



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
DOUTORADO EM AGRONOMIA

Aline Figueiredo Cardoso

Eficiência de *Bacillus cereus* na promoção de crescimento e proteção do aparato fotossintético à infecção por *Pestalotiopsis* sp. em mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil

BELÉM
2021

Aline Figueiredo Cardoso

Eficiência de *Bacillus cereus* na promoção de crescimento e proteção do aparato fotossintético à infecção de *Pestalotiopsis* sp. em mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Rural da Amazônia, como requisito para obtenção do título de Doutora em Agronomia.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Gisele Barata da Silva

BELÉM
2021

-
- C268e Cardoso, Aline Figueiredo
Eficiência de *Bacillus cereus* na promoção de crescimento e proteção do aparato fotossintético à infecção por *Pestalotiopsis* sp. em mudas de coqueiro anão-do-brasil / Aline Figueiredo Cardoso. - 2021.
100 f. : il. color.
- Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGA), Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural Da Amazônia, Belém, 2021.
Orientador: Profa. Dra. Gisele Barata da Silva
1. Biopromotores. 2. Promoção de crescimento. 3. Rizobactérias . 4. Mudas de coqueiro. 5. Controle biológico. I. da Silva, Gisele Barata, *orient.* II. Título

CDD 630.275

Aline Figueiredo Cardoso

Eficiência de *Bacillus cereus* na promoção de crescimento e proteção do aparato fotossintético à infecção de *Pestalotiopsis* sp. em mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Rural da Amazônia, como requisito para obtenção do título de Doutora em Agronomia.

Data da aprovação

05/03/2021

Banca examinadora

Prof^a Dr^a Gisele Barata da Silva-Presidente
Universidade Federal Rural da Amazônia-UFRA

Dr^o. Adriano Stephan Nascente- 1^o examinador
Embrapa arroz e feijão

Dr^a. Denise Castro lustrosa-2^o examinador
Universidade Federal do Oeste do Pará-UFOPA

Dr^o. Paulo Manoel Pontes Lins-3^o examinador
Superintendente Sococo LTDA

Dr^o. Marcos Antônio Souza dos Santos- 4^o examinador
Universidade Federal Rural da Amazônia-UFRA

Dedico!

Aos meus pais, Pedro Conceição de Lima Cardoso (*in memoriam*) e Maria Figueiredo Cardoso, pelos incentivos, apoio e amor. Eu serei eternamente grata por tudo! Carrego na alma o orgulho em ser filha de vocês.

Ao meu avô Arthur Garcia Cardoso (*in memoriam*), meu velho, pela presença, amor, ajuda, por ter sido um pai!

Agradecimentos

À Deus, pela saúde e força para trilhar meu caminho;

À Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA, onde realizei os maiores sonhos da minha vida;

Fundação Amazônica de Amparo a Estudos e Pesquisas do Estado do Pará (Fapespa), pela concessão das bolsas de estudos e financiamento das pesquisas;

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela oportunidade e acolhimento de todos os profissionais;

À minha orientadora, Prof.^a Gisele Barata da Silva, pela orientação, ensinamentos e conhecimentos repassados. Pelo carinho e amizade ao longo desses dez anos, por ter sido grande influenciadora em minha vida acadêmica, total respeito, gratidão e admiração;

A minha família, por sempre ser meu local de descanso, de amor e paz. A minha irmã Alessandra Cardoso, pela infância de “guerra” e das melhores lembranças, e obrigada, por ter apresentado os amores da vida da tia Isabella Cardoso e Gabriella Cardoso, a tia ama, cuida e ainda dá muito cheiro;

Ao meu esposo e meu melhor amigo, Daniel Costa, obrigada por tudo! Eu jamais conseguirei agradecer por todo apoio ao longo de minha vida acadêmica e familiar, deixo registrado a gratidão nos momentos mais difíceis, obrigada por ser amigo do meu Pai, minha família vai ser eternamente grata. Aos seus pais e irmãos meu respeito e carinho.

Agradeço, meus familiares que são presentes, em especial minha tia Rose Figueiredo, por ser uma irmã e uma tia tão especial. A senhora por muitas vezes dividiu minhas obrigações familiares, cuidou de minha mãe e sobrinhas. Gratidão tia!

À banca examinadora de defesa Dr. Adriano Stephan Nascente, Dra. Denise Castro Lustosa, Dr. Paulo Manoel Pontes Lins, Dr. Marcos Antônio Souza dos Santos, agradeço pela disponibilidade e contribuições;

A empresa Sococo, em nome do Dr. Paulo Lins, por toda disponibilidade e ajuda, ao longos desses anos de trabalho;

Agradeço aos funcionários da empresa Sococo, em especial do viverio e do laboratório de fitossanidade. Ao senhor Reinaldo Souza, minha total admiração e respeito;

Aos colegas do Laboratório de Proteção de Plantas, que de alguma forma ajudaram obrigada;

Aos professores Gledson Castro, Dalton Dias e Alessandra Moares, meu muito obrigada;

Aos colegas do PGAGRO, Deborah Pires, Gabriella Tavares, Wagner Lopes, Ítalo Sampaio, Thamires Maués, Júnior Melo e Neila Sardinha, obrigada por todo apoio de vocês.

Gratidão à equipe coqueiro, Cássia Pinheiro, Waldiney Xavier, Fernanda Louzano, Jennyfer Campos, Tássia Almeida, Luma Santana e Augusto Carmona, por toda ajuda e respeito. Vocês serão sempre lembrados e estarei na torcida pelo sucesso de cada um, vocês são únicos do jeito de vocês.

Resumo

O coqueiro anão-verde (*Cocos nucifera* L.) é uma palmeira de elevada importância econômica e com cadeia produtiva destinada à produção de água de coco. Existem fatores que limitam a obtenção de mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil, destacam-se os custos e a e problemas fitossanitário, como doenças foliares. A utilização de microrganismos benéficos na agricultura, está em promover benefícios as plantas aumentando em qualidade, vigorosidade e sua proteção quanto a patógenos. Além de permitir viabilizar uma agricultura sustentável. O objetivo deste trabalho foi obter bioestimulantes combinado a baixa dose de fertilizante químico (FQ) recomendado, capaz de promover o crescimento e mitigar a queima foliar, desvendar os mecanismos fisiológicos associados e a agroeficiência econômica da inserção da tecnologia no sistema de produção de mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil. O experimento foi realizado em viveiro comercial em Santa Isabel-PA e em casa de vegetação da Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém-PA. Foram coletadas amostras de solo e realizado diluição seriada onde foi obtido 96 isolados distintos de rizobactérias. Foi realizado experimento em casa de vegetação com plantas modelo (*Oryza sativa* L.), o delineamento experimental foi inteiramente caualizado (DIC) com 97 tratamentos (96 rizobactérias e tratamento controle com água), com três repetições cada. Foram avaliados comprimento aéreo, comprimento radicular e biomassa total. Em viveiro o melhor isolado selecionado em planta modelo, foi testado como promotor de crescimento em mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil, o delineamento experimental foi em DIC com dois tratamentos: controle com 100% de FQ e R40 com 50% de FQ. O isolado R40 foi testado *in vitro* para solubilização de fosfato, produção de sideroforos e ácido indolacético (AIA), nas mudas foi avaliado biometria, trocas gasosas, concentração hormonal e conteúdo nutricional, as médias foram comparadas pelo teste *t* a 5% de probabilidade. Em viveiro foram coletadas amostras de folhas com sintomas de queima foliar, seguidas levadas para laboratório para análise e isolamento de fungos associados. Foi obtido isolado de *Pestalotiopsis* sp. em casa de vegetação o teste de patogenicidade em dois tratamentos: Controle com água e Plantas pulverizas com *Pestalotiopsis* sp. (10^3 conídios mL⁻¹), com três repetições. foi realizado em mudas com três meses de idade e tratamentos aplicados na primeira folha totalmente expandida, foi aplicado suspensão e mantida sobre câmara úmida. Foi avaliada a presença de sintomas nas folhas testadas durante sete dias após início do experimento, seguida de coleta e reisolamento. Para elaboração de escala diagramática foram coletadas 100 folhas de mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil, aleatoriamente, digitalizadas e obtidos valores de severidade real da doença (%), para construir uma proposta de escala. Os avaliadores selecionados não apresentavam experiência com a doença, a eles foi projetada imagem das folhas de coqueiro, ao qual foram avaliadas sem e com o auxílio da proposta de escala. A partir dos resultados foi realizada análise de regressão linear, relacionando a severidade real e a severidade estimada. Em viveiro, foi realizado ensaio para avaliar o efeito do uso de R40 sobre mudas com sintomas de queima foliar causada por *Pestalotiopsis* sp. Foram dois tramantos: controle com 100% de FQ e R40 com 50% de FQ e cinco repetições. Foram avaliadas a severidade, área foliar, trocas gasosas e fluorescência da clorofila a, mensalmente durante seis meses. Além, de teor e conteúdo de clorofilas ao final dos seis meses de idade, as médias foram comparadas pelo teste *t* a 5% de probabilidade. Para a avaliação dos custos associados ao uso de *B. cereus* em mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil, foi realizado experimento com dois tratamentos: controle com 100% de FQ e R40 com 50% de FQ e cinco repetições. Foram avaliados mensalmente ao longo de seis meses: Altura, diâmetro do coleto e massa seca, as médias foram comparadas pelo teste *t* a 5% de probabilidade. Foram elaboradas tabelas que discriminaram custo operacional efetivo (COE) e o custo operacional total (COT),

comparando o tratamento com *B. cereus* com tempo de viveiro de seis meses de idade com a produção de mudas convencional de oitos meses. Os resultados destes estudo mostraram que o isolado R40 identificado como *B. cereus* (UFRABC40) foi solubilizador de fosfato, produtor de sideróforos e de ácido indolacético (AIA) *in vitro*. Mudas bioestimuladas com *B. cereus* e combinadas a 50% de FQ, foram superiores em biometria, trocas gasosas, concentração hormonal e conteúdo nutricional comparadas a mudas controle com 100% de FQ. As plantas do tratamento com pulverização de *Pestalotiopsis* sp. apresentaram sintomas semelhantes as amostras coletadas em viveiros. O reisolamento identificou o fungo do gênero *Pestalotiopsis* sp. como causador de queima foliar em mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil. A escala diagramática proposta garantiu a partir dos valores de coeficiente de determinação, maior precisão a 100% dos avaliadores. As mudas do tratamento com *B. cereus*, promoveram a partir do terceiro mês de idade redução da severidade de queima foliar em mudas de coqueiro combinado a maior assimilação de CO₂, condutância estomática, transpiração e relação eficiência de carboxilação ocorreu também a redução da concentração intercelular de carbono. Além, de ter proporcionado alterações positivas dos fotosistemas avaliados a partir da fluorescência da clorofila *a*. Nestas mudas também houve maior teor e conteúdo de clorofilas comparado a plantas controle. No ensaio de eficiência econômica, as mudas bioestimuladas possuíram maior incremento biométrico comparado a mudas do tratamento controle, e promoveram redução do custo operacional total e redução do valor unitário da muda em 11%. *Bacillus cereus* combinada a redução da FQ promove o crescimento de mudas de coqueiro e reduz a incidência de manchas foliares provocadas por *Pestalotiopsis* sp., a tecnologia microbiana aplicada em mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil no estado do Pará aumenta a eficiência econômica do manejo

Abstract

The green-dwarf coconut tree (*Cocos nucifera* L.) is a palm tree of high economic importance and a productive chain intended to the coconut water production. There are factors which limits the obtaining of green dwarf coconut seedlings, highlighting the costs and phytosanitary problems, as leaf diseases. Using beneficial microorganisms in the agriculture, it is in promoting benefits to the plants increasing in quality, vigor and its protection from pathogens. In addition to allow and enable a sustainable agriculture. The objective of this work was to obtain biostimulants associated with low doses of the recommended chemical fertilizer (FQ), being able to promote growth and mitigate the leaf burning, unveil the associated physiological mechanisms and the economic agro-efficiency of the technology insertion in the brazil dwarf coconut tree seedling production system. The experiment was performed in commercial nursery in Santa Isabel-PA and in a greenhouse of Feral Rural University of Amazon, Belém-PA. Soil samples were collected and made a serial dilution which were obtained 96 distinct isolates of rhizobacteria. The greenhouse experimente was performed with model plant (*Oryza sativa* L.), the experimental design used was entirely random (DIC) with 97 treatment (96 rhizobacteria and control treatment with water), with three repetitions each. Aerial and radicular length and total biomass were evaluated. In nursery, the best isolated selected in model plant, was tested as growth promoter in brazil green dwarf coconut tree seedlings, the experimental design was in DIC with two control treatments with 100% of FQ and R40 with 50% of FQ. The R40 isolated was tested *in vitro* for phosphate solubilization, siderophore and indolacetic acid (AIA) production, in the seedlings were evaluated the biometrics, gas exchanges, hormonal concentration and nutritional content, the averages were compared by t test at 5% of probability. In nursery were collected leaf samples with leaf burning symptoms, and taken to the laboratory for analysis and isolation of associated fungi. A *Pestalotiopsis* sp. isolate was obtained in greenhouse. The pathogenicity test in two treatments: Control with water and *Pestalotiopsis* sp. (10^3 conidia mL⁻¹) sprayed plants, with three repetitions, were performed in three-months-old seedlings and treatments applied in the first leaf totally expanded, were applied suspension and kept under humid chamber. The presence of symptoms in the tested leaves were evaluated during seven days after the start of the experiment, followed by the collect and a second isolation. To the diagrammatic scale elaboration were collected 100 leafs of brazil green dwarf coconut tree seedlings, randomly, digitalized and obtaining real disease severity values (%), to build an scale proposal. The selected evaluators did not showed experience with the disease, coconut leaf images were projected to them, which were evaluated without and with the scale proposal help. From the results was made a linear regression analysis, relating the real severity and estimated severity. In nursery, was made a trial to evaluate the effect of R40 use on seedlings with leaf burning symptoms caused by *Pestalotiopsis* sp. Two treatments were used: control with 100% of FQ and R40 with 50% of FQ and five repetitions. The severity, leaf area, gas exchange and A chlorophyll fluorescence were evaluated monthly for six months. In addition, the chlorophyll content and percentage at the end of six months of age, the averages were compared by t test at 5% probability. To the evaluation of associated cost to *B. cereus* use in brazil green dwarf coconut tree seedlings, was performed an experiment with two treatments: control with 100% of FQ and R40 with 50% of FQ and five repetitions. Monthly, were evaluated during six months: Height, stem diameter and dry mass, the averages were compared by t test at 5% of probability. Tables with discriminated effective operational costs (COE) and total operational costs (COT) were elaborated, comparing the treatment with *B. cereus* with six-months-old nursery time with the conventional eight

months seedling production. The results of this study showed that R40 isolate identified as *B. cereus* (UFRABC40), was phosphate solubilizer, siderophores and indolacetic acid (AIA) *in vitro* producer. *B. cereus* biostimulated seedlings combined to 50% of FQ, were superior in biometrics, gas exchange, hormonal concentration and nutritional content compared to the control seedling with 100% of FQ. Plants of the treatment with *Pestalotiopsis* sp. pulverization presented similar symptoms to the samples collected in nursery. The second isolation identified the fungi of *Pestalotiopsis* sp. genus as the leaf burning cause in Brazil green dwarf coconut tree seedlings. The proposed diagrammatic scale guaranteed, from the determination coefficient values, greater precision to 100% of the evaluators. Seedlings of the *B. cereus* treatment, promoted, from the third month old, reduction of leaf burning severity in coconut tree seedlings combined to greater CO₂ assimilations, stomatal conductance, transpiration and carboxylation efficiency relation also occurred the reduction of carbon intercellular concentration. In addition, it has provided positive changes in the photosystems evaluated from the *a* chlorophyll fluorescence. On these seedlings also had the greater percentage and chlorophyll content compared to control plants. In the economic efficiency trial, the biostimulated seedlings had greater biometric increment compared to the control treatment seedlings, and promoted reduction in the total operational cost and an 11% reduction in the seedling unitary value. *Bacillus cereus* combined with FQ reduction promotes coconut tree growth and reduces the incidence of leaf spots caused by *Pestalotiopsis*, the microbial technology applied in Brazil green dwarf coconut tree seedlings in the state of Pará increases the economic efficiency of the management.

