulada ($0,03$
 308 $\mu\text{mol} \text{m}^{-2} 180 \text{s}^{-1}$) para obter a fluorescência inicial (F_o). Um pulso de luz branca saturante
 309 de $6.000 \mu\text{mol} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foi aplicado durante 0,8s para garantir a máxima emissão de
 310 fluorescência (F_m). As folhas amostradas foram então iluminadas durante 300s com uma
 311 luz actínia ($250 \mu\text{mol} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) para obter o rendimento da fluorescência no estado
 312 estacionário (F_s). Posteriormente, pulsos de luz branca saturantes foram aplicados para
 313 atingir a fluorescência máxima (F'_m). A luz actínia foi então desligada e uma iluminação
 314 vermelho-distante ($2 \mu\text{mol} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foi aplicado para medir a fluorescência inicial adaptada
 315 na luz (F'_o). A partir dessas medições, os seguintes parâmetros foram calculados:
 316 atividade potencial do PSII [$F_v/F_o = (F_m - F_o) / F_o$], eficiência fotoquímica máxima do PSII
 317 [$F_v/F_m = (F_m - F_o) / F_m$] (OXBOROUGH and BAKER 1997), coeficientes de dissipação
 318 fotoquímica [$qP = (F'_m - F_s) / (F'_m - F'_o)$] e não-fotoquímica [$NPQ = (F_m/F'_m) - 1$],
 319 rendimento quântico do transporte de elétrons no PSII [$\phi\text{PSII} = (F'_m - F_s) / F'_m$] e a taxa
 320 de transferência de elétrons ($\text{ETR} = \phi\text{PSII} \cdot \text{PPFD} \cdot f \cdot \alpha$). O rendimento quântico efetivo do
 321 PSII foi calculado como $Y(\text{II}) = (F'_m - F_s) / F_m$ e o rendimento quântico da dissipação de
 322 energia não regulada $Y(\text{NO})$ foi calculado como $Y(\text{NO}) = F_s / F_m$ (MAXWELL and
 323 JOHNSON 2000).

324

325 **Análise estatística**

326 O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com cinco
 327 tratamentos e cinco repetições. Os tratamentos consistiram de mudas controle (sem as
 328 rizobactérias e inoculadas com *Colletotrichum*) e mudas tratadas com rizobactérias
 329 (BRM- 32111, BRM 32113, R-61 e R-92) e inoculadas com *Colletotrichum* sp. Os dados
 330 referentes ao número de lesões e área sob a curva de progresso da doença (ASCPD) foram

331 submetidos à análise de agrupamento de acordo com matriz de similaridade Euclidiana.
 332 Os grupos obtidos foram submetidas a análise de variância (ANOVA) e as médias foram
 333 comparadas pelo teste Student-Newman-Keuls ($p < 0.05$) usando o software R versão 3.1.
 334

335 5.3 RESULTADOS

336 Severidade

337 A análise de agrupamento revelou a formação de 3 grupos, onde o grupo 1 foi
 338 formado por mudas controle, o grupo 2 pelas BRM32113, BRM32111 e R-61 e o grupo
 339 3 por R-92. Todas as rizobactérias reduziram a severidade da doença em 26% e 45%
 340 respectivamente nas mudas dos grupos 2 e 3 em comparação às mudas controle (Figura
 341 1A). A ASCPD foi reduzida em 25% para BRM32111, BRM32113 e R-61 (grupo 2) e
 342 em 47% para R-92 (grupo 3) em comparação as plantas controle (Figura 1B).
 343

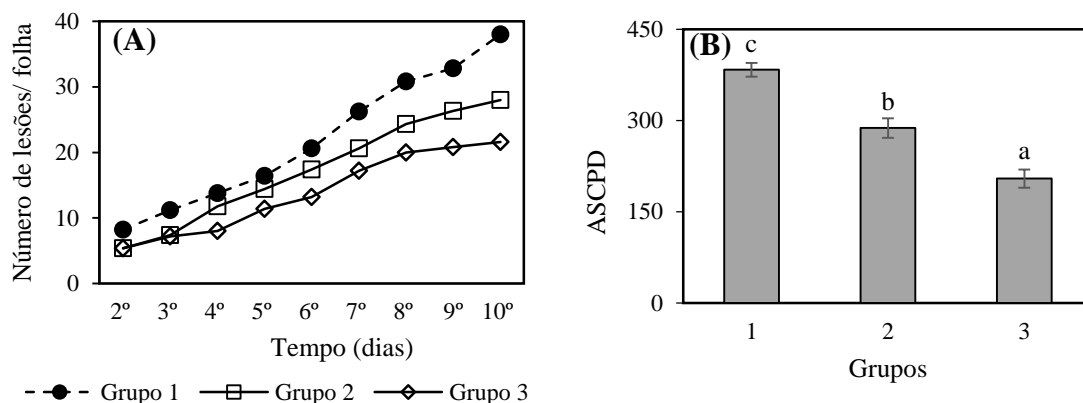


Figura 1. (A) Número de lesões por folha e (B) área sob a curva de progresso da doença (ASCPD) em folhas de mudas de açazeiro inoculadas (cinco meses de idade) com rizobactérias e infectadas *Colletotrichum* sp. Grupo 1 (controle), grupo 2 (BRM32111, BRM32113 e R-61) e grupo 3 (R-92). As médias foram comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$).