Lista de figuras

Capítulo 1

Figure 1 R40 isolate in vitro biochemical tests. (A) R40 isolate colony in Petri plate, (B) phosphate solubilization detection, (C) siderophore production, and (D) indole acetic acid (IAA) production.....41

Figure 3 Green dwarf coconut seedlings from Brazil. (A) Control coconut seedlings with 100% chemical fertilization and (B) coconut seedlings inoculated with *Bacillus cereus* and 50% chemical fertilization.....42

Figure 4 Biometrics of green dwarf coconut seedlings from Brazil (uninoculated and inoculated with *B. cereus*) (A) Height, (B) stem diameter, (C) shoot dry matter, (D) root dry matter, (E) total dry matter (E), and (F) leaf area in plants with 100% chemical fertilization (control) and plants inoculated with *Bacillus cereus* with 50% chemical fertilization. The same letters indicate no significant difference (t-test, $p < 0.05$).....43

Figure 5 Leaf gas exchange in green dwarf coconut seedlings. (A) The net assimilation of CO₂ (A), (B) stomatal conductance to water vapor (gs), (C) transpiration (E), and instantaneous carboxylation efficiency (A/Ci) in plants with 100% chemical fertilization (control) and plants inoculated with *Bacillus cereus* with 50% chemical fertilization. The same letters indicate no significant difference (t-test, $p < 0.05$).....44

Figure 6 Phytohormone quantification in coconut seedlings. (A) Indoleacetic acid (IAA), (B) gibberellic acid GA₃, and (C) gibberellic acid GA₄ in plants with 100% chemical fertilization (control) and plants inoculated with *Bacillus cereus* with 50% chemical fertilization (T₂). The same letters indicate no significant difference (t-test, $p < 0.05$)....45

Supplementary material

Figure 2: Phylogenetic trees analysis of R40 (UFRABC40). Major *Bacillus cereus* clades and groups are indicated comparing the selected strain with the reference strains.....51

Capítulo 2

Fig 1. Infecção natural de *Pestalotiopsis* sp. (A), infecção após teste de patogenicidade (B) 72 horas inoculação, infecção após teste de patogenicidade (C) 120 horas inoculação, infecção após teste de patogenicidade (D) 168 horas inoculação, Colônia em meio BDA-frente (E); Colônia em meio BDA-verso (F) e Conídios maduros de *Pestalotiopsis* sp. (barra = 21 μm) (G).....55

Capítulo 3

Figure 1. Diagrammatic scale for spot on leaves of coconut palm seedlings caused by *Pestalotiopsis* sp. according to the Assess 2.0 program, Santa Isabel – PA.....59

Figure 2. Estimated severity of leaf spots caused by *Pestalotiopsis* sp. in coconut palm seedlings by 10 inexperienced evaluators without and as a help of the scale and regression equations obtained between the real severity (red full points) and the estimated severity (blue full points).....62

Figure 3. Absolute errors (estimated severity minus actual severity) for 10 raters without and with the aid of leaf spot scale caused by *Pestalotiopsis* sp. in coconut palm seedlings.....63

Capítulo 4

Figura 1. Severidade da queima das folhas ocasionada por *Pestalotiopsis* sp. Plantas controle e plantas inoculadas com *B. cereus*, ao longo de seis meses. A médias por tratamento comparadas mensalmente seguidos por um asterisco (*) foram significativas comparadas pelo teste t ($p < 0,05$). As barras representam os desvios padrão das médias.....80

Figura 2. Área foliar e Trocas gasosas de mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil. Área foliar (A), Taxa líquida de assimilação de CO₂ (A)(B), condutância estomática ao vapor de água (gs)(C), taxa de transpiração (E)(D), concentração de CO₂ intercelular (Ci)(E) e eficiência de carboxilação (A/Ci), obtidas de amostras de folha de plantas controle e de plantas inoculadas com *B. cereus*, ao longo de seis meses de idade. Letras iguais não diferem entre si quando comparadas pelo teste t ($p < 0,05$). As barras representam os desvios padrão das médias.....81

Figura 3. Fluorescência da clorofila a. máxima razão de eficiência fotoquímica (Fv / Fm)(A), eficiência fotoquímica efetiva do PSII (Fv'/Fm')(B), coeficiente de extinção fotoquímico (qp)(C), taxa de transferência de elétrons (ETR)(D), rendimento quântico de dissipação de energia regulada [Y (NPQ)](E) obtidas de amostras de folha de plantas controle e de plantas inoculadas com *B. cereus*, ao longo de seis meses de idade. As médias por tratamento comparadas mensalmente seguidos por um asterisco (*) foram significativas comparadas pelo teste t ($p < 0,05$). As barras representam os desvios padrão das médias.....82

Figura 4. Concentração de clorofilas e SPAD em mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil. Concentração de clorofila a (A) clorofila b, clorofilas totais (C) e SPAD(D), obtidas de amostras de folha de plantas controle e de plantas inoculadas com *B. cereus*, aos seis meses de idade. Letras iguais não diferem entre si quando comparadas pelo teste t ($p < 0,05$). As barras representam os desvios padrão das médias.....83

Lista de tabelas

Capítulo 1

Table 3 Nutritional content in the shoots of green dwarf coconut seedlings from Brazil.....46

Table 4 Nutrient use efficiency (NUE) of green dwarf coconut seedlings from Brazil.....47

Supplementary material

Table 1 Selection of growth-promoting rhizobacteria in rice, isolated from the rhizosphere of commercially grown green dwarf coconut trees from Santa Isabel, PA, Brazil.....48

Table 2: Identification of access and phylogenetic trees obtained by comparing the selected strain (R40) with the reference strains.....50

Capítulo 3

Table 1. Intercept (a), angular coefficient (b) and coefficient of determination (R^2) of the linear regressions between the severity obtained between the actual and the proposed estimated severity of the different evaluators without the aid of scale and the aid of scale.....60

Capítulo 5

Tabela 1. Bioindicadores de crescimento de mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil. Parâmetros biométricos de mudas de coqueiro controle e de mudas inoculadas com *B. cereus*.....95

Tabela 2. Estimativa do custo operacional e percentagem de cada custo obtido a produção de 1 hectare de viveiro correspondendo a 11.500 mudas para o ciclo de oito meses de idade, sem inoculação de *B. cereus*, junho de 2019.....96

Tabela 3. Estimativa do custo operacional e percentagem de cada custo obtido a produção de 1 hectare de viveiro correspondendo a 11.500 mudas para o ciclo de seis meses de idade e inoculadas com *Bacillus cereus* junho de 2019.....98

Tabela 4. Estimativa do custo operacional para produção de mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil, sem inoculação e com inoculação de *B. cereus* em um hectare de viveiro, junho de 2019.....99

Sumário

Resumo.....	7
Abstract.....	9
1 Contextualização.....	15
2 Capítulo 1:	
<i>Bacillus cereus</i> improves performance of Brazilian green dwarf coconut palms with reduced chemical fertilization.....	24
3 Capítulo 2: Ocorrência de queima foliar em mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil na região Amazônica.....	51
4 Capítulo 3: Validation of diagrammatic scale for leaf sopt caused by <i>Pestalotiopsis</i> sp. in coconut seedlings.....	55
5 Capítulo 4: <i>Bacillus cereus</i> protege o aparato fotossintético e reduz a severidade da queima foliar (<i>Pestalotiopsis</i> sp.) em mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil.....	65
6 Capítulo 5: Eficiência econômica e desenvolvimento de mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil bioestimuladas com <i>Bacillus cereus</i>	83
Conclusão geral.....	99

1 Contextualização

O coqueiro é uma planta de distribuição mundial, cultivada em mais de noventa países, principalmente em regiões tropicais. Sua origem está associada ao sudeste da Ásia (Perera; Baudouin; Mackay, 2016). A produção mundial de coco, estimada para 63,6 milhões de toneladas em 2020, continua bastante concentrada em três países, Indonésia (30,1%), Filipinas (24,7%) e Índia (19%). O Brasil é o quinto maior produtor, com a participação de 4,5% do total mundial (IBGE, 2020). O setor contribui também para geração de empregos no comércio, transporte, indústria, insumos, e embalagens (Cuenca, 1997). Os frutos em geral são consumidos *in natura* ou destinados a indústria, resultando em 100 produtos e subprodutos, dentre os quais: óleo de coco, ácido láurico, leite de coco, farinha, água de coco, substrato orgânico, fibra e ração animal (Cuenca, 1997; Siqueira; Aragão; Tupinanbá, 2002; BatugaL; Bourdeix; Baudouin, 2009; Cintra, 2009).

O gênero *Cocos* pertence à classe Equisetopsida, (Monocotyledonae (Liliaceae), ordem Arecales e família Areaceae, constituída apenas pela espécie *Cocos nucifera* L., que é composta das variedades: *Typica* (var. Gigante) e *Nana* (var. Anã) (Neto et al., 2007). Comparada a variedade gigante, a variedade anão-verde inicia a produção em média com dois a três anos após o plantio. Chega a atingir 10 a 12 m de altura e tem vida útil em torno de 30 a 40 anos. Apresenta estipe delgado, folhas numerosas, porém curtas, produz um grande número de pequenos frutos (150 a 200 frutos/planta/ano), é mais sensível ao ataque de pragas, como ácaro, e doenças foliares. Em geral apresenta maiores exigências de clima e solo do que a variedade Gigante (Benassi; De Santana; Fanton, 2014).

O fruto é uma drupa e possui epicarpo (camada mais externa, fina e lisa), mesocarpo (casca fibrosa), endocarpo (camada dura) e o endosperma (camada carnosa onde forma a água de coco). O desenvolvimento do coqueiro é influenciado pelas condições ambientais. Para o cultivo são necessários precipitações acima de 1.500 mm bem distribuídas, e insolação em torno de 2.000 horas são consideradas ideais. (Fontes; Pereira; Siqueira, 2002).

A obtenção de mudas inicia-se em germinadouro; nesta etapa as sementes consideradas para repicagem são as que germinam até 120 dias, sem sinais de deformação, com cerca de 15 cm de altura, livre de doenças e com coloração uniforme

(Fontes; Leal, 1998; Fontes; Pereira; Siqueira, 2002). Após os 120 dias em caixa germinadora, as plântulas são transferidas diretamente ao solo ou repicadas para saco de polietileno, contendo substrato. O ciclo de produção da muda em viveiro pode ocorrer de oito a 12 meses de idade após a saída do germinadouro, apresentando cerca de oito folhas bem desenvolvidas e saudáveis (Fontes; Pereira; Siqueira, 2002). Os principais tratamentos culturais neste período em viveiro, são o controle fitossanitário e a fertilização química, descrita por Lins e Viegas (2008) para cultivos no estado do Pará. A obtenção de mudas vigorosas de alta qualidade, são indispensáveis para o plantio. Entretanto, existem fatores que limitam a obtenção de mudas de alto padrão, dentre estes, estão a baixa taxa de germinação o aproveitamento, custo e problemas fitossanitários (Fontes; Leal, 1998; Modesto; Fenille, 2003).

A ocorrência de manchas foliares causada pelo gênero *Pestalotiopsis* já foi descrita em outras culturas como, morango, mirtilo, helicônia (Serra; Coelho, 2007; Luan et al., 2008; Morales-Mora et al., 2019), em palmeira foi descrito em palma de óleo (Suwannarach; Sujarit; Kumla, 2013) e em coqueiro (Niu et al., 2015).

No Brasil, Cardoso et al. (2003), registrou *Pestalotiopsis* causando mancha foliar em plantas adultas e mudas de coqueiro gigante. As lesões são descritas como arredondadas, elípticas de bordas definidas e escuras, que ao expandirem na folha tornam-se pardas avermelhadas e posteriormente, secamento das áreas. Os fungos do gênero *Pestalotiopsis* sp. podem ser encontrados em solos, ramos, sementes, frutos e folhas e, classificados como parasitas endofíticos (Jeewon; Liew; Hyde, 2004). Possui como característica a presença de conídios com cinco células, sendo três células medianas de coloração escura e duas células (apical e basal) hialinas (Jeewon; Liew; Hyde, 2002). Possuem apêndices simples ou ramificados que saem da célula apical e um apêndice simples da célula basal. (Karakaya, 2001).

A incidência de doenças foliares, são responsáveis pela redução no crescimento das plantas, Cardoso et al. (2019), mostraram que mudas de coqueiro podem ser afetadas em pelo menos 60% da área foliar. A infecção pode ocorrer por vias naturais das plantas como os estômatos (Zeng et al., 2010), o que afeta diretamente na fixação de luz reduzindo a atividade nos fotossistemas. A fotossíntese tem papel importante na defesa das plantas, pois os produtos das reações da fotossíntese, como ATP, NADPH, e carboidratos são fundamentais para síntese de metabólitos primários, como aminoácidos, polímeros de reforço da parede celular, como a lignina, e de fitormônios como o ácido

jasmônico (JA), que são responsáveis pela sinalização por expressão gênica na defesa contra patógenos, principalmente de fungos necrotróficos (Lu; Yao, 2018).

Não há registro de produtos químicos para o controle de manchas causadas por *Pestalotiopsis* sp. em mudas de coqueiro. O que justifica a busca por diferentes métodos que possam auxiliar no manejo da doença. Para os estudos de severidade de doenças foliares uma das ferramentas propostas é o uso de escala diagramática, que consiste em representações ilustradas de partes da planta com sintomas em diferentes níveis de severidade (Bergamin Filho; Amorim, 1996). A quantificação de doenças possui grande importância para a avaliação da eficiência de medidas de controle (Capucho et al., 2010). (Vale; Jesus; Zambolim et al., 2004). Ações integradas que possam proporcionar obtenção de mudas de qualidade são importantes, assim o uso de microrganismos na agricultura surge como estratégia a produção agrícola sustentável (Pereg; Mcmillan, 2015).

A rizosfera, região do solo em torno das raízes das plantas, é considerada uma área muito importante e sensível à qualidade microbiológica (Lugtenberg; Kamilova, 2009), e são encontradas diferentes cepas de microrganismos que podem atuar como promotores de crescimento em plantas de forma direta com alterações fisiológicas, bioquímicas, moleculares e morfo-anatômicas, ou indireta com indução de resistência a estresse biótico e abiótico (Jain et al., 2013; Bach et al., 2016).

O uso de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas pode ter efeito positivo no crescimento e produção agrícola, através da colonização das raízes (Haldar; Sengupta, 2015), estímulo a produção de hormônios vegetais, como ácido indol-3-acético (IAA) e Giberelinas, que alteram a arquitetura da planta (Cassán, 2001; Rademacher, 2009; De Rybel et al., 2010; Saravanakumar et al., 2011), favorecendo a maior absorção de água e nutrientes. Rizobactérias têm a habilidade de proporcionar maior e melhor uso de nutrientes, produzir siderofóros e de solubilizar fosfato (Krishnaraj; Dahale, 2014; Segond et al., 2014).

Os principais efeitos de ação de microrganismos podem ser observados em crescimento de plantas de milho inoculadas com *Pseudomonas putid*, que além da alterou a germinação, aumentou área foliar, altura e biomassa em 58,8%, 108,4%, e 59,2%, respectivamente (Amogou et al., 2018). Estes incrementos, também podem ser efeito direto em alterações fisiológicas promovidas por rizobactérias, a inoculação de *B. cereus* aumentou as atividades de clorofila, prolina e enzimas antioxidantes, indicando o

papel positivo de PGPR na osmorregulação, condutância estomática e fotossíntese (Hayat et al., 2012; Fan et al., 2012; Sharma et al., 2012).

Rizobactérias têm papel importante na ativação de respostas de defesa, no confronto com patógenos. Podem atuar na pré-ativação de mecanismos de defesa, através do efeito priming (Conrath et al., 2002), e desencadear uma cascata de reação, dentre as quais, formações de estruturas físicas como calose sobre o local próximo ao ataque do patógeno, produção de antibiótico e enzimas que degradam a parede celular do patógeno (Figaj et al., 2019). Em tomate a inoculação de *B. cereus*, promoveu aumento da biomassa média do tomate em 47,7%, e inibiu a proliferação do patógeno em aproximadamente 15 vezes. Os autores sugerem que *B. cereus* induziu indução sistêmica (ISR), em função do o acúmulo de genes relacionados à defesa (PR1 e PIN2) (Niu et al., 2012).

A necessidade de manejo agrícola sustentável, coloca os bioestimulantes como agentes de mudanças; eles compreendem substâncias, enzimas e microrganismos (Calvo et al. 2014) e, estão associados ao maior desenvolvimento, produtividade e melhor uso de nutrientes, em função de alterações, hormonal e na otimização assimilação, translocação e uso dos nutrientes, promovidos a plantas (Ávila et al., 2008; Braccini et al., 2012; European Biostimulants Industry Council, 2016).

A redução na fertilização química promovida com uso de bioestimulante é descrita em outros estudos e relacionada ao melhor uso de nutrientes, em plantas de tomate a combinação de rizobactérias e fungos micorrízicos arbusculares resultou em redução de 30% de fertilização química e aumento do rendimento (Adesemoye; Torbert; Kloepper, 2009), em palma de óleo o formulado a base de *Bacillus amyloliquefaciens* combinado a 50% da fertilização, aumentou a atividade hormonal e o crescimento de mudas (Lima et al., 2020). A redução de fertilização química reflete diretamente em redução de custo direto e indiretamente, como na redução de uso de mão de obra e de uso de equipamentos. A formulação de bioestimulante a base de microrganismos, deve ter seu benefício associado ao estudo do custo e viabilidade econômica. Buscando assim, avaliar a real eficiência, levando-se em consideração toda a cadeia produtiva, seus resultados e o custo associado com a introdução do bioestimulante (Crepaldi, 1998). O uso de bioestimulante a base de rizobactérias, agrega aumento da qualidade de plantas e produtividade em outras culturas, e podem favorecer a redução de adubação química.

Referências

- Ahmad, A. Role of proline under changing environments. *Plant Signal Behav.*, 7: 1456-1466. 2012.
- Amogou, O.; Dagbénonbakin, G.; Agbodjato, N. A.; Noumavo, P. A.; Salami, H. A.; Valère, S.; Baba-Moussa, L. (2018). Influence of Isolated PGPR Rhizobacteria in Central and Northern.
- Ávila, M.R.; Braccini, A.L.; Scapim, C.A.; Albrecht, L.P.; Tonin, T.A.; Stülp, M. (2008). Bioregulator application, agronomic efficiency, and quality of soybean seeds. *Scientia Agricola*, v.65, n.6, p.567-691.
- Bach, V. R. (2016). Efeito da adição de Mg como promotor em catalisadores Ni/Al₂O₃ aplicados à reforma a seco do metano.
- Batugal, P.; Bourdeix, R.; Baudouin, L. Coconut breeding. (2009). In *Breeding plantation tree crops: Tropical species*, (pp. 327-375). Springer, New York, NY.
- Benassi, A.; de Santana, E. N.; FAnton, C. (2014). O cultivo do coqueiro-anão-verde: tecnologias de produção.
- Bergamin Filho, A.; Amorim, L. (1996). Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico.
- Calvo, P.; Nelson, L.; Kloepper, J. W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and soil*, 383(1), 3-41.
- Capucho, A. S.; Zambolim, L.; Duarte, H. S. S.; Parreira, D. F.; Ferreira, P. A.; Lanza, F. E.; Costa, R. V.; Casela, C. R.; Cota, L. V. (2010) Influence of leaf position that correspond to whole plant severity and diagrammatic scale for white spot of corn. *Crop Protection*, v. 29, p. 1015-1020.
- Cardoso, G. D.; Barreto, A. F.; Araújo, E.; Almeida, F. A. D.; Carvalho, R. A. G. D. (2003). Etiology and progress of the *Pestalotiopsis* leaf spot in coconut (*Cocos nucifera* L.) plantations at the district of São Gonçalo, Sousa, Paraíba State. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 25(2), 335-336.
- Cassán, F.; Bottini, R.; Schneider, G.; Piccoli, P. (2001). *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* hydrolyze conjugates of GA₂₀ and metabolize the resultant aglycones to GA₁ in seedlings of rice dwarf mutants. *Plant Physiology*, 125(4), 2053-2058.
- Haldar, C.S.; Sengupta, S. (2015). Plant-microbe cross-talk in the rhizosphere: insight and biotechnological potential. *The open microbiology journal*, 9, 1.
- Cintra, F. L. D. (2009). Fundamentos tecnológicos para a revitalização das áreas cultivadas com coqueiro gigante no nordeste do Brasil. Embrapa Tabuleiros Costeiros.
- Conrath, U.; Pieterse, C. M.; Mauch-Mani, B. (2002). Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in plant science*, 7(5), 210-216.

Crepaldi, Silvio Aparecido. Contabilidade Gerencial. São Paulo: Atlas, 1998.

Cuenca, M. Perfil Caracterização agrossocioeconômica dos produtores de coco do município de Pacatuba-SE. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 1997.

Castro, G. L. S.; Rêgo, M. C. F.; Silvestre, W. V. D.; Batista, T. F. V.; da Silva, G. B. (2020). Açaí palm seedling growth promotion by rhizobacteria inoculation. Brazilian Journal of Microbiology, 51(1), 205-216.

De Rybel, B.; Vassileva, V.; Parizot, B.; Demeulenaere, M.; Grunewald, W.; Audenaert, D.; Beeckman, T. (2010). A novel aux/IAA28 signaling cascade activates GATA23-dependent specification of lateral root founder cell identity. Current Biology, 20(19), 1697-1706.