344

345 Trocas gasosas

346 Em relação ao controle (grupo 1), as rizobactérias dos grupos 2 e 3 induziram
 347 aumentos de 57% em A , 33% em g_s e 24% em E . Porém, o C_i nas mudas do grupo 2 e 3
 348 diminuiu em 11% em relação ao controle (Figura 2).
 349

350

351

352

353

354

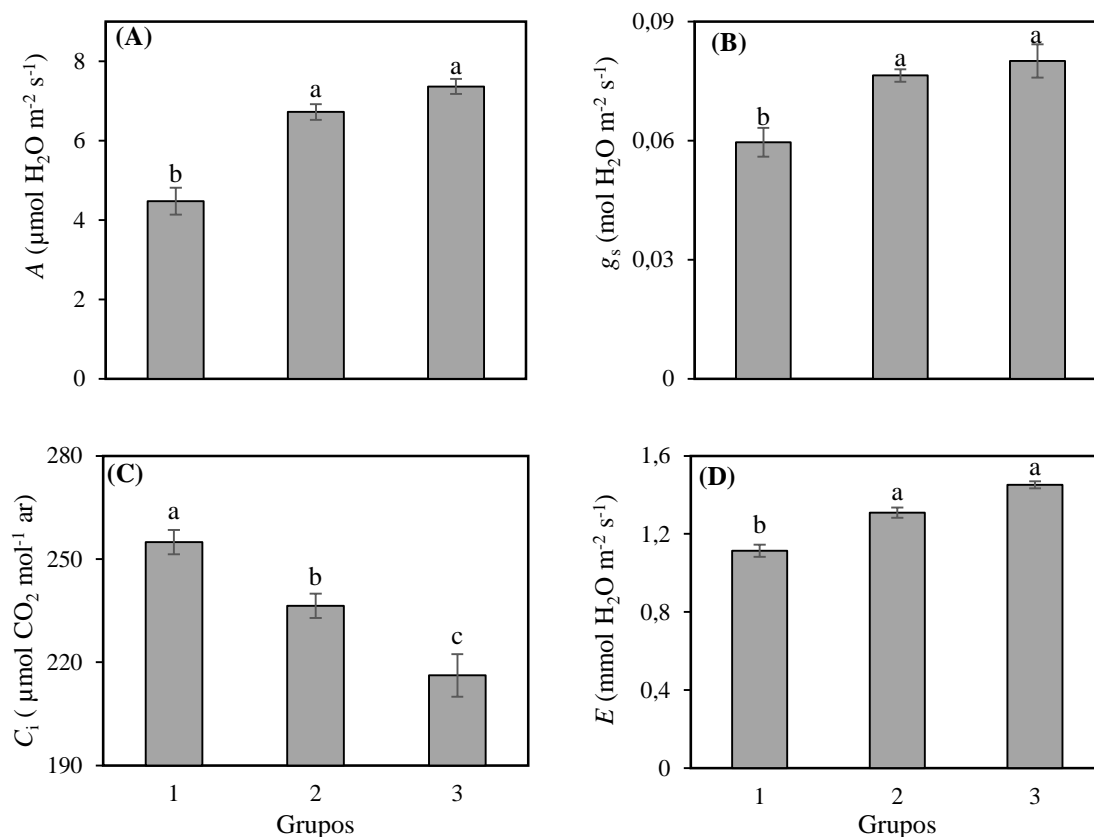


Figura 2. [A] Taxa de assimilação líquida de CO_2 (A), [B] condutância estomática ao vapor de água (g_s), [C] concentração intercelular de CO_2 (C_i) e [D] taxa de transpiração em mudas de açaizeiro (cinco meses de idade) tratadas com rizobactérias e desafiadas por *Colletotrichum* sp. Grupo 1 (controle), grupo 2 (BRM-32111, BRM-32113 e R-61) e grupo 3 (R-92). As médias foram comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$).

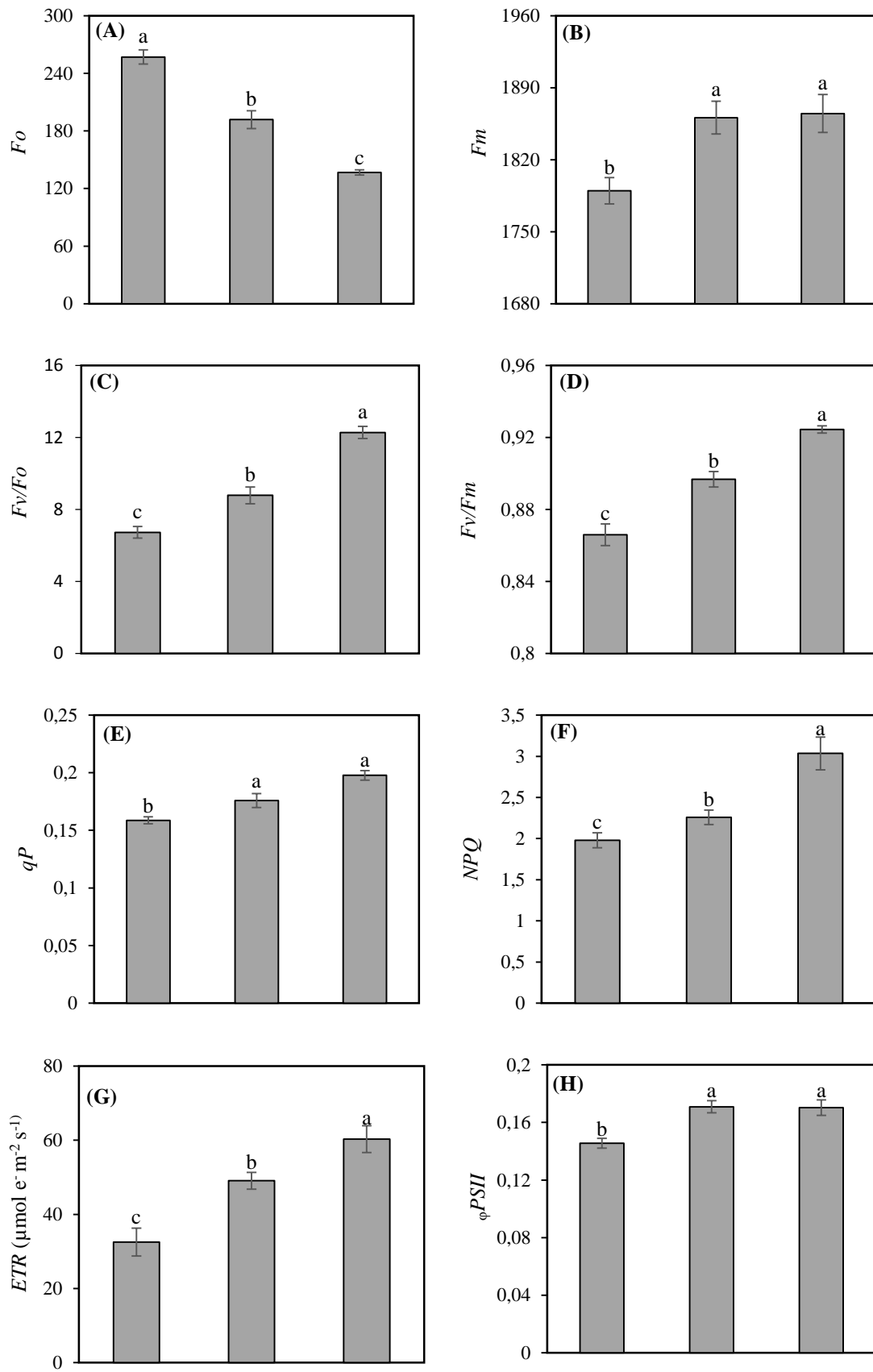
354

355

356 Fluorescência da clorofila *a*

357 Todos os isolados provenientes da rizosfera do arroz (BRM32113 e BRM 32111)
 358 e do açaizeiro (R-61 e R-92) induziram menor F_o (36%) em relação ao controle (grupo
 359 1). Entretanto todas as outras variáveis de fluorescência da clorofila *a* aumentaram nos
 360 grupos 2 e 3, em 4% para F_m , em 56% para F_v/F_o , em 6% para F_v/F_m , em 19% para qP ,
 361 em 33% para NPQ, em 13% para ϕPSII , em 68% para ETR, em 42% para $Y(\text{NO})$ e em
 362 49% para $Y(\text{II})$ em comparação ao controle (Figura 3).