European Biostimulant Industry Council. Ad Terram became proud member of EBIC in July 2016. Disponível em < <https://ad-terram.nl/about-us/ebic/>>. Consultado em 01 de março de 2021.

Fan, H.; Du, C.; Guo, S. (2012). Effect of nitric oxide on proline metabolism in cucumber seedlings under salinity stress. J. Amer. Soc. Horti. Sci., 137: 127-133.

Figaj, D.; Ambroziak, P.; Przepiora, T.; Skorko-Glonek, J. (2019). The role of proteases in the virulence of plant pathogenic bacteria. International journal of molecular sciences, 20(3), 672.

Fontes, H. R. F.; Ferreira, J. M. S.; Siqueira, L. A. (2002). Sistema de produção para a cultura do coqueiro. Aracaju, SE: Embrapa Tabuleiros Costeiros.

Fontes, H. R.; Leal, M. D. L. (1998). Produção de mudas de coqueiros, *Cocos nucifera* L., pelo sistema alternativo. Embrapa Tabuleiros Costeiros-Comunicado Técnico (INFOTECA-E).

Hayat, S.; Hayat, Q.; Alyemeni, M. N.; Wani, A. S.; Pichtel, J.; Ahmad, A. (2012). Papel da prolina em ambientes em mudança: uma revisão. Sinalização e comportamento de plantas, 7 (11), 1456-1466.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. LSPA - Levantamento sistemático da Produção Agrícola. Fortaleza: IBGE/GCEA-CE. Dezembro. Séries 2020. Dados preliminares. Acesso em: 02 jun. 2021.

Jain, M.; Misra, G.; Patel, R. K.; Priya, P.; Jhanwar, S.; Khan, A. W.; Yadav, M. (2013). A draft genome sequence of the pulse crop chickpea (*Cicer arietinum* L.). The Plant Journal, 74(5), 715-729.

Jeewon, R.; Liew, E. C. Y.; Hyde, K. D. (2002) Phylogenetic relationships of *Pestalotiopsis* and allied genera inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. Mol Phylogen Evol 25: 378–392.

Jeewon, R.; Liew, E. C. Y.; Hyde K. D. (2004). Phylogenetic evaluation of species nomenclature of *Pestalotiopsis* in relation to host association. Fungal Diversity, n.17, p.39-55.

Kamilova, F.; Kravchenko, L. V.; Shaposhnikov, A. I.; Azarova, T.; Makarova, N.; Lugtenberg, B. (2006). Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(3), 250-256.

Karakaya, A. (2001). First report of infection of kiwifruit by *Pestalotiopsis* sp. in Turkey. *Plant disease*, 85(9), 1028-1028.

Krishnaraj P. U.; Dahale S. (2014). Mineral Phosphate Solubilization: Concepts and Prospects in Sustainable Agriculture. *Proc. Indian Natl. Sci. Acad.* 2014; 80:389–405.

Kucey, R. M. N.; Janzen, H. H.; Leggett, M. E. (1989). Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. In *Advances in agronomy* (Vol. 42, pp. 199-228). Academic Press.

Lavenus, J.; Goh, T.; Roberts, I.; Guyomarc'h, S.; Lucas, M.; De Smet, I.; Laplaze, L. (2013). Lateral root development in Arabidopsis: fifty shades of auxin. *Trends in plant science*, 18(8), 450-458.

Lima J. V.; Tinôco R. S.; Olivares F. L.; de Moraes A. J. G.; Chia G. S.; da Silva G. B. (2020). Hormonal imbalance triggered by rhizobacteria enhance nutrient use efficiency and biomass in oil palm. *Scientia Horticulturae*, 264.

Lins P, Viégas I. (2008). Adubação do coqueiro no Pará. Embrapa Amazônia Oriental-Documentos (INFOTECA-E).

Lobato, A. K. S.; Gonçalves-Vidigal, M. C.; Vidigal Filho, P. S.; Andrade, C. A. B.; Kvitschal, M. V.; Bonato, C. M. (2010). Relationships between leaf pigments and photosynthesis in common bean plants infected by anthracnose. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 38(1), 29-37.

Lu, Y.; Yao, J. (2018). Chloroplasts at the crossroad of photosynthesis, pathogen infection and plant defense. *International journal of molecular sciences*, 19(12), 3900.

Lucon, C. M. M. (2009). Promoção de crescimento de plantas com o uso de *Trichoderma* spp. São Paulo: Instituto Biológico/Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Vegetal.

Lugtenberg, B.; Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual review of microbiology*, 63, 541-556.

Madar, Z.; Solel, Z.; Kimchi, M. (1991). *Pestalotiopsis* canker of Cypress in Israel. *Phytoparasitica* 19(1):79–81.

Marschner, H. (1995). Mineral nutrition of higher plants. 2nd. Edn. Academic Pres.

Modesto, J. C.; Fenille, R. C. (2004). Controle químico da helmintosporiose (*Bipolaris incurvata*) em coqueiro cultivar ‘anão-verde’ em condições de campo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 26, 354-355.

- Niu, D. D.; Wang, C. J.; Guo, Y. H.; Jiang, C. H.; Zhang, W. Z.; Wang, Y. P.; & Guo, J. H. (2012). The plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 induces resistance in tomato with induction and priming of defense response. *Biocontrol science and technology*, 22(9), 991-1004.
- Niu, X. Q.; Zhu, H.; Yu, F. Y.; Tang, Q. H.; Song, W. W.; Liu, L.; Qin, W. Q. (2015). First report of *Pestalotiopsis menezesiana* causing leaf blight of coconut in Hainan, China. *Plant Disease*, 99(4), 554.
- Nunes, M. A. L. (2002). Comportamento ecofisiológico de bananeiras (*Musa* spp) em solo artificialmente infestado com *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense (E. F. Smith) Sn. & Hansen. 2000. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – UFPA. Centro de Ciências Biológicas/ MPEG/Embrapa Amazônia Oriental, Belém.
- Neto, M. F.; Holanda, J. S. Folegatti, M. V.; Gheyi, H. R.; Pereira, W. E.; Cavalcante, L. F. (2007). Qualidade do fruto do coqueiro anão-verde em função do nitrogênio e potássio na fertirrigação. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 11(5), 453-458.
- Pereg, L.; McMillan, M. (2015). Scoping the potential uses of beneficial microorganisms for increasing productivity in cotton cropping systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 80, 349-358.
- Perera, L.; Baudouin, L. E.; Mackay, I. S. S. R. (2016). Markers indicate a common origin of self-pollinating dwarf coconut in South-East Asia under domestication. *Scientia Horticulturae*, v. 211, p. 255–262.
- Rademacher, W. (2009). Prohexadione–Ca–A new plant bioregulator for use in apple production. *Encontro sobre Fruticultura de Clima Temperado*, 11, 1-10.
- Saravanakumar, D.; Kavino, M.; Raguchander, T.; Subbian, P.; Samiyappan, R. (2011). Plant growth promoting bacteria enhance water stress resistance in green gram plants. *Acta physiologiae plantarum*, 33(1), 203-209.
- Segond, D.; Abi Khalil, E.; Buisson, C.; Daou, N.; Kallassy, M.; Lereclus, D.; Le Roux, C. N. (2014). Iron acquisition in *Bacillus cereus*: the roles of IIsA and bacillibactin in exogenous ferritin iron mobilization. *PLoS Pathog*, 10(2), e1003935.
- Serra, I. M. R. S.; Coelho, R. S. B. (2007). *Pestalotiopsis* spot in heliconia: disease characterization and potential sources of resistance. *Fitopatologia Brasileira*, 32(1), 44-49.
- Sharma, P.; Jha, A. B.; Dubey, R. S.; Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*.
- Siqueira, L. A.; Aragão, W. M.; Tupinambá, E. A. A Introdução do coqueiro no Brasil, importância histórica e agrônômica, 24p, 2002. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Documentos, 47), 2021.

Suwannarach, N.; Sujarit, K.; Kumla, J.; Bussaban, B.; Lumyong, S. (2013). First report of leaf spot disease on oil palm caused by *Pestalotiopsis theae* in Thailand. *Journal of general plant pathology*, 79(4), 277-279.

Vale F. X. R.; Jesus Junior W.C.; Zambolim, L. (2004). *Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas*. Perffil, Belo Horizonte. 531 p.

Zeng, W.; Melotto, M.; He, S.Y. 2010. Plant stomata: a checkpoint of host immunity and pathogen virulence. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21, 599–603.

Capítulo 1: *Bacillus cereus* improves performance of Brazilian green dwarf coconut palms with reduced chemical fertilization

Bacillus cereus improves performance of Brazilian green dwarf coconut palms seedlings with reduced chemical fertilization

¹Plant Protection Laboratory, Institute of Agrarian Sciences, Federal Rural University of Amazon (UFRA), Belém, Pará, Brazil

²Federal University of Amazonas (UFAM), Education, Agriculture and Environment Institute, Humaitá, Brazil

³Sococo S.A Agroindústrias da Amazônia, Belém, Pará, Brazil

†These authors have contributed equally to this work.

* Correspondence:

Gisele Barata da Silva

Keywords: *Bacillus cereus*, coconut palm, sustainable agriculture, growth promotion.

Abstract

Coconut production in the Amazon requires the knowledge and development of sustainable technologies to alleviate the detrimental effects of inorganic chemical fertilizers and intensive farming practices. In this study, we investigated the effects of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) isolated from coconut seedlings on nutrient use efficiency (NUE) and physiological mechanisms related to biomass accumulation of seedlings grown with reduced inorganic fertilizer levels. Of the 96 PGPR isolates tested on rice plants, the isolate *Bacillus cereus* (UFRABC40) was selected, as it resulted in the most significant gain in growth variables. In a commercial coconut tree nursery, we subjected seedlings to two treatments, both with seven replications: control 100% NPK chemical fertilizer (CF) and *B. cereus* + 50% NPK CF. The results indicated that the inoculation increased phytohormone levels (190% indole acetic acid (IAA), 31% gibberellic acid GA₃ and 17% gibberellic acid GA₄) and leaf gas exchange (48% by assimilation of CO₂ (A), 35% stomatal conductance to water vapor (*g_s*), 33% transpiration and 57% instantaneous carboxylation efficiency) in leaves. Furthermore, growth parameters (shoot, root, and total dry weight, height, and diameter) and macro and micronutrient levels (95% N, 44% P, 92% K, 103 Ca, 46% Fe, 84% B) were improved. Our results show the potential ability of strain *Bacillus cereus* UFRABC40 to promote the growth performance of coconut seedlings under decreased application of inorganic fertilizers. The application of microbial based products in coconut seedling production systems improves plants physiological performance and the efficiency of nutrient use.

1 Introduction

The cultivation of coconut trees is of great economic and social importance due to the value generated by coconut production. According to FAO (2018), Indonesia is the world's largest coconut producer, followed by the Philippines, India, Sri Lanka, and Brazil. Production in Brazil occupies an area of 216 hectares, yielding approximately 2 million tons coconuts (IBGE, 2019), 1.5 million of which are obtained from green dwarf and hybrid plants (Sindcoco, 2017). The Amazon region produces 11% of the country's coconut yield; of this, 10% (200,000 tons) comes from the state of Pará. The coconut seedlings are the first stage affecting the productivity of the perennial plant, which has a mean production-life of 40 years. Green dwarf coconut seeds have a low germination rate, and their seedling have low vigor and quality, primarily due to the incidence of leaf spots (Rabelo, 2006; Vinodhini and Deshmukh, 2017).

The global demand for food has resulted in large use of CFs to attain maximum agricultural efficiency. According to Wang and Li, (2019), only 50% of N from fertilizer is absorbed by crops. Moreover, it has been estimated that up to 7 million tons of P per year will be used in phosphate fertilizers by 2050 (Mogollon et al., 2018). The excessive and incorrect use of fertilizers damages the environment via leaching, runoff, and erosion (Good and Beatty, 2011; Savci, 2012; Conijn, 2018). It also leads to changes in the soil's physical, chemical, and microbiological characteristics (Blanco- Blanco-Canqui and Schlegel, 2013). The low efficiency of synthetic fertilizers is related to nutrient loss via leaching and evaporation to the atmosphere (Gyaneshwa et al., 2002; Tilman, 2018). Thus, the efficient use of synthetic fertilizers is important for both productivity and environmental protection (Paungfoo-Lonhienne, 2019). Furthermore, technologies that decrease the adverse effects of CFs on soil microbiota while promoting crop growth and productivity should be investigated.

The use of rhizobacteria in plant production can promote growth (Gange and Gadhawe, 2018), and some genera such as *Pseudomonas* sp. and *Bacillus* sp. have been shown to promote growth of coconut seedlings (George et al., 2018). Rhizobacteria can alter anatomical characteristics and improve photosynthetic, hormonal, and nutritional performance (Glick, 1999; Lucy, Reed and Glick, 2004; Lwin et al., 2012; Samaniego-Gómez et al., 2016). They also stimulate the synthesis of phytohormones such as indole acetic acid (IAA) and gibberellins that promote root and shoot growth (Pahari and Mishra, 2017). Rhizobacteria also optimize the use of CFs and are considered a sustainable technology (Angulo, 2020). They include N₂ fixers, phosphorus, and potassium solubilizers (Bhardwaj et al., 2014). In rice, a 50% reduction in N and P fertilization resulted in better nutrient absorption and chlorophyll content (Naher et al., 2018). Additionally, the use of *Bacillus amyloliquefaciens* combined with 50% CF changed the hormonal behavior of oil palm seedlings in Amazonian climatic conditions, increasing IAA levels by 66%, shoot dry matter by 110%, root dry matter by 123%, and improving macro and micronutrient uptake (Lima et al., 2020).

Coconut production in the Amazon requires knowledge and sustainable technology development to counteract the negative impacts of CF dependency. Access to the diverse range of microorganisms associated with plants and soil in the Amazon biome may improve bioinoculants production. Bioinoculants a complex process sensitive to both biotic and abiotic factors.

Therefore, this study aimed to evaluate the effects of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on coconut seedlings growth by investigating the physiological and nutritional mechanisms in seedlings grown under low CF conditions.

2 Materials and Methods

The experiment was conducted in a coconut tree seedling nursery, Santa Isabel do Pará-Brazil (1°13'26" S, 48°02'29" W).

2.1 Isolation of bacterial strains

Six soil samples containing roots (100 g) were collected from an eight-year-old dwarf coconut plantation in Brazil. Each sample was divided into portions of 10 g to obtain the isolates. Each soil sample (10 g) was diluted in 50 mL of sterile distilled water and agitated for 30 min. An aliquot of 20 μ L was then separated from the original suspension and diluted in 80 μ L (10^{-3}). Next, an aliquot of 50 μ L was separated from the concentrated suspension and seeded into three 9-mm Petri plates containing 10 mL of culture medium (per liter: g of sucrose, 8 g of hydrolyzed acid casein, 4 g of yeast extract, 2 g of K_2HPO_4 , 0.3 g of $MgSO_4$, and 15 g of agar (Kado and Heskett, 1970). Plates were subsequently incubated at 27 °C \pm for 12 h. After incubation, colonies with different colors, borders, and morphology in the same plate were isolated and streaked into a new plate containing culture medium (Kado and Heskett, 1970). These plates were incubated for the same time and temperature as described above, followed by bacterial isolate purification. The bacterial were collected in microtubes containing distilled and sterile water and kept at 5 °C in a refrigerator.

2.2 Selection of isolates

The selection of growth-promoting isolates was carried out on rice plants, and subsequently their interaction with coconut seedlings was tested according to the method described by Castro et al 2020.

Briefly, rice seeds (10 g) were inoculated with 20 mL of bacterial suspension obtained from the culture growth in liquid medium to 10^8 CFU \cdot mL $^{-1}$ (Kado and Heskett, 1970) and kept under agitation at 114 rpm at 27 °C for 24 h (Filippi et al., 2011). The experimental design consisted of 97 treatments (96 rhizobacteria isolates and a control) with three replicates each in a greenhouse. Twenty-one days after germination, plants were evaluated for root and shoot length (LR and LS, respectively) and total biomass (TDM). Analysis of variance was performed for all variables, followed by a comparison of means using the Scott-Knott test ($p < 0.05$). The R40 isolate (Table 1) resulted in superior growth parameters compared with all other treatments; therefore, it was subjected to *in vitro* biochemical tests and selected for subsequent testing with green dwarf coconut seedlings from Brazil.

2.2.1 Identification of bacterial isolate

The R40 isolate was cultured in culture medium 523 (Kado and Heskett, 1970) for 24 h at 28 °C. Two inoculation loops were added to a microtube containing 1 mL of extraction buffer (Tris-HCl 1x). Then, DNA extraction was performed according to the method described by Mariano and Silveira (2005). The R40 isolate was identified using the 16S rDNA region gene and 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 1492R

(5'ACCTTGTTACGACTT-3') primers (Lane et al., 1985). The PCR amplification reaction was composed of 1x Master Mix 2x (Promega) (0.05 U μL^{-1} Taq DNA polymerase, 4 mM MgCl_2 reaction buffer, 0.4 mM of each dNTP; Promega Corporation, Madison, WI, USA), 10 μM of each primer, and 50 ng DNA. Amplification of the 16S rDNA region was performed in a thermal cycler (MasterCycler Nexus, Eppendorf, Hamburg, Germany) with the following steps: initial denaturation at 94 °C for 4 min; 25 cycles of 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min; and a final extension at 72 °C for 7 min. Reactions were purified using 5 μL of PCR product plus 2 μL Exo-SAP enzyme (Exonuclease). Samples were purified via thermal cycler, performed at 37 °C for 4 min, followed by an incubation period at 80 °C for 1 min to inactivate both enzymes irreversibly. After the purification reaction, sequencing was carried out in an automated sequencer (ABI3730) at the Laboratory of Bioinformatics and Evolutionary Biology, Federal University of Pernambuco (LABBE-UFPE).

DNA sequence analysis and assembly of the R40 isolate contigs were performed using the Staden Package (Staden, 1998R). The nucleotide sequence of the UFRABC40 bacteria was compared with the isolate sequences available in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database using BLASTn software (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Afterward, all sequences were aligned (MEGA). Bayesian Inference (IB) analysis was performed by means of Mr. Bayes v. 3.2.6 (Ronquist et al., 2012) implemented in CIPRES (<https://www.phylo.org/portal2/home.action>) using the best nucleotide replacement model. This was selected according to Aikake's Information Criterion (AIC) through Mr. Modeltest 2.3 (Nylander, 2004), using 1,000,000,000 generations of Markov Chain Monte Carlo (MCMC) with sampling every 1,000 and 10,000 generations. Identification of access and phylogenetic trees obtained by comparing the selected strain with the reference strains, using 29 reference accessions to identify the selected strain (R40). Identifying a bacterial isolate using 16S rRNA was used to identify the strain selected with the strain of greatest homology. Subsequent probabilities were calculated after discarding the first 25% of generations. All trees obtained from individual genes and concatenated through the IB method were visualized through Fig Tree 1.4.1 software (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

2.2.2 Biochemical tests

2.2.2.1 Indole acetic acid (IAA) production

The R40 isolate was grown in Luria Bertani (LB) medium under 100 rpm agitation and incubated at 28 °C for 78 h. Subsequently, 3 mL of the suspension was centrifuged at 4 °C for 10 min at 4,000 rpm (Moustaine et al., 2017). Then, 90 μL of supernatant and 60 μL of Salkowski reagent were placed in a microtube and incubated in the dark for 30 min to determine if a change in mean media color occurred (Gordon and Weber, 1951).