363



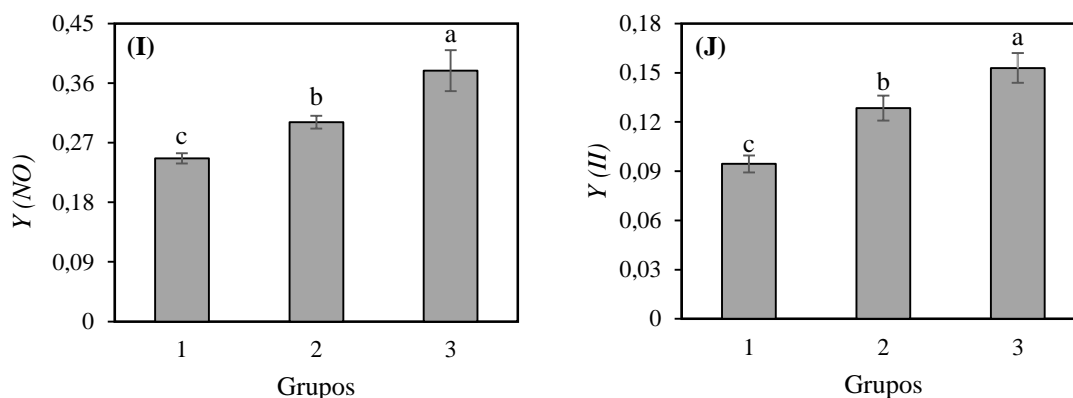


Figura. 3. [A] Fluorescência inicial (F_o), [B] Fluorescência máxima (F_m), [C] atividade potencial do PSII (F_v/F_o), [D] eficiência fotoquímica máxima do PSII (F_v/F_m), [E] coeficientes de extinção fotoquímica (qP) e [F] não fotoquímica (NPQ), [G] taxa de transferência de elétrons (ETR), [H] rendimento quântico do PSII (ϕ_{PSII}), [I] rendimento quântico da dissipação de energia não regulada $Y(NO)$ e [J] rendimento quântico efetivo do PSII $Y(II)$ em folhas de mudas de açazeiro (cinco meses de idade) tratadas com rizobactérias e desafiadas por *Colletotrichum* sp. Grupo 1 (controle), grupo 2 (BRM-32111, BRM-32113 e R-61) e grupo 3 (R-92). As médias foram comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$).

364

365

366 5.4 DISCUSSÃO

367 O presente estudo relata pela primeira vez o potencial das rizobactérias
 368 promotoras do crescimento de plantas (PGPR) na redução da antracnose e alívio da
 369 insuficiência fotossintética em folhas de açazeiro infectadas com *Colletotrichum* sp. As
 370 PGPR *P. fluorescens* (BRM-32111) e *B. pyrrocinia* (BRM-32113), já foram registradas
 371 como promotoras de crescimento e supressoras de brusone e escaldadura em arroz
 372 (FILIPPI et al., 2011; BUENO et al., 2017). As PGPR R-92 e R-61 destacaram-se na
 373 redução do número de lesão e ASCPD, contribuindo como alternativas de manejo da
 374 mancha foliar de antracnose, pois não há registro de fungicida para essa doença em mudas
 375 de açazeiro em viveiros.

376 Os resultados sugerem que as PGPR ativam mecanismos de defesa latentes nas
 377 plantas, sendo expressos após exposição sistêmica das plantas ao patógeno (VAN LOON
 378 E PIETERSE, 2006; VAN LOON, 2007). Esses mecanismos iniciam com estado de
 379 priming no qual as plantas alcançam um estado fisiológico com ativação mais rápida e
 380 mais forte as respostas de defesa quando desafiadas com patógenos (ZHANG; REDDY;
 381 KLOPPER, 2004; BARRIUSO; SOLANO; GUTIÉRREZ MAÑERO, 2008;
 382 CONRATH et al., 2015). Como obtido, principalmente, com a R-92 que reduziu em 45%
 383 o número de lesões causada pela antracnose em relação as plantas controle.

384 Possivelmente, as PGPR desencadearam o MAMPs agindo contra ação do fungo
 385 de forma rápida e transitória (MATHYS et al., 2012). As respostas iniciais envolvem o

386 fluxo de íons através da membrana plasmáticas, através do influxo transitório de Ca²⁺ e
387 H⁺ bem como o efluxo K⁺ e Cl⁻. O desequilíbrio e a modulação da atividade dos canais
388 de íons resultam em rápidas mudanças no potencial iônico da membrana plasmática,
389 sugerindo que a despolarização bem como sinais elétricos locais e distais se espalhem na
390 planta podendo desempenhar um papel significativo na indução da imunidade sistêmica.
391 Durante o processo de despolarização induzidos pelas PGPRs, provavelmente houve a
392 geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e alterações do pH nas células vegetais
393 e, posteriormente, a deposição de calose e acumulação de proteínas de fitoalexinas
394 (NAWROCHA & MALOLEPSZA 201; TAIZ & ZEIGER, 2013; LEHMANN et al.,
395 2015).

396 A infecção do fungo hemibiotrófico *Colletotrichum* sp. em plantas de soja e
397 açaizeiro resulta em manchas que afetam o aparato fotossintético, principalmente por
398 induzir o fechamento estomático, reduzir o teor de clorofila e na redução da taxa de
399 transpiração, além da atividade da rubisco (MEYER et al., 2001, RESENDE et al., 2012
400 e POLANCO et al., 2014, CASTRO et al. 2017). No presente estudo, as rizobactérias
401 mitigaram os danos ao aparato fotossintético em plantas de açaizeiro desafiadas com
402 *Colletotrichum* sp., possivelmente as rizobactérias induziram a produção de moléculas
403 antimicrobianas, indução de genes responsivos de defesa, deposição de calose, produção
404 de ROS em torno dos tecidos infectados, o que leva a resistência local ao patógeno invasor
405 (SCHNEIDER & COLLMER, 2010; SPOEL & DONG, 2012; LEHMANN et al., 2015).

406 O aumento de F_m e a redução do F_o induzidas pelas rizobactérias nas mudas
407 influenciaram positivamente nos incrementos de F_v/F_m , indicando que as mudas de
408 açaizeiro inoculadas com as PGPR foram eficientes na utilização da energia luminosa.
409 Além disso, as PGPR regularam a capacidade do transporte de elétrons e a geração de
410 ATP e NADPH para etapa bioquímica. O incremento de F_v/F_m reflete na maior atividade
411 dos centros de reações do PSII que pode estar associada a integridade da proteína D1
412 induzida pela rizobactéria nas plantas de açaizeiro. Essa proteína é responsável pela
413 transferência de elétrons da molécula água para a Chl_a associada ao PSII (LUCAS et al.,
414 2014), sugerindo que as rizobactérias atenuaram no dano da fotoinibição. (TAIZ &
415 ZEIGER 2013).

416 O efeito protetor induzido pelas rizobactérias é observável também Y (NO) o que
417 indica que o mecanismo de regulação da proteção torna-se eficaz na presença das
418 rizobactérias em comparação as plantas controle. O aumento de Y (NO) sugere que houve
419 maior disponibilidade de energia para assimilação do CO₂ (KLUGHAMMER &
420 SCHREIBER, 2008). O parâmetro qP representa a dissipação fotoquímico, enquanto que

421 NPQ representa a dissipação não fotoquímica, relativa à dissipação de calor que ocorre
422 como uma fotoproteção do PSII (ZHANG et al. 2017). Os maiores valores de qp e NPQ
423 indicam que plantas tratadas com as PGPR aumentam o consumo da energia luminosa
424 absorvida e protegem o aparato fotossintético através da eficiência na dissipação do
425 excedente de energia na forma de calor. Por outro lado, valores mais baixos obtidos em
426 plantas controle indica que a infecção da antracnose afetou o mecanismo de dissipação
427 da energia, desativando esta área para proteger contra o desafio do patógeno. Uma
428 observação semelhante foi feita por STAEL et al (2012); STAEL et al (2014) e CASTRO
429 et al., (2017).

430 Em plantas desafiadas com patógenos foliares, a taxa de transferência de elétrons
431 (ETR) do PSII pode ser inibida, devido aos danos no aparato fotossintético (LI et al.
432 2007). Entretanto, as mudas de açaizeiro inoculadas com PGPR tiveram aumento em ETR
433 sugerindo um efeito positivo na proteção dos fotossistemas contra os efeitos negativos da
434 mancha foliar causada pela antracnose. SAMANIEGO-GÁMEZ et al. (2016), relatam
435 que maiores ETR indicam que o receptor de quinona (Qa) é altamente oxidado e sua
436 energia de excitação é utilizada no transporte de elétrons, evitando danos fotooxidativos
437 principalmente de espécies reativas de oxigênio (ROS). Os aumentos de ETR foram
438 acompanhados por elevações do ϕ PSII nas mudas de açaizeiro tratadas com as PGPR.
439 Esse resultado sugere que a maior parte da energia luminosa absorvida pela molécula de
440 clorofilas associadas ao PSII foi utilizada na etapa fotoquímica. MAXWELL AND
441 JOHNSON (2000), relatam que maiores ϕ PSII influenciam no aumento de ETR e
442 contribuem para a manutenção do alto desempenho fotossintético.

443 Os resultados positivos da fluorescência da clorofila *a* induzidos pelas
444 rizobactérias (BRM32111, BRM32113, R-61 e R-92) sugere que as PGPR atuaram em
445 diversos mecanismos para suprimir área lesionada causada pelo *Colletotrichum* sp. para
446 manutenção dos parâmetros de trocas gasosas. No presente estudo, todas as rizobactérias
447 aumentaram taxa de assimilação líquida de CO₂ (*A*) em relação às plantas controle. O
448 aumento do valor de *A* pode ser atribuído ao maior grau de abertura dos estômatos (*g_s*), o
449 qual permite a maior entrada de CO₂ nas folhas e favorece o aumento da fotossíntese
450 líquida. Em plantas de arroz inoculadas com rizobactérias e desafiadas com
451 *Monographella albescens* foi observado aumento na taxa de assimilação líquida de CO₂,
452 o qual foi atribuído à influência positiva na abertura e fechamento dos estômatos
453 induzidas pela *P. fluorescens* e *B. pyrrocinia* (BUENO et al., 2017).

454 A maior taxa de transpiração induzida pelas PGPR pode ser atribuída, além da
455 abertura estomática, a maior área foliar. O aumento da perda de água em plantas tratadas

456 com PGPRs indica que além de atuarem como supressora da mancha foliar causada por
457 *Colletotrichum* sp. provavelmente promoveram a promoção do crescimento da parte
458 aérea, as rizobactérias possuem a capacidade de induzir a produção de hormônios de
459 crescimento como a giberelinas e citocininas que regulam a expansão foliar e síntese de
460 clorofilas (DODD et al. 2010; KANG et al. 2014).

461 A redução do C_i em plantas tratadas com as rizobactérias sugere que houve maior
462 atividade de carboxilação da rubisco e, conseqüentemente, maior assimilação de CO_2 para
463 a manutenção das altas taxa de fotossíntese líquida. Resultado semelhante foi obtido por
464 BUENO et al (2017), em plantas de arroz tratadas com a *P. fluorescens* e *B. pyrrocinia*
465 para supressão da escaldadura, onde o menor C_i associado aos incrementos de A ,
466 indicaram que atividade de carboxilação para fixação de CO_2 foi muito ativa.