2.2.2.2 Production of siderophores

The R40 isolate was inoculated into test tubes containing 10 mL Tryptic Soybean Broth (TSB) (1:10 diluted) medium (3 g in 1,000 mL distilled water) and incubated at 28 °C under agitation at 114 rpm for 24 h. Subsequently, tubes containing the bacterial suspension were centrifuged for 10 min at 12,000 rpm. Then, 1 mL of the supernatant was transferred into another tube containing 1 mL of blue chrome S (BCS) solution. Fifteen minutes after mixing, if siderophores were produced, the dark blue mixture turned yellow (Schwyn and Neilands, 1987).

2.2.2.3 Phosphate solubilization

The R40 isolate was grown on NBRIP growth medium containing 10 g glucose, 2.5 g $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 25 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.25 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g KCl, and 0.1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Nautiyal, 1999), at a pH of 7.0, and with the addition of 1.5% agar in triplicate. The plates were incubated for 14 d at 28 °C; the presence of a halo was indicative of phosphate solubilization.

2.3 Evaluating R40 isolate ability to promote growth coconut seedlings

2.3.1 Coconut plantule preparation

In a coconut tree nursery, the coconut seeds were sown in wooden boxes (30 cm high, 2 m wide, and 10 m long) containing coconut fiber and moistened daily for 90 d. The chemical characterization of the coconut fiber substrate (Golden Mix type 4 - AMAFIBRA®), was as follows: 0.086 g kg^{-1} N, 0.264 g kg^{-1} P, 0.580 g kg^{-1} K, 0.128 mg kg^{-1} Ca, 0.447 mg kg^{-1} MgO, 272.86 mg kg^{-1} S, 42.25 mg Na, 0.703 mg L^{-1} B, 0.12 g kg^{-1} , copper Cu, 0.5 mg kg^{-1} Fe, 0.6 mg kg^{-1} Mn, 0.78 mg kg^{-1} Zn, and 92.43% organic matter (OM).

2.3.2 Coconut seedling preparation

Seedlings with 15 cm tall and two leaves were transplanted to polyethylene bags (40 × 40 × 40 cm) containing 7.5 kg/bag of coconut fiber (50% moist). Chemical fertilization was performed 30 d after transplanting (DAT) with 3 g urea, 40 g Simple superphosphate (18% P_2O_5), 10 g Potassium chloride (60% K_2O), and 5 g magnesium oxide (30% Mg) (Lins and Viégas, 2008).

2.3.3 Evaluation of coconut seedling growth

For the establishment of treatments, the recommendation of commercial fertilization was followed. Thus, the control treatment is characterized as 100% chemical fertilization (CF) and without the use of bioinoculant. The control treatment used standard CF (as described in the previous section) applied at 90 and 150 DAT. The treatment with rhizobacteria comprised inoculation with a suspension of R40 isolate (10^8 CFU) + 50% standard CF at 90 DAT. The bacterial strain was inoculated by applying 300 mL plant^{-1} of a suspension at 10^8 CFU·mL⁻¹ through watering at 40 and 70 DAT. Biometrics, gas exchange, hormone levels, and nutrient levels were evaluated at 160 DAT. The experimental design was completely randomized, with ten replications and two treatments.

2.3.3.1 Biometrics

The following biometric variables were evaluated: shoot, root, and total dry weight, height, and diameter. Additionally, leaf area was determined from photographs using APS Assess software version 2.0 (Lamari, 2002).

2.3.3.2 Leaf gas exchange

Gas exchange parameters were estimated using the first physiologically mature, fully expanded leaf, from apex to base, at three months of age. The net assimilation of CO_2 (A), stomatal conductance to water vapor (g_s), transpiration rate (E), and instantaneous carboxylation efficiency (A/C_i) were estimated between 08:00 and 11:00 am using a

portable open-flow gas-exchange system (LI6400XT, LI-COR, Lincoln, NE, USA) under an external CO₂ concentration of 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ of air and artificial photosynthetically active radiation (PAR) of 900 $\mu\text{mol of photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

2.3.3.3 Hormone profile

Indole acetic acid (IAA) and gibberellic acid (GA₃ and GA₄) hormone levels were determined according to Munné-Bosch et al., (2011). For this, 300 mg of fresh tissue from the second leaf of each plant was stored in liquid N. The tissue material was then lyophilized and macerated in liquid N. Then, 40 mg dry mass was weighed, and 400 μL of extraction solvents (methanol:isopropyl alcohol:acetic acid; 20:79:1) were added. Samples were vortexed four times for 20 s (on ice), sonicated for 5 min, placed on ice for 30 min, and then centrifuged at 13,000 rpm for 10 min at 4 °C. After centrifugation, 350 μL of supernatant was removed and transferred to another microtube. Approximately 300 μL of the extract obtained in flasks was added, and 5 μL of the mixture was injected into the NuBioMol LC/MS system (Biomolecule Analysis Center, UFV, Brazil). A chromatography column (Agilent Eclipse; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was used (RRHD, C18 column, 50 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm) with a flow rate of 0.3 mL min^{-1} coupled to a triple quadrupole QQQ mass spectrometer (Agilent Technologies). Mass spectra were alternately negative/positive operated according to the retention time for each hormone. The generated mass spectra were processed using MassHunter software to obtain the extracted ion chromatograms (XIC) for each transition and area values, indicating the abundance of each hormone. A curve pattern for each hormone over a concentration range from 0.1 to 300 ng mL^{-1} was used to convert the XIC area values into ng g^{-1} of plant tissue. Molecular mass spectra analysis was conducted using Skyline software.

2.3.3.4 Nutritional content

Leaf samples dried in an oven with forced air circulation at 60 °C were ground. The samples were submitted to sulfuric and nitroperchloric digestion. The determination of nitrogen (N) was by distillation in Microdistillator Kjeldhal, phosphorus (P) by Visible Ultraviolet Spectrophotometry (UV-VIS) and potassium (K), calcium (Ca) and Iron (Fe), by absorption spectrometry atomic, flame modality (EAA / cham). Analysis of Boron (B) was undertaken after dry digestion of the samples using the method described by Azometrinah (Malavolta, Vitti and Oliveira, 1997; Carmo et al., 2000). The nutrient use efficiency (NUE) was estimated from agronomic efficiency, $\text{NUE (g DW g}^{-1}) = \text{aerial dry weight (g) / plant applied nutrient (g)}$ (Fageria et al., 2008).

2.4 Statistical analysis

Differences among means for treatments were evaluated using the *t*-test ($p < 0.05$). All data were analyzed using R software (Team, 2017).

3 Results

3.1 Isolate selection in the plant model

The rice plants used as a model for selecting rhizobacteria showed that the R40 isolate was better for root and shoot length variables and total biomass compared with the other treatments (Table 1). Compared to the control treatment, isolate R40 increased in by 101% shoot length, 60% root length and 280% total biomass. *In vitro* biochemical tests

were performed, showing that the R40 isolate was able to solubilize phosphate as proven by the halo formation around the bacterial colonies. There were also reactions indicating siderophore and IAA production when the R40 isolate was exposed to CAS solution and Salkowski's test, respectively (Figure 1). Thus, the R40 isolate was selected to evaluate growth-promotion in green dwarf coconut seedlings in Brazil under nursery conditions.

3.2 Growth-promotion coconut seedlings

The R40 isolate sequence was compared in GenBank using the BLASTn tool. The isolate showed 99.75% identity with the genus *Bacillus* (ATCC14579T). Based on the construction of the phylogenetic tree from 29 accesses, it was possible to identify the isolate as *B. cereus*. The sequence was deposited in GenBank as *Bacillus cereus* (UFRABC40) with accession number MN393059 (Supplementary material).

The inoculation of strain *B. cereus* promoted the growth of coconut seedlings even in the presence of lower levels of chemical fertilizers (Figure 3). The application of *B. cereus* significantly increased shoot dry weight (47%), root dry weight (122%), total dry weight (35%), height (26%), and diameter (30%) compare with the control treatment (Figure 4).

Gas exchange was also influenced by inoculation with *B. cereus* from the third month of age in Brazilian green dwarf coconut tree seedlings. The nursery trial results indicated a maximum increase of 48% in *A*, 35% in *gs*, 33% in *E*, and 57% in *A/Ci* in plants inoculated with *B. cereus* compared with the uninoculated control (Figure 5). *B. cereus* inoculation led to an increase of 190% in IAA, 31% in GA_3 , and 17% in GA_4 in coconut seedlings compared with the uninoculated control (Figure 6).

The *B. cereus* application significantly increased macronutrients and micronutrients in coconut plants by 95, 44, 82, 103, 46, and 84% for N, P, K, Ca, Fe, and B, respectively (Table 3), compared with the control. Treatment with *B. cereus* shows greater efficiency in the use of nutrients (Table 4).

4 Discussion

The rhizobacteria *B. cereus* promoted the growth of green dwarf coconut seedlings. Bacterial inoculation induced changes in the metabolism of coconut tree seedlings, by stimulating hormonal modulation, and photosynthetic performance and efficient use of nutrients, which ultimately resulted in a greater growth of coconut tree seedlings. These results may be due to the increase in IAA concentrations derived from the enhanced production by *B. cereus* strain (as shown in Figure 1) or due to the regulation of its biosynthesis in the plants (Figure 6). IAA is responsible for modulating the differentiation and elongation of lateral roots, as well as increasing the number of root hairs, therefore promoting greater nutrient absorption (Costa et al., 2015; Cassán et al., 2020). Combined with the positive effects of IAA, it is possible that bioinoculation has reduced ethylene levels in the roots by the activity of the enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase. This enzyme regulates ethylene synthesis by cleaving its acid precursor, ACC (Belimov et al., 2004; Siddikee et al., 2011) thus decreasing the negative effects of ethylene on growth and allowing the development of a better root system in inoculated plants (Glick, 2012). *B. cereus* inoculation resulted in more efficient use of macro and micronutrients. It was observed a significant positive effect on the levels of the seven nutrients evaluated (Table 3, 4). Recommendations for the use of CFs are based on soil analysis and the mechanisms of macro and micronutrient loss, such as

volatilization, leaching, and adsorption, resulting in low absorption by the plant (Biswas, Ladha and Dazzo, 2000; et al., 2018; Ahmad et al., 2019). These root regions have a high influx of available ions, resulting in greater water and nutrients absorption. Root system changes induced by microorganisms improve NUE. This phenomenon has been reported in the interaction between banana and the bacterial strains *Pseudomonas fluorescens* Ps006 and *Bacillus amyloliquefaciens* Bs006 (Gamez et al., 2018) resulting in greater plant biomass. Another mechanism involved in the NUE of biostimulated coconut plants is the mineralization rate of the coconut fiber substrate by bioinoculant enzymatic activity, resulting in increased nutrient availability.

For N, *B. cereus* may make N available from the organic N contained in the coconut fiber via ammonium and nitrite oxidation. This was described by Di Benedetto et al., (2016), who found that *Pseudomonas* and *Bacillus* strains were able to oxidize ammonia to NO_2^- ions (nitrosification) and then to NO_3^- ions (nitrification). In a study with *Triticum aestivum*, the inoculation of *B. megaterium* SNji (BmeSNji) and *Azospirillum brasilense* 65B (Abr65B) provided greater availability of nutrients to plants, such as N, from decomposition of organic matter resulting in greater accumulation of biomass in plants (Nguyen et al., 2019).

Coconut plants inoculated with *B. cereus* also had enhanced K uptake. This might be explained by its ability to produce organic acids that act in the mineralization of K present in the coconut fiber substrate, making K^+ ions available for plant absorption. According to Sheng and He (2006), the *Bacillus edaphicus* NBT strain and its mutants can chelate metals and mobilize K from K-containing minerals using organic acids such as citric, oxalic, tartaric, and succinic.

Solubilization of P by rhizobacteria requires the production of phosphatases and phytases that mineralize the organic material by esters and H_3PO_4 anhydride hydrolysis (Tabatabai, 1994; Nannipieri et al., 2011). In maize, *Pseudomonas plecoglossicida* (PSB5) inoculation increased P production by 18% and its total absorption by 46%. This was due to the increased activity of enzymes such as dehydrogenases and phytases (Kaur and Reddy, 2013). In this study, *B. cereus* was able to solubilize P *in vitro* and plants inoculated with this strain showed higher levels of P than control ones. As observed *in vitro*, *B. cereus* can produce siderophores, which are low molecular weight iron-chelating compounds with a great affinity and selectivity for binding and forming a Fe complex (III), reducing Fe^{3+} to Fe^{2+} (Hider and Kong, 2010; Fukushima et al., 2013). In mustard, the capacity of *Bacillus* sp. PZ-1 to produce siderophores resulted in higher Fe levels available for the plant (Yu et al., 2017).

Boron is a micronutrient essential for plant growth and development, and coconut plants have high B requirements (Moura et al., 2013). Brazilian Amazonian soils are generally deficient in B, and appropriate CF use is critical to avoid B deficiency. However, the application of excess exogenous B can easily be lethal to plants. Boron is not described as an essential nutrient for PGPR growth; however, in *Arthrobacter nicotinovorans* strain C, phenylboronic acid (PBA) catabolism was demonstrated, releasing B as orthoboric acid [$(\text{B}(\text{OH})_3)$] (Negrete-Raymond, Weder and Wackett, 2003). Rhizobacterium-mediated B availability to plants occurs through the production of organic acids in the rhizosphere region, resulting in medium acidification and pH decrease, the latter being the main limiting factor in B availability (Deubel, Gransee and Merbach, 2000; Turan et al., 2006). Concomitant B uptake by the plant occurs through the mass flow from transpiration (Alpaslan and Gunes, 2001). Therefore, the increased transpiration rate provided by PGPR inoculation can influence B absorption (Mayak, Tirosh and Glick,

2004; Dodd and Pérez-Alfocea, 2012). In the present study, plants inoculated with *B. cereus* had almost twice the accumulated B in the shoots and twice the transpiration rate compared with the control. According to our analysis, this may be due to the enzymatic activity of *B. cereus* on the coconut fiber substrate that contained 70.35 ppm of B. The positive relationship between P and B absorption found in plants inoculated with *Bacillus* sp. has been recorded in canola; *Bacillus* improved B and P availability by 37 and 30%, respectively, in native soil (Samreen, 2019). These results are like ours, obtained with *B. cereus* coconut seedlings (Table 3). The increasing use of CFs especially with NPK and B is rapidly making them polluting agents. When not absorbed by the plants, they are leached and deposited in watercourses, or immobilized and accumulated in the soil. Implementing microbial technology in coconut seedlings tree production systems improves the physiological performance and NUE of plants, reducing the need for CFs.

In this study, the increases in the root system induced by *B. cereus* provided coconut seedlings with a greater possibility of absorption and translocation of nutrients, contributing to a greater growth in the aerial part (Amir et al., 2005). The increase in the aerial part and leaf expansion promoted by *B. cereus* can be attributed to the greater synthesis of gibberellins. Increased gibberellin concentration of active in the leaf tissue was stimulated by the activity of *B. cereus* because this microorganism promoted a significant in the synthesis and consequent increase in the concentration of this phytohormone (Lucangeli and Bottini, 1997; Piccoli et al., 1997; Cassán et al., 2001). Similar results were observed in alder (*Alnus glutinosa*) plants, where the use of *Bacillus* sp. enhanced the production of several isomers of gibberellins (GA₁, GA₃, GA₄, and GA₂₀) that were responsible for leaf area expansion and increased leaf emission rate (Gutiérrez-Mañero et al., 2001; Chauhan et al., 2015). Larger leaf areas resulted in a higher biomass accumulation in *B. cereus* inoculated plants.

This leaf modulation promoted by the microorganisms led to increased light capture and, consequently, increased CO₂ assimilation. The increased CO₂ input is due to a larger stomatal opening, verified in the present study, allowing greater CO₂ diffusion, and reducing stomatal resistance (Flexas et al., 2012; Zhang, Liu and Shan, 2017). *B. cereus* regulates most of the Rubisco carboxylation, the electron transport rate, and increases the supply of ATP and NADPH molecules for photosynthesis (Shi, Lou and Li, 2010), increasing carbon fixation; consequently, increasing carbohydrate production as observed in the improved growth parameters of *B. cereus* inoculated plants.

5 Conflict of Interest

We declare that we have no significant competing financial, professional, or personal interests that might have influenced the performance or presentation of the work described in this manuscript.

6 Author Contributions

AC was present in all study assays and was responsible for fieldwork, statistical analysis of data, interpretation of results, and writing the manuscript. SC was present in all study assays and was responsible for fieldwork. DS, AM, EA, and PL were responsible for statistical analysis, analysis of economic indicators, interpretation of results, and assisted in writing and revising the manuscript. GBS was responsible for project management, guiding the students through all stages of the process. GBS was also responsible for the verification and monitoring of field data and writing the manuscript.

7 Funding

No applicable

8 Acknowledgments

We thank anonymous reviewers for their valuable comments and suggestions. Discussions with Professor Gledson Luiz Salgado de Castro (Universidade Federal Rural da Amazônia, Brazil) were highly valuable in the development of this work. We thank the Federal University of Amazonia and the Plant Protection Laboratory for providing the facilities. We also thank the Amazon Foundation for the Support of Studies and Research of the State of Pará (FAPESPA) and Sococo S/A for their partnership and support, in particular the team from the phytopathology department.

References

Ahmad, M., Adil, Z., Hussain, A., Mumtaz, M. Z., Nafees, M., Ahmad, I. and Jamil, M. Potential of phosphate solubilizing *Bacillus* strains for improving growth and nutrient uptake in mungbean and maize crops. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences* (2019), 56(2). DOI: <https://doi.org/10.21162/PAKJAS/19.7285>

Alfenas, A. C. and Mafia, R. G. *Métodos em Fitopatologia*. Viçosa: UFV. 2007. 382p.