467 As altas taxas de fixação do CO_2 pela rubisco requer um alto consumo de energia
468 química na forma de ATP e NADPH, o qual é gerado na etapa fotoquímica da fotossíntese
469 através da eficiência na captação, absorção e transferência de energia luminosa pelas
470 moléculas de clorofilas que compõem os fotossistemas (ZHANG et al. 2017). Essa
471 eficiência na conversão da energia luminosa em energia na química pelas clorofilas é
472 observável em plantas tratadas com as rizobactérias (BRM-32111, BRM-32113, R-61 e
473 R-92) que influenciaram positivamente no desempenho fotossintético da fluorescência da
474 clorofila a, principalmente na diminuição do F_o e o aumento das outras variáveis como
475 F_m , F_v/F_m , F_v/F_o , $\phi PSII$, ETR, qP , NPQ, $Y(NO)$ e $Y(II)$ em comparação as plantas
476 controle (MAXWELL AND JOHNSON 2000; BAKER 2008).

477

478 5.5 CONCLUSÕES

479 As rizobactérias reduzem a severidade da mancha de *Colletotrichum* sp. e
480 aumentam a eficiência fotossintética em mudas de açaizeiro.

481 Rizobactérias podem ser utilizadas no manejo da antracnose causada por
482 *Colletotrichum* sp.

483

484

485

486

487

488

489

490

491 **REFERÊNCIAS**

492

493 BAKER NR (2008) Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annu*
494 *Rev Plant Biol* 59:89–113. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092759

495 BARRIUSO, J.; SOLANO, B. R.; GUTIÉRREZ MAÑERO, F. J. Protection Against
496 Pathogen and Salt Stress by Four Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Isolated from
497 *Pinus* sp. on *Arabidopsis thaliana*. *Phytopathology*, v. 98, n. 6, p. 666–672, 2008.

498 BOVI MLA, SOAVE J, SUGIMORI MH, MORAES SA, RIBEIRO IA, PARADELA
499 FILHO O, CARDOSO M (1977) Occurrence of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz
500 (Von Arx.) on seedlings of different palm species (*Euterpe Edulis* Mart., *Euterpe Oleracea*
501 Mart. and *Euterpe Badiocarpa* Barb. Rodr.). *Summa Phytopathologica* 3:93-95.

502 BUENO, A.C.S.O et al. Response of photosynthesis and chlorophyll a fluorescence in leaf
503 scald-infected rice under influence of rhizobacteria and silicone fertilizer. *Plant*
504 *Pathology*, 2017

505 CASTRO, G. L. S. et al. Anthracnose in açai palm leaves reduces leaf gas exchange and
506 chlorophyll a fluorescence. *Tropical Plant Pathology*, v. 42, n. 1, p. 13–20, 2017.

507 CATTELAN AJ (1999) Métodos Qualitativos para Determinação de Características
508 Bioquímicas e Fisiológicas Associadas com Bactérias Promotoras do Crescimento
509 Vegetal. *Embrapa Soja* 139:36.

510 CONRATH, U. Molecular aspects of defence priming. *Trends in Plant Science*, v. 16, n.
511 10, p. 524–531, 2011.

512 CONRATH, U; BECKERS, GEROLD J.M.; LANGENBACH, CASPAR J.G. and
513 JASKIEWICZET, MICHAL R. Priming for Enhanced Defense. *Phytopathol.* 2015.
514 53:97–119.

515 DÖBEREINER J, DAY J (1976) Associative symbioses in tropical grasses:
516 characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: *Proceedings of the 1st*
517 *international symposium on nitrogen fixation*. Washington State University Press
518 Pullman, pp 518–538

519 DODD IC, ZINOVKINA NY, SAFRONOVA VI, BELIMOV AA (2010) Rhizobacterial
520 mediation of plant hormone status. *Ann Appl Biol* 157:361–379. doi: 10.1111/j.1744-542
521 7348.2010.00439.x

522 FERREIRA JB, NEVES YYB, NASCIMENTO GO, FIGUEIREDO ALV, VENTURIN
523 N (2012) Óleos essenciais no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal
524 da antracnose em palmáceas. *Enciclopédia Biosfera* 14:751–760

- 525 FILIPPI, M. C. C. et al. Leaf blast (*Magnaporthe oryzae*) suppression and growth
526 promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil. *Biological Control*, v. 58, n. 2, p.
527 160–166, 2011.
- 528 HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A large family of class
529 III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol.* 42:462-468, 2001.
- 530 HOLESKI, L. M. et al. Transgenerational defense induction and epigenetic inheritance in
531 plants. *TRENDS in Ecology & Evolution*, Cambridge, v.27, p. 618-626, 2012.
- 532 JONES, J. D; DANGL, J. L. The plant immune system. *Nature*, Londres, v. 444, p. 323-
533 9, 2006.
- 534 JHA, P.N.; GUPTA, G.; JHA, P.; MEHROTRA, R. Association of
535 Rhizospheric/Endophytic Bacteria with Plants: A Potential Gateway to Sustainable
536 Agriculture Greener. *Journal of Agricultural Sciences*, v. 3, n. 2, p. 73-84, 2013.
- 537 KADO CI, HESKETT MG (1970) Selective Media for Isolation of *Agrobacterium*,
538 *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60:969.
539 doi: 10.1094/Phyto-60-969
- 540 KANG SM, KHAN AL, YOU YH, et al (2014) Gibberellin production by newly isolated
541 strain *Leifsonia soli* SE134 and Its potential to promote plant growth. *J Microbiol*
542 *Biotechnol* 24:106–112. doi: 10.4014/jmb.1304.04015
- 543 KLUGHAMMER C, SCHREIBER U, 2008. Complementary PSII quantum yield
544 calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and
545 saturation pulse method. *PAM Application Notes* 1,27–35.
- 546 LEÃO, M.; BOVI, A.; JÚNIOR, G. G. HIBRIDOS interespecíficos de palmiteira
547 (*Euterpe oleraceae* x *Euterpe edulis*). *Bragantia*, v. 46, n. 2, p. 343–363, 1987.
- 548 LEHMANN, S.; SERRANO, M.; L'HARIDON, F.; TJAMOS, S.E., METRAUX J.P.
549 (2015). Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens.
550 *Phytochemistry*. v. 112, p 54–62.
- 551 LI W, ZHANG S, SHAN L (2007) Responsibility of non-stomatal limitations for the
552 reduction of photosynthesis-response of photosynthesis and antioxidant enzyme
553 characteristics in alfalfa (*Medicago sativa* L.) seedlings to water stress and rehydration.
554 *Front Agric China* 1:255–264. doi: 10.1007/s11703-007-0044-5
- 555 LUCAS JA, GARCÍA-CRISTOBAL J, BONILLA A, et al (2014) Beneficial
556 rhizobacteria from rice rhizosphere confers high protection against biotic and abiotic
557 stress inducing systemic resistance in rice seedlings. *Plant Physiol Biochem* 82:44–53.
558 doi: 10.1016/j.plaphy.2014.05.007

- 559 MALKE H (1991) Z. KLEMENT, K. RUDOLPH AND D. C. SANDS (Editors), Methods
560 in Phytobacteriology. XIV + 568 S., 135 Abb., 62 Tab. Budapest 1990. Akadémiai
561 Kaidó. Ft 1520.0 ISBN: 963-05-4955-7. J Basic Microbiol 31:148–148. doi:
562 10.1002/jobm.3620310214
- 563 MATHYS, J. et al. Genome-wide characterization of ISR induced in *Arabidopsis thaliana*
564 by *Trichoderma hamatum* T382 against *Botrytis cinerea* infection. *Frontiers in Plant*
565 *Science*, Lausanne, v. 3, p. 1-25. 2012.
- 566 MAUCH, F.; MAUCH-MANI, B.; GAILLE, C.; KULL, B.; HAAS, D.; REIMMANN,
567 C. Manipulation of salicylate content in *Arabidopsis thaliana* by the expression of an
568 engineered bacterial salicylate synthase. *The Plant Journal*, v.25: 67–77. 2001.
- 569 MAXWELL K, JOHNSON GN (2000) Chlorophyll fluorescence--a practical guide. *J*
570 *Exp Bot* 51:659–668. doi: 10.1093/jexbot/51.345.659
- 571 MEYER, S. SACCARDY, K. RIZZA, F. GENTY, B. 2001. Inhibition of photosynthesis
572 by *Colletotrichum lindemuthianum* in bean leaves determined by chlorophyll
573 fluorescence imaging. *Plant Cell Environ* 24: 947-955.
- 574 NASCENTE AS, DE FILIPPI MCC, LANNA AC, et al (2016) Biomass, gas exchange,
575 and nutrient contents in upland rice plants affected by application forms of microorganism
576 growth promoters. *Environ Sci Pollut Res* 24:2956–2965. doi: 10.1007/s11356-016-
577 8013-2
- 578 NAWROCKA, J.; MALOLEPSZA, U. Diversity in plant systemic resistance induced by
579 *Trichoderma*. *Biological Control*, Philadelphia, v.67, p.149-156, 2013.
- 580 NOGUEIRA SR, MACEDO PEFD, NETO RCA, GONÇALVES RC, LUNZ AMP
581 (2013) Antracnose em mudas de *Euterpe precatoria* no Acre. In:46º Congresso Brasileiro
582 de Fitopatologia, Resumos, Ouro Preto, MG, p 347.
- 583 OLIVEIRA MSP, CARVALHO JEU, NASCIMENTO WMO (2000) Açai (*Euterpe*
584 *oleracea* Mart.). Funep, Jaboticabal. SP, 49p
- 585 OLIVEIRA, M. D. S. P.; NETO, J. T. D. F. Cultivar BRS-Pará: Açazeiro para Produção
586 de Frutos em Terra Firme. *Embrapa, Comunicado Técnico*, v. 114, n. 1, p. 1–3, 2004.
- 587 OLIVEIRA LC, DE OLIVEIRA MDSP, DAVIDE LC, TORRES GA (2016) Karyotype
588 and genome size in *Euterpe* Mart. (*Arecaceae*) species. *Comp Cytogenet* 10:17–25. doi:
589 10.3897/CompCytogen.v10i1.5522
- 590 OXBOROUGH K, BAKER NR (1997) Resolving chlorophyll a fluorescence images of
591 photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components -
592 Calculation of qP and Fv'/Fm' without measuring Fo'. *Photosynth Res* 54:135–142. doi:
593 10.1023/A:1005936823310