Alpaslan, M. and Gunes, A. Interactive effects of boron and salinity stress on the growth, membrane permeability and mineral composition of tomato and cucumber plants. *Plant and Soil* (2001), 236, 123–128. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1011931831273>

Angulo, J., Martínez-Salgado, M. M., Ortega-Blu, R. and Fincheira, P. Combined effects of chemical fertilization and microbial inoculant on nutrient use efficiency and soil quality indicators. *Scientia Agropecuária*, (2020), 11(3), 375-380. DOI: [10.17268/sci.agropecu.2020.03.09](https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.03.09)

Belimov, A. A., Dodd, I. C., Hontzeas, N., Theobald, J. C., Safronova, V. I. and Davies, W. J. Rhizosphere bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase increase yield of plants grown in drying soil via both local and systemic hormone signalling. *New Phytologist*, (2004), 181(2) 413-423. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02657.x>

Bhardwaj, D., Ansari, M. W., Sahoo, R. K. and Tuteja, N. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility plant tolerance and crop productivity. *Microbial cell factories*, (2014), 13(1) 66. DOI: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-66>

Biswas, J. C., Ladha, J. K. and Dazzo, F. B. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. *Soil Sei Soc Am J.* (2000), 64:1644-1650. DOI: <https://doi.org/10.2136/sssaj2000.6451644x>

Blanco-Canqui, H. and Schlegel, A. J. Implications of inorganic fertilizer application of irrigated corn on soil properties: lessons learned after 50 years. *Journal of Environmental Quality*. (2013), 42: 861–871. DOI: <https://doi.org/10.2134/jeq2012.0451>

Carmo, C. D. S., de Araujo, W. S., Bernardi, A. D. C., & Saldanha, M. F. C. Métodos de análise de tecidos vegetais utilizados na Embrapa Solos. Embrapa Solos-Circular Técnica (INFOTECA-E) (2000).

Castro, G.L.S., Rêgo, M.C.F., Silvestre, W.V.D. et al. Açai palm seedling growth promotion by rhizobacteria inoculation. *Braz J Microbiol* 51, 205–216 (2020). <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00159-2>

Cassán, F., Bottini, R., Schneider, G. and Piccoli, P. *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* hydrolyze conjugates of GA20 and metabolize the resultant aglycones to GA1 in seedlings of rice dwarf mutants. *Plant Physiology* (2001), 125(4) 2053-2058. <https://doi.org/10.1104/pp.125.4.2053>

Cassán, F., Coniglio, A., López, G., Molina, R.; Nievas, S., Carlan, C. L., Donadio, F.; Torres, D., Rosas, S., Pedrosa, F. O., Souza, E.; Zorita, M. D., De-bashan, L. and Mora, V. Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. *Biology and Fertility of Soils*, v.56, p.461-479, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01463-y>

Chauhan, H., Bagyaraj, D.J., Selvakumar, G. and Sundaram, S. P. Novel plant growth promoting rhizobacteria—Prospects and potential. *Appl Soil Ecol* (2015), 95:38–53. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.05.011>

Conijn, J. G., Bindraban P S, Schröder J J and Jongschaap R. Can our food system meet food demand within planetary boundaries? *Agric Ecosyst Environ*, (2018), 251:244–256. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.06.001>

Costa, R. R. G. F., Quirino, G. S. F., Naves, D. C. F., Santos, C. B., Rocha, A. F. S. Efficiency of inoculant with *Azospirillum brasilense* on the growth and yield of second-harvest maize. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v.45, p.304-311, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1983-40632015v4534593>

Delgado-Baquerizo, M. Oliverio, A. M, Brewer, T. E., Benavent-González, A., Eldridge, D.J. and Bardgett, R.D. A global atlas of the dominant bacteria found in soil. *Science* (2018), 359: 320–3. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aap9516>

Deubel, A., Gransee, A., and Merbach, W. Transformation of organic rhizodeposits by rhizoplane bacteria and its influence on the availability of tertiary calcium phosphate. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, (2000), 163:387–392. DOI: [http://dx.doi.org/10.1002/1522-2624\(200008\)163](http://dx.doi.org/10.1002/1522-2624(200008)163)

Deus, J. A. L. D., Neves, J. C. L., Soares, I., Alvarez, V. V. H., Albuquerque, F. M. R. D., Santos, L. L. D. and Natale, W. Modeling in the adjustment of fertilization recommendation through leaf analysis in fertigated ‘Prata’banana. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, (2018), 42. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/18069657rbc20170372>

Di Benedetto, N.A., Campaniello, D. and Bevilacqua, A. Proceedings of Plant Biology Europe Congress. Prague Czech Republic: EPSO/FESPB; 2016. Characterization of autochthonous plant growth promoting bacteria in relation to durum wheat nitrogen use efficiency; pp. 26–30. DOI: <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.413>

Dodd, I. C. and Pérez-Alfocea, F. Microbial amelioration of crop salinity stress. *Journal of Experimental Botany*, (2012), 63(9), 3415-3428. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/ers033>

Fageria, N.K., Baligar, V.C., Li, Y.C. The role of nutrient efficient plants in improving crop yields in the twenty first century. *J. Plant Nutr.* 2008, 31, 1121–1157. [

FAO/FAOSTAT. Food and Agriculture Data. 2018. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/es/#rankings/countries_by_commodity_exports>. Acesso em: 16 de setembro de 2019.

Filippi, M. C. C., Da Silva, G. B., Silva-Lobo, V. L., Côrtes, M. V. C., Moraes, A. J.G. and Prabhu, A. S. Leaf blast (*Magnaporthe oryzae*) suppression and growth promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil. *Biological Control*, (2011), 58(2) 160-166. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.04.016>

Flexas, J., Flexas, J., Barbour, M. M., Brendel, O., Cabrera, H. M., Carriquí, M., Diaz-Espejo, A., Gallé, A. Mesophyll diffusion conductance to CO₂: An unappreciated central player in photosynthesis. *Plant Science*, (2012), v. 193–194, p. 70–84. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.05.009>

Fukushima, T., Allred, B. E., Sia, A.K., Nichiporuk, R., Andersen, U.N. and Raymond, K. N. Gram positive siderophore-shuttle with iron-exchange from Fe-siderophore to apo-siderophore by *Bacillus cereus* YxeB. *Proc Natl Acad Sci*, (2013), USA 110: 13821–13826. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1304235110>

Gamez, R., Cardinale, M., Montes, M., Ramirez, S., Schnell, S. and Rodriguez, F. Screening, plant growth promotion and root colonization pattern of two rhizobacteria (*Pseudomonas fluorescens* Ps006 and *Bacillus amyloliquefaciens* Bs006) on banana cv. Williams (*Musa acuminata* Colla). *Microbiol Res*, (2018), Nov 23. Mar; 220:12-20. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.11.006>.

Gange, A. C and Gadhave, K. R. Plant growth-promoting rhizobacteria promote plant size inequality. *Scientific reports*, (2018), 8. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-01832111-z>.

George, P., Gupta, A., Gopal, M., Thomas, L. and Thomas, G. V. Systematic Screening Strategies for Identifying Elite Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Coconut (*Cocos nucifera* L.). *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* (2018), 7(5) 1051-1074. DOI: <https://doi.org/10.20546/ijemas.2018.705.130>

Glick ,B .R., Patten, C. L., Holguin, G. and Penrose, D. M. Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth Promoting Bacteria. Imperial College Press London. (1999). DOI: <https://doi.org/10.1142/p130>

Glick, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications *Scientifica*. (2012):1–15 DOI: <http://dx.doi.org/10.6064/2012/963401>

Good A. G. and Beatty P. H. Fertilizing nature: a tragedy of excess in the commons. *PLoS Biol*, (2011). 9(8). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001124>.

Gordon, S. A. and Weber, R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant physiology*, (1951), 26 (1) 192–195. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.26.1.192>

Gutiérrez-Mañero, F. J., Ramos-Solano, B., Probanza, A. N., Mehouchi, J. R., Tadeo, F. and Talon, M. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum* (2001), 111(2) 206-211. DOI: <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1110211.x>

Gyaneshwa, P., Kumar, G. N., Parekh, L. and Poole, P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and soil*, (2002), 245(1) 83-93. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1020663916259>

Hider, R. C. and Kong, X. Chemistry and biology of siderophores. *Nat Prod Rep.* (2010), 27:637–657. <https://doi.org/10.1039/b906679a>

IBGE-Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores. Disponível em: <<<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistematico-da-producao-agricola.html?&t=resultado>>>. Acesso em: 10 jul. 2019.

Johri, B. N., Sharma, A. and Viridi, J. S. Rhizobacterial diversity in India and its influence on soil and plant health. In *Biotechnology in India I*, Springer, Berlin, Heidelberg (2003). (pp. 49-89). DOI: https://doi.org/10.1007/3-540-36488-9_2

Kado, C. I. and Heskett, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology* 60:969-979. 1970.

Kaur, G. and Reddy, M. S. Phosphate solubilizing rhizobacteria from an organic farm and their influence on the growth and yield of maize (*Zea mays* L.). *The Journal of general and applied microbiology*, (2013), 59(4), 295-303. DOI: <https://doi.org/10.2323/jgam.59.295>

Lamari, L. *Assess 2.0: image analysis software for plant disease quantification*. St. Paul: APS Press, 2002.

Lane, D. J. B., Pace, G. J., Olsen, D. A., Stahl, M. L., Sogin, N. and Pace, R. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1985). USA 82:6955-6959. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.82.20.6955>

Lima, J. V., Tinôco, R. S., Olivares, F. L., de Moraes, A. J. G., Chia, G. S. and da Silva, G. B. Hormonal imbalance triggered by rhizobacteria enhance nutrient use efficiency and biomass in oil palm. *Scientia Horticulturae*, (2020), 264, 109161. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109161>

Lins, P. and Viégas, I. *Adubação do coqueiro no Pará*. Embrapa Amazônia Oriental- Documentos (INFOTECA-E) (2008).

Lucangeli, C. and Bottini, R. Effects of *Azospirillum* spp on endogenous gibberellin content and growth of maize (*Zea mays* L.) treated with uniconazole. *Symbiosis* (Philadelphia Pa.) (USA) (1997).

Lucy, M., Reed, E. and Glick B R. Applications of free living plant growth promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, (2004), 86(1) 1-25. DOI: <https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000024903.10757.6e>

Lwin, K. M., Myint, M. M., Tar, T. and Aung, W. Z. M. Isolation of plant hormone (indole-3-acetic acid-IAA) producing rhizobacteria and study on their effects on maize seedling. *Engineering Journal*. (2012), 16(5) 137-144. DOI: <https://doi.org/10.4186/ej.2012.16.5.137>

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

Mariano, R. D. L. R and Silveira, E. D. *Manual de práticas em fitobacteriologia*. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco. (2005).

Mayak, S., Tirosh, T. and Glick, B. R. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress *Plant Physiol. Biochem*, (2004), 42 pp. 565-572. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.05.009>

Mogollon, J. M., Beusen, A. H. W., Van Grinsven, H. J. M, Westhoek, H. and Bouwman, A. F. Future agricultural phosphorus demand according to the shared socioeconomic pathways. *Glob Environ Chang*, (2018). 50:149–163. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2018.03.007>

Moura, J. Z., Prado, R. M., Benvindo, R. N. and Chaves, A. L. Applying boron to coconut palm plants: effects on the soil, on the plant nutritional status and on productivity boron to coconut palm trees. *Journal of soil science and plant nutrition*, (2013), 13(1), 79-85. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162013005000008>

Moustaine, M., Elkahkahi, R., Benbouazza, A., Benkirane, R., and Achbani, E. H. Effect of plant growth promoting rhizobacterial (PGPR) inoculation on growth in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and characterization for direct PGP abilities in Morocco. *International Journal of Environment Agriculture and Biotechnology (IJEAB)*, (2017), 2(2). DOI: <http://dx.doi.org/10.22161/ijeab/2.2.5>

Munné-Bosch, S., Oñate, M., Oliveira, P. G. and Garcia, Q. S. Changes in phytohormones and oxidative stress markers in buried seeds of *Vellozia alata*. *FloraMorphology Distribution Functional Ecology of Plants*, (2011), 206(8) 704-711. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.flora.2010.11.012>

Naher, U. A., Panhwar, Q. A., Othman, R., Shamshuddin, J., Ismail, M. R. and Zhou E. Proteomic study on growth promotion of PGPR inoculated aerobic rice (*Oryza sativa* L.) cultivar MR219-9. *Pak. J. Bot.* (2018), 50, 1843–1852.

Nannipieri, P., Giagnoni, L., Landi, L., Renella, G.: Role of phosphatase enzymes in soil. In *Phosphorus in action: Biological processes in soil phosphorus cycling*. *Soil biology*, 26. Edited by: Bunemann E, Oberson A, Frossard E. Heidelberg: Springer; 2011:251-244. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-642-15271-9_9

Nautiyal, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS microbiology Letters*, (1999) 170(1) 265-270. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>

Negrete-Raymond, A. C., Weder, B. and Wackett, L. P. Catabolism of arylboronic acids by *Arthrobacter nicotinovorans* strain PBA. *Appl Environ Microbiol*, (2003), 69(7):4263–4267. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.7.4263-4267.2003>

Nguyen, M. L., Spaepen, S., du Jardin. P. and Delaplace, P. Biostimulant effects of rhizobacteria on wheat growth and nutrient uptake depend on nitrogen application and plant development. *Archives of Agronomy and Soil Science*, (2019), 65(1) 58-73. DOI: <https://doi.org/10.1080/03650340.2018.1485074>

Nylander, J. A. A. MrModeltest v2. Program distributed by the author. *Evolutionary*. 575 Biology Centre, Uppsala University. (2004)

Pahari, A. and Mishra, B. B. Characterization of Siderophore producing Rhizobacteria and its effect on growth performance of different vegetables. *Int J Curr Microbiol App Sci*. (2017), 6(5):1398– 1405. DOI: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.605.152>

Paungfoo-Lonhienne C, Redding M, Pratt C, Wang W. Plant growth promoting rhizobacteria increase the efficiency of fertilisers while reducing nitrogen loss. *Journal of environmental management*, (2019), 233 337-341. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.12.052>

Piccoli, P., Lucangeli, D., Schneider, G. and Bottini, R. Hydrolysis of [1717-2H2] Gibberellin A20-Glucoside and [1717-2H2] Gibberellin A20-glucosyl ester by *Azospirillum lipoferum* cultured in a nitrogen-free biotin-based chemically-defined medium. *Plant Growth Regul*, (1997), 23 179–182. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.89.17.8045>

Rabelo, T. K, Melo, M. D. V, Loiola C M and Aragão W M. Germinação de sementes de cultivares de coqueiros. Embrapa Tabuleiros Costeiros. Comunicado Técnico (2006).

Ronquist, F., Teslenko, M., van de Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. C. and Huelsenbeck, J. P. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space *Syst. Biol.* (2012) 593 61:3:539-542.

Samaniego-Gómez, B. Y., Garruña ,R., Tun-Suárez, J. M., Kantun-Can. J., Reyes Ramírez, A. and Cervantes-Díaz, L. *Bacillus* spp. inoculation improves photosystem II efficiency and enhances photosynthesis in pepper plants. *Chilean journal of agricultural research*, (2016) 76(4) 409-416. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S071858392016000400003>

Samreen, T., Zahir, Z. A, Naveed, M. and Asghar, M. Boron tolerant phosphorus solubilizing *Bacillus* spp. MN-54 improved canola growth in alkaline calcareous soils. *International Journal of Agriculture and Biology*, (2019). 21(3), 538-546. DOI: <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.0926>

Savci, S. Investigation of effect of chemical fertilizers on environment. *Apacbee Procedia*, (2012), 1, 287-292. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.03.047>

Schwyn B, Neilands J B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry*, (1987), 160(1) 47-56. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)

Sheng, X. F., He, L. Y. Solubilization of potassium-bearing minerals by a wild-type strain of *Bacillus edaphicus* and its mutants and increased potassium uptake by wheat. Canadian journal of microbiology, (2006), 52(1), 66-72. DOI: <https://doi.org/10.1139/w05-117>

Shi, Y., Lou, K. and Li, C. Growth and photosynthetic efficiency promotion of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by endophytic bacteria. Photosynth Res. (2010), 105:5–13. Doi: <https://doi.org/732.10.1007/s11120-010-9547-7>

Siddikee, M. A., Glick, B.R., Chauhan, P.S. and Yim, W.S.T. Enhancement of growth and salt tolerance of red pepper seedlings (*Capsicum annuum* L.) by regulating stress ethylene synthesis with halotolerant bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase activity. Plant Physiol Biochem, (2011), 49:427–434. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.01.015>

Sindcoco. Boletim Conjuntural - Importações de coco ralado e de água de coco. Novembro de 2017; Novembro de 2018. Disponível em: <http://www.sindcoco.com.br>. Acesso em: 11 dez. 2018.

Staden ,R., Beal, K. F. and Bonfield, J. K. The Staden Package. Bioinform. Met. Prot. (1998).

Tabatabai, M. A. Soil enzymes. In: Weaver RW (ed) Methods of soil analysis. Part 2. Microbial and biochemical properties. SSSA book series 5. SSSA, Madison (1994).

Team, R. C. R: a Language and Environment for Statistical Computing. R Found Stat Comput Vienna, Austria (2017). Acess <<https://www.Rproject.org.>>.

Tilman, D. The greening of the green revolution. Nature (1998) 396(6708) 211.

Turan, M., Ataoglu, N. and Sahin, F. Evaluation of the capacity of phosphate solubilizing bacteria and fungi on different forms of phosphorus in liquid culture. Journal of Sustainable Agriculture (2006), 28:99–108. DOI: http://dx.doi.org/10.1300/J064v28n03_08

Vinodhini, C. C. and Deshmukh K V. An Economic Analysis of Coconut Farming in Karur District of Tamil Nadu India. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. (2017) 6(12): 1566-1573. DOI: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.612.176>.

Wang, Z.H. and Li, S.X. Chapter Three - Nitrate N loss by leaching and surface runoff in agricultural land: A global issue (2019).

WELZ, B.; SPERLING, M. Atomic Absorption Spectrometry. 2. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 1999. 941 p.