- 594 PIETERSE, C. M. Hormonal modulation of plant immunity. Annual review of cell and
595 developmental biology, Palo Alto, v. 28, p. 428-521, 2012.
- 596 POLANCO, L.R., RODRIGUES, F.A., NASCIMENTO K.J.T., CRUZ, M.F.,
597 CURVELO, C.R., DAMATTA, F.M., and VALE, F.X. 2014. Photosynthesis gas
598 exchange and antioxidative system in common bean plants infected by *Colletotrichum*
599 *lindemuthianum* and supplied with silicon. Tropical Plant Pathology 39: 35-42.
- 600 RESENDE, R. S., RODRIGUES, F. A., CAVATTE, P. C., MARTINS, S. C. V.,
601 MOREIRA, W. R., CHAVES, A. R. M., and DAMATTA, F. M. 2012. Leaf gas exchange
602 and oxidative stress in sorghum plants supplied with silicon and infected by
603 *Colletotrichum sublineolum*. Phytopathology 102:892-898.
- 604 ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial Endophytes and Their
605 Interactions with Hosts. MPMI, v. 19, n. 8, p. 827-837, 2006.
- 606 SAMANIEGO-GÁMEZ BY, GARRUÑA R, TUN-SUÁREZ JM, et al (2016) *Bacillus*
607 spp. inoculation improves photosystem II efficiency and enhances photosynthesis in
608 pepper plants. Chil J Agric Res 76:409–416. doi: 10.4067/S0718-58392016000400003
- 609 SILVESTRE WV, PINHEIRO HA, SOUZA RODM, PALHETA LF (2016)
610 Morphological and physiological responses of açai seedlings subjected to different
611 watering regimes. Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambienta 20:364–371.
- 612 SHANER, G., FINNEY, R.E., 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression
613 of slow-mildewing resistance in knox wheat. Phytopathology 67:1051-1056.
- 614 SCHNEIDER, D.J.; COLLMER, A. Studying plant-pathogen interactions in the
615 genomics era: beyond molecular Koch's postulates to systems biology. Annual review of
616 phytopathology, Palo Alto, v. 48, p. 457-479, 2010.
- 617 SPOEL, S. H.; DONG, X. How do plants achieve immunity? Defence without specialized
618 immune cells. Natural review: Immunology, Londres, v. 12, p. 89-100, 2012.
- 619 STAEL, S., KMIĘCIK, P., WILLEMS, P., VAN DER KELEN, K., COLL, N.S., TEIGE,
620 M. and VAN BREUSEGEM, F. 2014. Plant innate immunity-sunny side up? Trends in
621 plant science.
- 622 STAEL, S., ROCHA, A.G., WIMBERGER, T., ANRATHER, D., VOTHKNECHT, U.C.
623 AND TEIGE, M. 2012. Cross-talk between calcium signalling and protein
624 phosphorylation at the thylakoid. Journal of experimental botany 63: 1725-1733.
- 625 SYLVESTER-BRADLEY R, ASAKAWA N, LA TS, et al (1982) Levantamento
626 quantitativo de 641 microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas
627 e leguminosas 642 forrageiras na Amazônia. Acta Amaz 12:15–22.
- 628 TAIZ, L. & ZEIGER, E. 2013. Fisiologia Vegetal. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed. 918p.

629 TEATHER RM, WOOD PJ (1982) Use of Congo red-polysaccharide interactions in 644
630 enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. 645 38
631 *Appl Environ Microbiol* 43:777–780. doi: 0099-2240/82/040777-04\$02.00/0

632 VAN LOON, L.C., PIETERSE, C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins
633 in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 35–62. 2006

634 VAN LOON LC (2007) Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur J*
635 *Plant Pathol* 119:243–254. doi: 10.1007/s10658-007-9165-1

636 ZHANG, S.; REDDY, M. S.; KLOEPPER, J. W. Tobacco growth enhancement and blue
637 mold disease protection by rhizobacteria: Relationship between plant growth promotion
638 and systemic disease protection by PGPR strain 90-166. *Plant and Soil*, v. 262, n. 1–2, p.
639 277–288, 2004.

640 ZHANG K, LIU Z, SHAN X, ET AL (2017) Physiological properties and chlorophyll
641 biosynthesis in a Pak-choi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis*) yellow leaf mutant, *pym*.
642 *Acta Physiol Plant* 39:22. doi: 10.1007/s11738-016-2321-5

643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663

664 CONCLUSÕES GERAIS

665 O crescimento acelerado das mudas de açazeiro inoculadas com rizobactérias
666 diminui o tempo para obter mudas de qualidade em viveiros, aumenta a tolerância ao
667 déficit hídrico e antracnose e, contribui para reduzir o uso excessivo de fertilizantes e
668 fungicidas.

669 Rizobactérias podem compor um bioproduto para ser inserido no manejo
670 sustentável da produção de mudas de açazeiro em viveiros.

671 Rizobactérias podem diminuir a mortalidade das mudas de açazeiro em viveiros
672 e contribuir para a expansão dos plantios comerciais em terra firme.

673