Yu, S., Teng, C., Bai, X., Liang, J., Song, T., Dong, L. and Qu, J. Optimization of siderophore production by *Bacillus* sp. PZ-1 and its potential enhancement of phytoextraction of Pb from soil. J Microbiol Biotechnol (2017), 27 (8) 1500-1512. <https://doi.org/10.4014/jmb.1705.05021>

Zhang, K., Liu, Z. and Shan, X. Physiological properties and chlorophyll biosynthesis in a Pak-choi (*Brassica rapa* L. ssp. chinensis) yellow leaf mutant, pylm. Acta Physiol Plant (2017), 39:22. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2321-5>

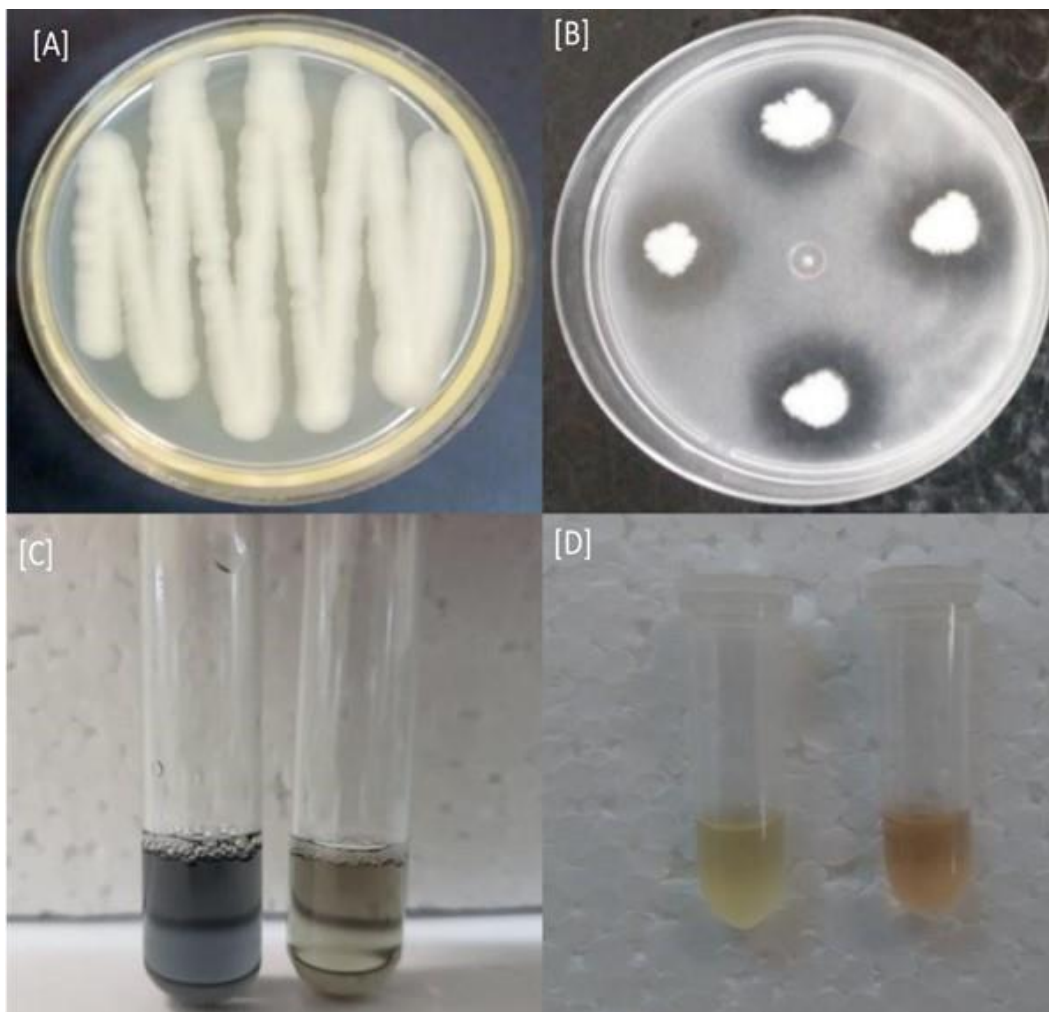
Figures

Figure 1 R40 isolate *in vitro* biochemical tests. (A) R40 isolate colony in Petri plate, (B) phosphate solubilization detection, (C) siderophore production, and (D) indole acetic acid (IAA) production.



Figure 3 Green dwarf coconut seedlings from Brazil. (A) Control coconut seedlings with 100% chemical fertilization and (B) coconut seedlings inoculated with *Bacillus cereus* and 50% chemical fertilization.

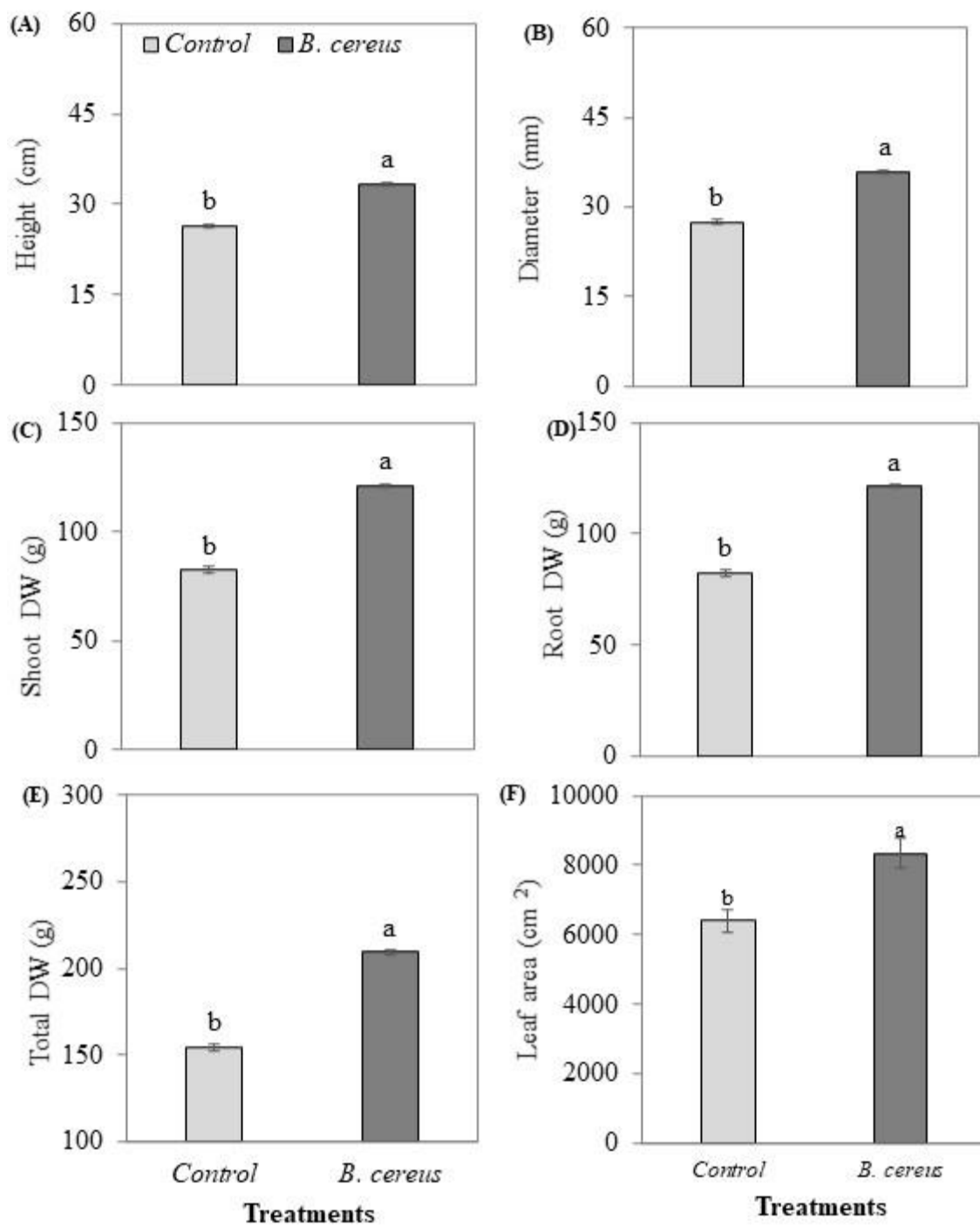


Figure 4 Biometrics of green dwarf coconut seedlings from Brazil (uninoculated and inoculated with *B. cereus*) (A) Height, (B) stem diameter, (C) shoot dry matter, (D) root dry matter, (E) total dry matter (E), and (F) leaf area in plants with 100% chemical fertilization (control) and plants inoculated with *Bacillus cereus* with 50% chemical fertilization. The same letters indicate no significant difference (*t*-test, $p < 0.05$).

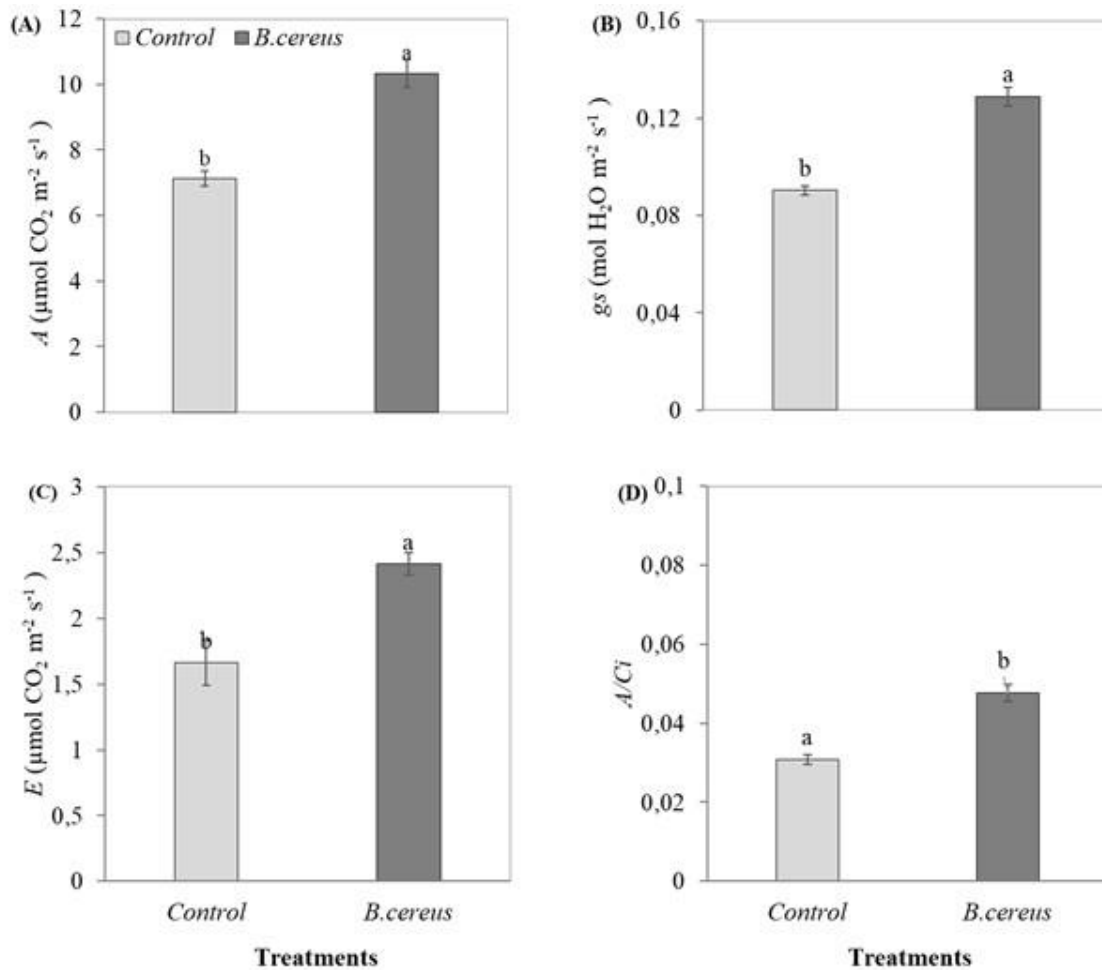


Figure 5 Leaf gas exchange in green dwarf coconut seedlings. (A) The net assimilation of CO₂ (A), (B) stomatal conductance to water vapor (g_s), (C) transpiration (E), and instantaneous carboxylation efficiency (A/C_i) in plants with 100% chemical fertilization (control) and plants inoculated with *Bacillus cereus* with 50% chemical fertilization. The same letters indicate no significant difference (t -test, $p < 0.05$).

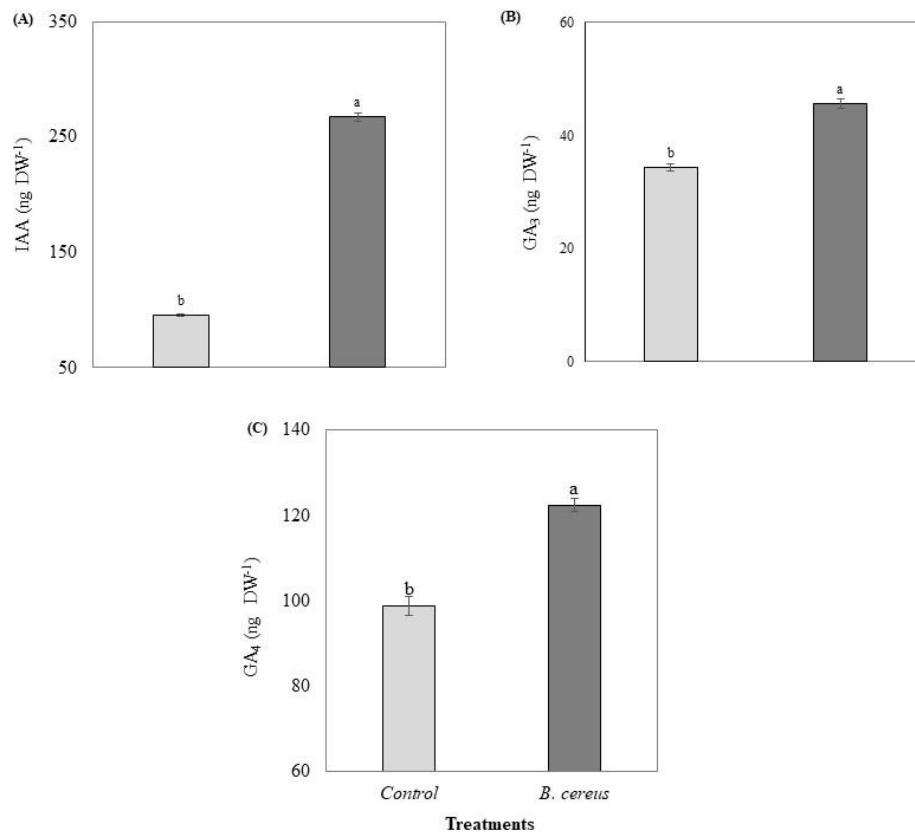


Figure 6 Phytohormone quantification in coconut seedlings. (A) Indoleacetic acid (IAA), (B) gibberellic acid GA₃, and (C) gibberellic acid GA₄ in plants with 100% chemical fertilization (control and plants inoculated with *Bacillus cereus* with 50% chemical fertilization (T2)). The same letters indicate no significant difference (*t*-test, $p < 0.05$).

Tables

Table 3 Nutritional content in the shoots of green dwarf coconut seedlings from Brazil.

Treatments	N	P	K	Ca	Fe	B
	(g/ Dry leaf weight)			(mg/ Dry leaf weight)		
Control	0.71 ^b	0.09 ^b	1.28 ^b	0.33 ^b	10.29 ^b	1.21 ^b
<i>B. cereus</i>	1.39 ^a	0.13 ^a	2.33 ^a	0.67 ^a	15.02 ^a	2.23 ^a

Control treatment (100% chemical fertilization) and inoculated with *Bacillus cereus* combined with 50% chemical fertilization. The same letters indicate no significant difference (*t*-test, $p < 0.05$).

Table 4 Nutrient use efficiency (NUE) of green dwarf coconut seedlings from Brazil.

Treatments	N	P	K	Ca	Fe	B
	NUE (g DW g ⁻¹)					
Control	8.7 ^b	0.7 ^b	2.5 ^b	107.2 ^b	27.5 ^b	19.6 ^b
<i>B. cereus</i>	25.9 ^a	2.0 ^a	7.3 ^a	320.6 ^a	82.1 ^a	56.6 ^a

-Dry weight (DW). Control treatment (100% chemical fertilization) and inoculated with *Bacillus cereus* combined with 50% chemical fertilization. The same letters indicate no significant difference (*t*-test, $p < 0.05$).

Supplementary material

Table 1 Selection of growth-promoting rhizobacteria in rice, isolated from the rhizosphere of commercially grown green dwarf coconut trees from Santa Isabel, PA, Brazil

Isolate	LA (cm)	LR	TDM (g)	Isolate	CL (cm)	RL	TDM (g)
1	35.53b	16.16d	0.10b	51	35.26b	15.33d	0.07c
2	34.16b	20.00b	0.08c	52	36.28b	15.75d	0.08c
3	34.95b	27.75b	0.09c	53	32.73b	22.56b	0.10b
4	46.03a	13.66e	0.09c	54	31.50b	20.30b	0.10b
5	32.33c	25.91b	0.11b	55	36.35b	20.06b	0.05c
6	37.45b	21.10b	0.16ab	56	31.20b	23.63b	0.13b
7	32.16b	19.33c	0.10b	57	27.90c	20.80b	0.06c
8	33.00b	14.16e	0.09c	58	32.16b	17.93d	0.08c
9	34.6b	19.5c	0.16ab	59	28.16c	18.70d	0.07c
10	32.66b	21.53b	0.07c	60	46.30a	16.60d	0.09c
11	32.06b	21.83b	0.09c	61	28.34c	11.83e	0.09c
12	36.00b	11.00e	0.09c	62	28.13c	18.23d	0.07c
13	32.86b	20.60b	0.12b	63	31.40b	27.13ab	0.09c
14	42.33a	20.00b	0.08c	64	36.20b	23.40b	0.12b
15	41.10a	15.33d	0.12b	65	27.90c	21.13b	0.13b
16	43.00a	25.00b	0.12b	66	35.06b	24.23b	0.11b
17	37.93b	18.90d	0.10b	67	25.10c	14.50e	0.06c
18	43.66a	14.66e	0.10b	68	30.90b	27.03ab	0.13b
19	40.50a	24.53b	0.10b	69	36b	27.8a	0.1b
20	41.50a	20.46b	0.09c	70	29.03bc	22.2b	0.06c
21	32.23b	23.86b	0.15b	71	27.9c	20.8b	0.06c
22	33.70b	20.56b	0.14b	72	29bc	22b	0.09c
23	33.56b	19.26c	0.12b	73	26.8c	17d	0.13b
24	34.23b	20.16b	0.08c	74	22.76c	13.90e	0.10b
25	34.56b	23.90b	0.12b	75	24.90c	13.66e	0.07c
26	35.53b	23.30b	0.14b	76	30.60b	18.26d	0.05c
27	42.83a	16.06d	0.09c	77	28.23c	20.90d	0.13b

28	38.46b	15.03d	0.08c	78	32.63b	18.43d	0.11b
29	32.7b	22.6b	0.01d	79	27.90c	19.50d	0.08c
30	37.5b	18.1d	0.07c	80	27.70c	19.03d	0.06c
31	34.4b	17.9d	0.07c	81	35.16b	25.46b	0.14b
32	36.3b	14.5e	0.08c	82	38.13b	27.83ab	0.17ab
33	35.35b	16.20d	0.07c	83	28.60c	21.53b	0.09c
34	40.76a	13.16e	0.06c	84	35.80b	21.86c	0.15b
35	39.30b	15.03d	0.12b	85	39.40b	24.63b	0.15b
36	36.83b	18.76d	0.13b	86	36.23b	16.26d	0.08 e
37	40.60a	17.23d	0.15b	87	34.70b	19.60d	0.17ab
38	34.20b	22.16b	0.15b	88	31.80b	20.33d	0.16ab
39	35.46b	23.80b	0.17ab	89	32.26b	24.61b	0.14b
40*	49.6a	28.5a	0.19a	90	31.10b	23.36b	0.12b
41	37.33b	21.66b	0.12b	91	27.90c	20.80b	0.07 e
42	45.80a	22.60b	0.13b	92	33.10b	24.54b	0.15b
43	46.23a	21.36 b	0.15b	93	38.13b	16.66d	0.17ab
44	36.20b	19.63b	0.16ab	94	39.56b	17.40d	0.12b
45	36.93b	23.40b	0.14b	95	28.23c	21.80c	0.13b
46	30.90b	21.30b	0.08c	96	36.33b	17.4d	0.12b
47	28.33c	14.83e	0.05c	Control	24.70c	17.86d	0.05 e
48	35.50b	20.63a	0.14b				
49	31.90b	16.53d	0.08c				
50	26.80c	17.06d	0.16ab				

Same letters indicate no significant difference (SNK test, $p < 0.05$). LR: root length, LA: shoot length (determined with the aid of a millimeter rule), TDM: total biomass (g / weight of dry plant). *Isolate selected as promising for promoting growth in model plants

Table 2: Identification of access and phylogenetic trees obtained by comparing the selected strain (R40) with the reference strains.

Identification	Name	Strain	Accession	Similarity
1	<i>Bacillus cereus</i>	UFRA40 - R40	MN393059.1	-
2	<i>Bacillus cereus</i>	ATCC14579 ^T	AF290547.1	100%
3	<i>Bacillus cereus</i>	BTCB20	MK118714.1	99,57%
4	<i>Bacillus cereus</i>	ST06	MF496242.1	99,79%
5	<i>Bacillus cereus</i>	NCIB 40112	AJ310100.1	99,57%
6	<i>Bacillus cereus</i>	D23	DQ923480.1	99,43%
7	<i>Bacillus mobilis</i>	MBLB1329	MK280737.1	99,42%
8	<i>Bacillus cereus</i>	FORC087	NZ_CP029454.1	99,45%
9	<i>Bacillus cereus</i>	SH62	EU374156.1	93,74%
10	<i>Bacillus cereus</i>	VLS-S-II (20)	MH475929.1	99,79%
11	<i>Bacillus cereus</i>	D62	DQ923487.1	99,79%
12	<i>Bacillus licheniformis</i>	DLSB-13	MK795391.1	99,79%
13	<i>Bacillus cereus</i>	QW08	MK760071.1	99,79%
14	<i>Bacillus cereus</i>	RJ23	KC990812.1	99,35%
15	<i>Bacillus cereus</i>	SS12	KM001604.1	98,68%
16	<i>Bacillus cereus</i>	ST307	EU350369.1	99,79%
17	<i>Bacillus megaterium</i>	S379	KY681799.1	94,51%
18	<i>Bacillus cereus</i>	CUAMS116	MN093299.1	99,79%
19	<i>Bacillus sp.</i>	BT2	LC055678.1	94,75%
20	<i>Bacillus thuringiensis</i>	ATCC10792 ^T	AF290545.1	99,79%
21	<i>Bacillus thuringiensis</i>	DNB-BT4	AM293343.1	99,57%
22	<i>Bacillus thuringiensis</i>	DAB-BT3	EU124379.1	99,43%
23	<i>B. thuringiensis</i>	DAB-BT6	AM293344.1	99,50%
24	<i>Bacillus cereus</i>	FLS H8-0482	KU198623.1	99,50%
25	<i>Bacillus cereus</i>	FSL H8-0488	KU198624.1	99,57%
26	<i>Bacillus cereus</i>	JBE0008	FJ982659.1	99,65%
27	<i>Bacillus cereus</i>	JBE0005	FJ982657.1	99,65%
28	<i>Bacillus cereus</i>	JBE0004	FJ982654.1	99,79%
29	<i>Bacillus cereus</i>	ABCFI	MN121339.1	99,79%
30	<i>Bacillus cereus</i>	kk2	JX470956.1	99,57%

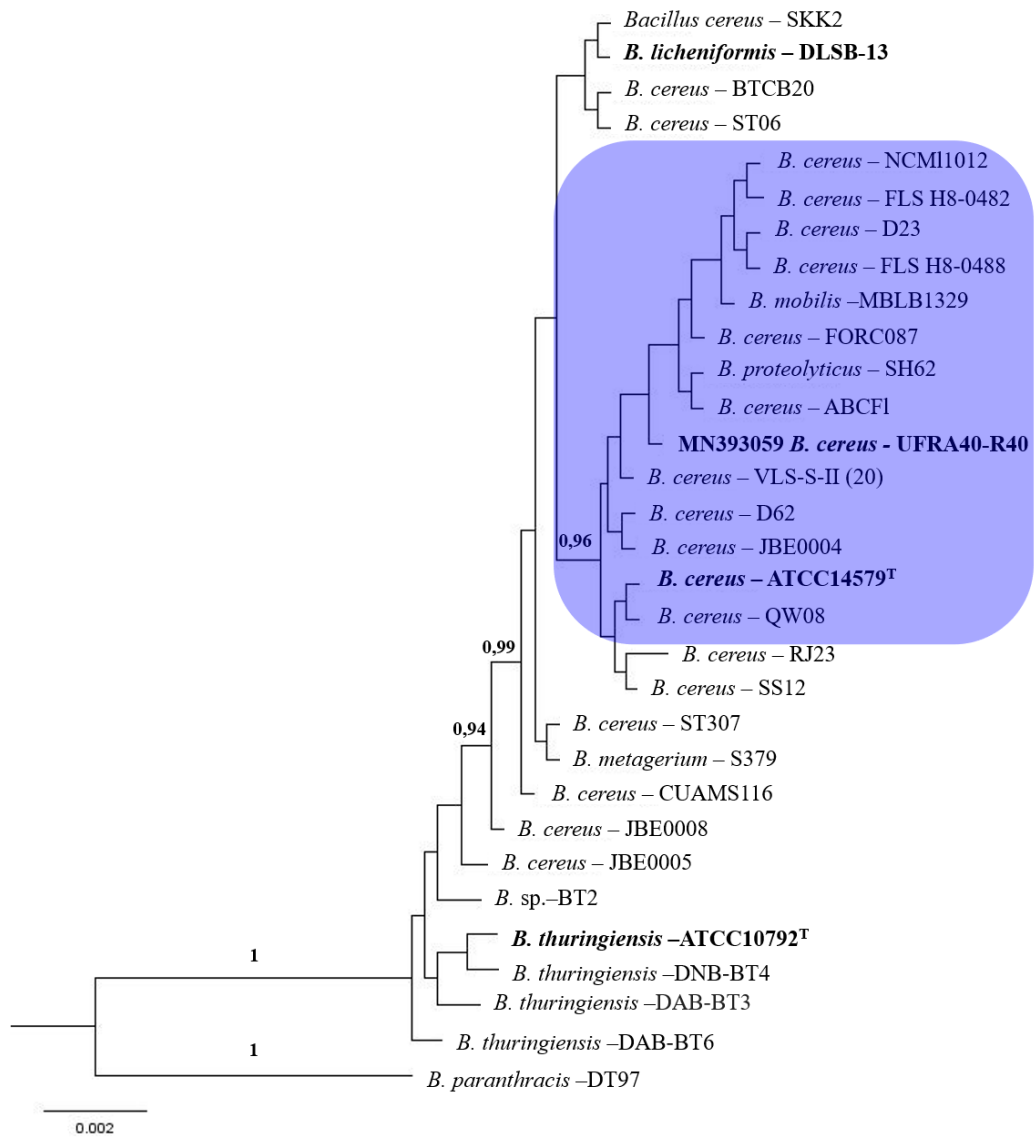


Figure 2: Phylogenetic trees analysis of R40 (UFRABC40). Major *Bacillus cereus* clades and groups are indicated comparing the selected strain with the reference strains.

Capítulo 2: Ocorrência de queima foliar em mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil na região Amazônica

Resumo

A cultura do coqueiro tem grande importância socioeconômica, sendo a fase de mudas primordial para obtenção de plantas vigorosas e produtivas. Sintomas de queima foliar em folhas de mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil foram observados em viveiro, em Santa Isabel-PA, o patógeno *Pestalotiopsis* sp. foi isolado de amostras de folhas sintomáticas, identificado com base nas análises morfológicas e filogenéticas. Foi realizado teste de patogenicidade, que confirmou *Pestalotiopsis* sp. como agente causal da queima em mudas de coqueiro na região amazônica.

Palavras-chave: *Pestalotiopsis*. *Cocos nucifera*, Amazônia.

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) possui origem asiática, é cultivado em países de clima tropical, o Brasil é quinto maior produtor, e concentra na região amazônica 11% da produção, destacando-se o estado do Pará (IBGE 2020). No cultivo de coqueiros problemas fitossanitários podem ser responsáveis por redução em qualidade e produção, dentre as quais as manchas foliares que acometem as mudas de coqueiro (Niu et al., 2014; Niu et al., 2015). A ocorrência de manchas causadas por fungos do gênero *Pestalotiopsis* é descrita em palmeiras, como palma de óleo e coqueiro (Cardoso et al., 2003; Carvalho 2013).

Em mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil em viveiro a doença ocorre naturalmente (Fig. 1A). Os sintomas da doença estudada consistiram de lesões arredondadas de bordas definidas, com coloração escura e tamanho entre 3 e 5 mm. Com a expansão das manchas foram observadas descolorações da lesão, tornando-as pardas, seguida de secamento das ráquis que apresentavam as lesões.

Foram coletadas amostras de folhas de mudas em viveiro comercial no município de Santa Isabel - PA, armazenadas em caixa contendo gelo. Em seguida, sendo levadas ao laboratório de proteção de Plantas, localizado no campus de Belém-PA na Universidade Federal Rural da Amazônia-UFRA. A partir das amostras foram retirados fragmentos (3mm) de regiões transitórias da doença, que foram lavados em água estéril, seguida da desinfestação por um minuto em álcool etílico 70% , um minuto em solução de hipoclorito de sódio a 2% e passagem em água destilada esterilizada, por 30 segundos. Os fragmentos foram adicionados a placa de Petri contendo meio de cultura de BDA (Batata, dextrose e ágar), seguido de incubação em câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 horas a 27°C. Os isolados obtidos foram purificados, a partir de cultura monospórica e incubados nas mesmas condições do isolamento. Aos seis dias de incubação, o fungo ocupou toda a placa (8x8cm) (Fig. 1C e D).

O isolado obtido em cultura pura após seis dias de crescimento, foi utilizado para preparo da suspensão de conídios, preparada com água esterilizada, na concentração de 10^3 conídios.mL⁻¹. Em casa de vegetação, foram selecionadas seis mudas sadias de coqueiro anão-verde-do-brasil, cultivadas em fibra de coco, com três meses de idade, desinfestadas, sem ferimentos. Em três mudas foi realizada a pulverização de água estéril e nas demais suspensão de conídios, em ambos tratamentos foi selecionada a primeira folha totalmente expandida. As folhas pulverizadas foram cobertas por saco de polietileno para formação de câmara úmida. A avaliação ocorreu a cada 12 horas, até as 168 horas, sendo atribuídas notas 0 (sem lesão) e 1 (lesão a partir de 2mm). Após 36 horas é possível observar cloroses pontuais ao longo do limbo foliar que a partir de 72 horas apresentam-se escurecidos formando lesões arredondadas, coloração escura e acima de 4mm. Posteriormente, foi realizada coleta de amostras com sintomas, para isolamento e confirmação do patógeno (Fig. 1B e 1C). As 168 horas os locais de lesão coalescem e apresentam um ressecamento local (Fig. 1D).

O isolado em placa de Petri, possui crescimento micelial branco e cotonoso, seus conídios medem 21 µm, são fusiforme, com cinco células, as células apical e basal são hialinas, com as três células centrais escuras (Fig. 1E e 1F). Os conídios possuem apêndices filiformes ramificados, dois a três apêndices apicais e um basal (Fig. 1G), confirmando o gênero *Pestalotiopsis* sp. como causador da de queima foliar em folhas de mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil.

Agradecimentos

Agradecemos à Universidade Federal da Amazônia e ao Laboratório de Fitossanidade pela cessão das instalações e à Fundação Amazônica de Amparo a Estudos e Pesquisas do Estado do Pará (Fapespa), e à Sococo S / A pela parceria e apoio, em especial a equipe do setor de fitopatologia

Contribuições do autor

Os autores participaram integralmente de todas as atividades do presente estudo.

Referência

Cardoso, G. D.; Barreto, A. F.; Araújo, E.; Almeida, F. A.; Carvalho, R. A. G. Etiologia e progresso da mancha de *Pestalotia* do coqueiro (*Cocos nucifera* L.), em São Gonçalo, Paraíba. Rev. Bras. Frutic. vol.25 no.2 Jaboticabal Aug. 2003.

Carvalho, E. A.; Coelho, I. L.; Tremacoldi, C. R.; Gomes Júnior, R. A. Fungos associados ao híbrido interespecífico da palma de óleo no Estado do Pará. Tropical Plant Pathology. Brasília, DF, v. 36, p. 908, 2011. Suplemento.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção agrícola municipal: Coco-da-baía, 2019. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5457>. Acesso em: 25 set 2020

Niu, X. Q; Yu, F. Y; Zhu, H; Qin, W. Q. (2014). First report of leaf spot disease in coconut seedling caused by *Bipolaris setariae* in China. Plant disease, 98(12), 1742-1742.

Niu, X. Q; Zhu, H; Yu, F. Y; Tang, Q. H; Song, W. W; Liu, L; Qin, W. Q. (2015). First report of *Pestalotiopsis menezesiana* causing leaf blight of coconut in Hainan, China. Plant Disease, 99(4), 554.

Lista de figuras

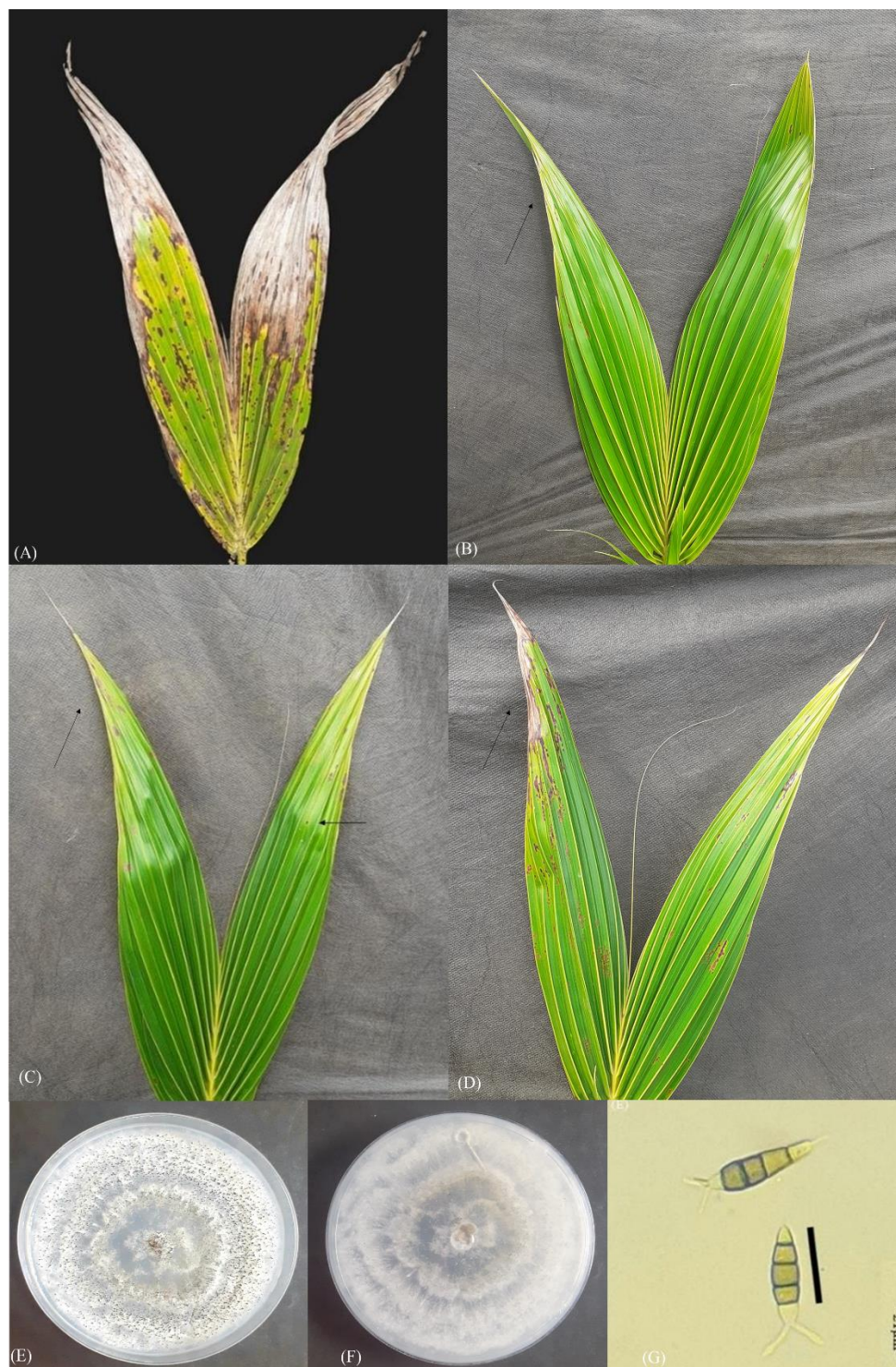


Fig 1. Infecção natural de *Pestalotiopsis* sp. (A), infecção após teste de patogenicidade (B) 72 horas inoculação, infecção após teste de patogenicidade (C) 120 horas inoculação, infecção após teste de patogenicidade (D) 168 horas inoculação, Colônia em meio BDA-frente (E); Colônia em meio BDA-verso (F) e Conídios maduros de *Pestalotiopsis* sp. (barra = 21 μ m) (G).

Capítulo 3: Validation of diagrammatic scale for leaf sopt caused by *Pestalotiopsis* sp. in coconut seedlings

Abstract

The absence of a methodology to quantify *Pestalotiopsis* sp. in coconut plants (*Cocos nucifera* L.) justified the elaboration and validation of a diagrammatic scale containing seven values (2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 40% and 60%) of disease severity, in a sampling under natural conditions of occurrence in the field. To elaborate the diagrammatic scale, 100 leaves of *Cocos nucifera* L. were obtained from an experimental field of Fazenda Reunidas Sococo in Santa Isabel, Pará. The images of these leaves were obtained with the aid of a digital camera. Subsequently, with the aid of Assess 2.0 APS software, the actual disease severity values were obtained in percentage terms. The validation of the proposed diagrammatic scale was performed by ten inexperienced evaluators who evaluated the projected images without the aid of the suggested scale, and later, with the aid of the scale. From the data obtained from the evaluators with and without scale, linear regression analysis was performed, relating the real severity and the estimated severity. The accuracy of the estimates was evaluated by the regression determination coefficient (R^2) and the variance of the absolute errors. The accuracy of each evaluator was determined by the t-test applied to the angular coefficient of line (b) and the linear coefficient of line (a), both obtained by linear regression. Through the coefficient of determination values, It is possible to verify that the use of the scale gave greater accuracy to 100% of the evaluators with an average of 0.94 and 94% repeatability. The use of the diagrammatic spot scale for *Pestalotiopsis* sp. it enables future work with accuracy and precision, as well as optimizing disease control practices within a coconut tree nursery management program.

Key-words: *Cocos nucifera*, Pathometry, Disease.

1.Introduction

Coconut palm (*Cocos nucifera* L.) is considered a rustic plant, grown in several countries, being the largest producers Indonesia, Philippines, India and Brazil. Brazil is the fourth largest producer, highlighting the states of Bahia (30, 3%), Sergipe (13.2%), Pará (11%) and Ceará (10.4%) with their respective contributions to national production. The state of Pará is the third national producer, with production of 197,387 thousand fruits (IBGE, 2017).

Coconut cultivation has significant importance in the contribution of the Brazilian economy, through the generation of jobs along its entire production chain to industry (CUENCA, 2001). One of the main advantages in its cultivation is that it can be originated several products of high economic value focused on food, cosmetics, crafts and others (SIQUEIRA, 2002). In the coconut production system there are factors that can hinder its development, we highlight the phytosanitary responsible for damage and

significant economic loss (WARWICK, 1989). Leaf spotting occurs mainly in adult plants, such as leaf burning caused by *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) (Griffo; Maubl), small sandpaper caused by *Phyllachora torrendiella* (Batista) Subileau, and large sandpaper whose etiological agent is *Sphaerodothis acrocomiae* (Montagne) von Arx; Muller (WARWICK; LEAL, 2002).

In the production of seedlings we highlight the leaf spots caused by the fungus *Pestalotiopsis* sp., This genus can have three central cells of dark color and two cells of the light colored extremities and can have simple or branched appendages in the apical cell and a simple appendix in the basal cell (KARAKAYA, 2001).

In the leaves, symptoms are evident in the form of rounded elliptic lesions with defined edges, dark in color and between 3 and 5mm in size. With the expansion, the lesions showed reddish brown discolourations and, subsequently, the drying of the rachis areas (CARDOSO et al., 2003).

For leaf disease severity studies, one of the proposed tools is the use of a diagrammatic scale, which consists of illustrated representations of parts of a plant with symptoms at different levels of severity (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1996). The use of scale may result in a better understanding of epidemiological studies and may propose effective control strategies giving subsidies for quantification (HALFELD-VIEIRA; NECHET, 2006; TROJAN; PRIA, 2018). The climatic conditions of the Amazon region, with temperatures high and high relative air units may favor the evolution of disease symptoms, resulting in the need to obtain tools that support the management of this disease. The diagrammatic scale assists in decision making (MORAES et al., 2011).

The objective was to elaborate and validate a diagrammatic scale to estimate the severity of *Pestalotiopsis* sp. in leaves of coconut palm seedlings to standardize the assessment of disease severity.

2.Methods

Location and sample collection

The experiment was conducted at the Reunidas Sococo farm located in Santa Izabel - PA (1 ° 13'26 "S and 48 ° 02'29" W), in partnership with the plant protection

laboratory of the Federal Rural University of Amazonia. -UFRA (1 ° 27 '31 "S and 48 ° 26' 04.5" O).

One hundred leaves of coconut seedlings were collected, with different values of area affected by leaf spots, randomly (Figure 2). These sheets were taken to the laboratory, where they were selected and photographed. Then, each leaf was analyzed according to the injured area, using the Assess 2.0 APS program (LAMARI, 2008), where the actual disease severity values were obtained in percentage terms. From this, the coconut leaves with the lowest number of lesions and the highest number were determined, thus establishing the lower and upper limits of the diagrammatic scale, respectively. Intermediate levels of the scale must respect the limitations of human visual acuity defined by the Weber-Fechner stimulus-response law, in which visual acuity is proportional to the stimulus intensity logarithm (HORSFALL; COWLING, 1978). From the values obtained, the diagrammatic scale was established (MARTINS et al., 2004).

Scale Validation

For the scale to be validated, leaf images with different values of affected area were presented to different evaluators. In the first phase, 10 inexperienced evaluators evaluated the projected images without the aid of the suggested scale, in the second phase inexperienced evaluators evaluated the images with the aid of the scale. The data estimated by the evaluators were tabulated and subsequently compared with the actual severity data obtained with the aid of the Assess 2.0 program.

From the data obtained from the evaluators with and without scale, linear regression analysis was performed, considering the real severity as an independent variable and the estimated severity as the dependent variable. The accuracy of the estimates will be assessed by the regression determination coefficient (R^2) and the variance of the absolute errors (estimated severity minus actual severity). The accuracy of each evaluator will be determined by the t-test applied to the angular coefficient of line (b) and the linear coefficient of line (a), both obtained by linear regression (real severity x estimated severity) (MARTINS et al., 2004; LAMARI, 2008).

3. Results and Discussion

The minimum and maximum values of *Pestalotiopsis* sp. found in the samples were 2% and 60% respectively (Figure 3). The scale was developed with seven severity

values to represent the highest frequency ranges according to the values found in the field. Symptom representation includes only necrotic tissue or chlorotic spots. Symptoms are observed in fully expanded leaves, with the occurrence of brown spots on the edge of the leaf, which, when the disease progresses in the tissue, is blackened without a certain shape, with rounded shape defined. In the elaborated diagrammatic scale the values that corresponded to the necrotic leaf area were 2, 5, 10, 15, 20, 40 and 60% (Figure 1).

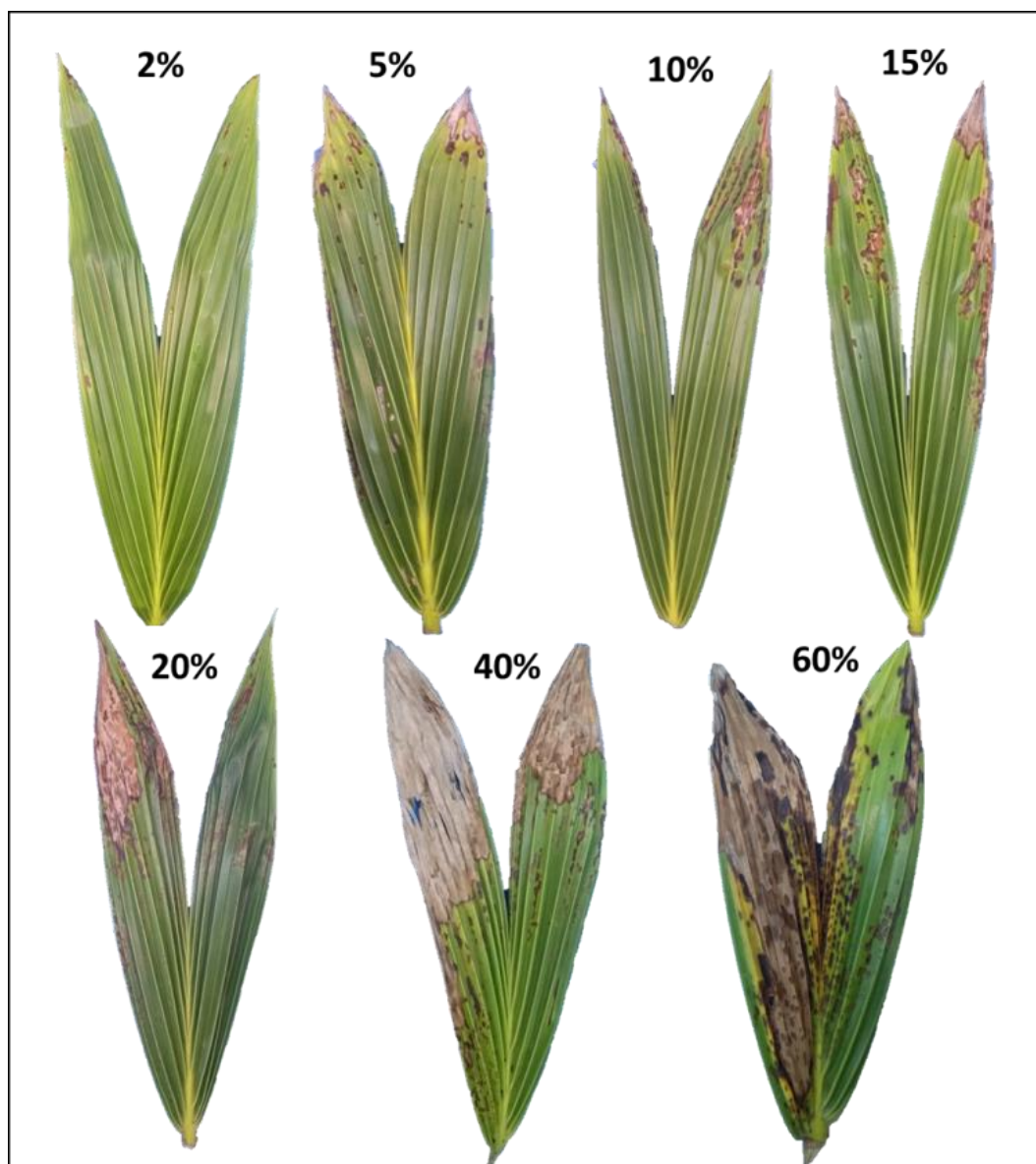


Figure 1. Diagrammatic scale for spot on leaves of coconut palm seedlings caused by *Pestalotiopsis* sp. according to the Assess 2.0 program, Santa Isabel – PA.

Accuracy is defined as the accuracy of a systematic error-free measurement (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1996), evaluating the angular coefficient (b) and

intercept of linear regression (a) between actual and estimated severity, and it is expected that the slope. The linear regression between real and estimated values must be equal to 1, without systematic deviations, and the intercept must be equal to 0 (NUTTER et al, 1993).

When the severity of leaf spot caused by *Pestalotiopsis* sp. in coconut palm seedlings was estimated without the aid of the scale, seven evaluators were poorly accurate, and the evaluators 1, 2, 5, 6, 7 and 8 presented intercept values significantly different from zero ($p \leq 0.01$) and Evaluator 9 presented an angular coefficient significantly different from 1 (P 0.01) (Table 1).

For the validation of diagrammatic scales it is reported that there is a tendency to overestimate values, which may have occurred with non-scale evaluators (SPÓSITO et al., 2004; HALFELD-VIEIRA; NECHET, 2006), this fact is proven. when the evaluators used the proposed scale, because the values of the intercept (a) did not differ from zero and neither did the angular coefficient values differ from 1 for any of the evaluators ($P \leq 0.01$).

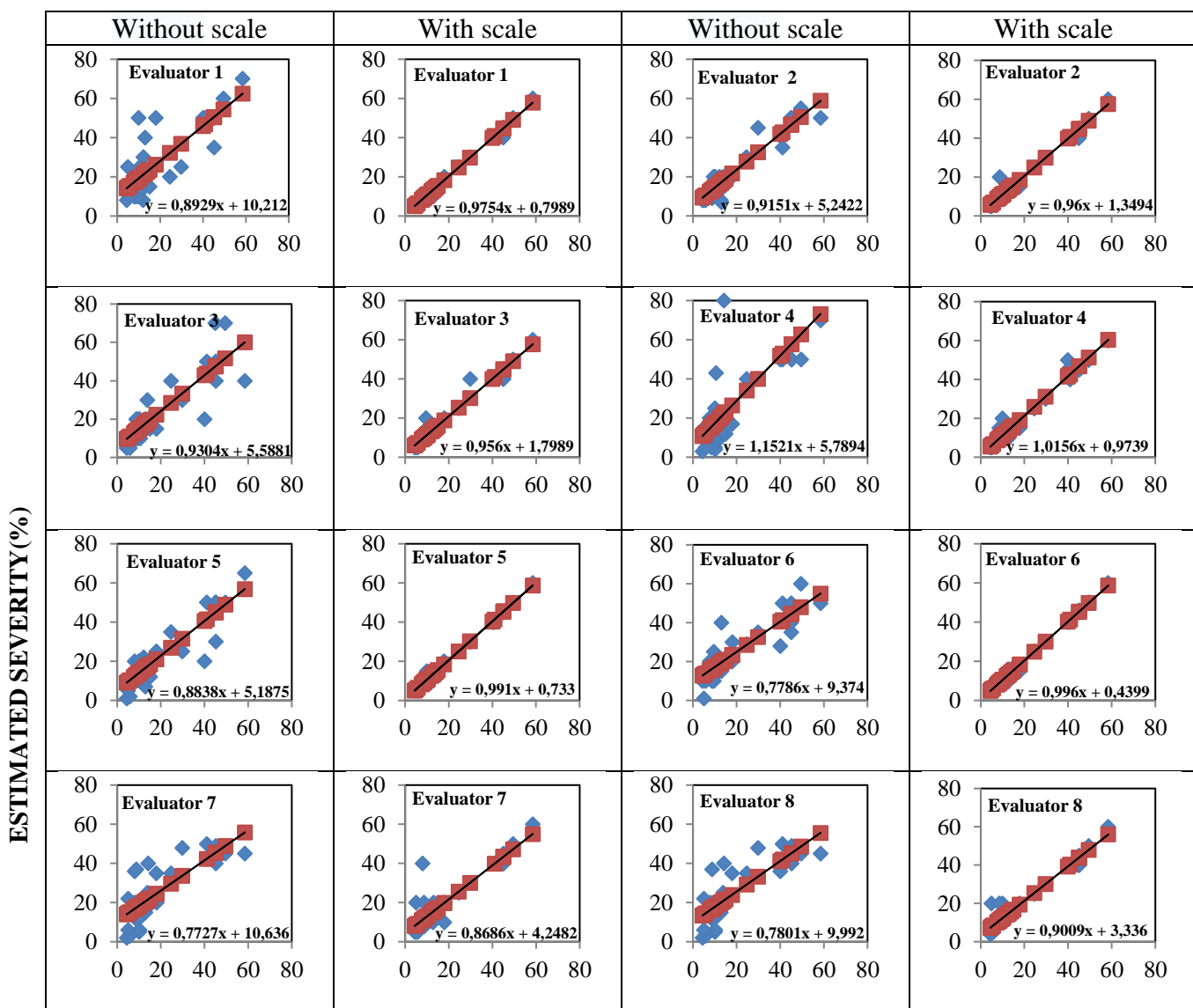
Table 1. Intercept (a), angular coefficient (b) and coefficient of determination (R^2) of the linear regressions between the severity obtained between the actual and the proposed estimated severity of the different evaluators without the aid of scale and the aid of scale.

Evaluator	Without			With			
	a	b	R^2	Evaluator	a	b	R^2
1	10,21*	0,89	0,65	1	0,79	0,97*	0,99
2	5,24*	0,91	0,89	2	1,34	0,96*	0,97
3	5,58	0,93	0,72	3	1,79	0,95	0,96
4	5,78	1,15	0,59	4	0,97	1,01	0,96
5	5,18*	0,88	0,79	5	0,73	0,99	0,99
6	9,37*	0,77	0,76	6	0,54	0,96	0,99
7	10,63*	0,77	0,63	7	4,24	0,86	0,80
8	9,99*	0,78	0,68	8	3,33	0,90	0,93
9	1,37	0,73*	0,73	9	1,87	0,86	0,88
10	10,28	1,00	0,39	10	0,54	0,96*	0,97
Average	7,36	0,88	0,68		1,61	0,94	0,94

*situations in which the null hypothesis ($a = 0$ or $b = 1$) was rejected by the t test ($P < 0.01$).

The accuracy of a proposed disease quantification scale is defined as the accuracy of an operation where the measurement is accurate or refined, and can be assessed by regression determination coefficient (R^2), acceptable values close to 1, and

by variation of absolute errors, obtained by the difference between estimated and real severities (NUTTER JUNIOR; SCHULTZ, 1995; BERGAMIN FILHO; AMORIM, 1996). In the present study it was found that without the use of the scale the determination coefficients obtained by the evaluators ranged from 0.39 to 0.89 with an average of 0.68, and with the use of the scale the determination coefficients ranged from 0.80 to 0.99 with an average of 0.94 (Table 1). Through the coefficient of determination values, it is possible to verify that the use of the scale gave greater accuracy to all evaluators (Figure 2). Some authors recommend training with evaluators to reduce disease overestimation, as human visual acuity detects more diseased tissue than healthy tissue (HOSFALL; BARRATT, 1945).



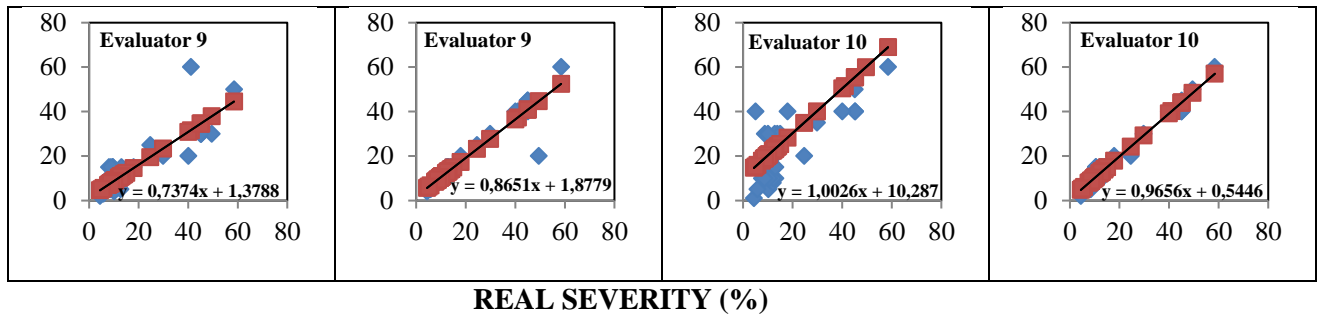


Figure 2. Estimated severity of leaf spots caused by *Pestalotiopsis* sp. in coconut palm seedlings by 10 inexperienced evaluators without and as a help of the scale and regression equations obtained between the real severity (red full points) and the estimated severity (blue full points)

Absolute errors, the difference between estimated and actual severity absolute values, show that there was a reduction with the proposed scale. The absolute error without scale ranged from -14.59 to 29.66%, and using the scale ranged from -6.59 to 9.13% (Figure 3). Scale error values are considered to be within acceptable standards - 10% and + 10% for disease assessment (TOMERLIN; HOWELL, 1988; NUTTER JUNIOR; WORAWITLIKIT, 1989).

From the analyzes it was verified good repeatability of the estimates, where the average amount of variation of the non-scaled evaluators is explained by the scaled evaluation in 94%. In three raters, the angular coefficient was significantly different from 1 ($p < 0.01$) (Table 1). Similar results were found on the scale for *Cercospora patches* in watermelon, with an estimated severity of 96% on average (HALFELD-VIEIRA; NECHET, 2006).

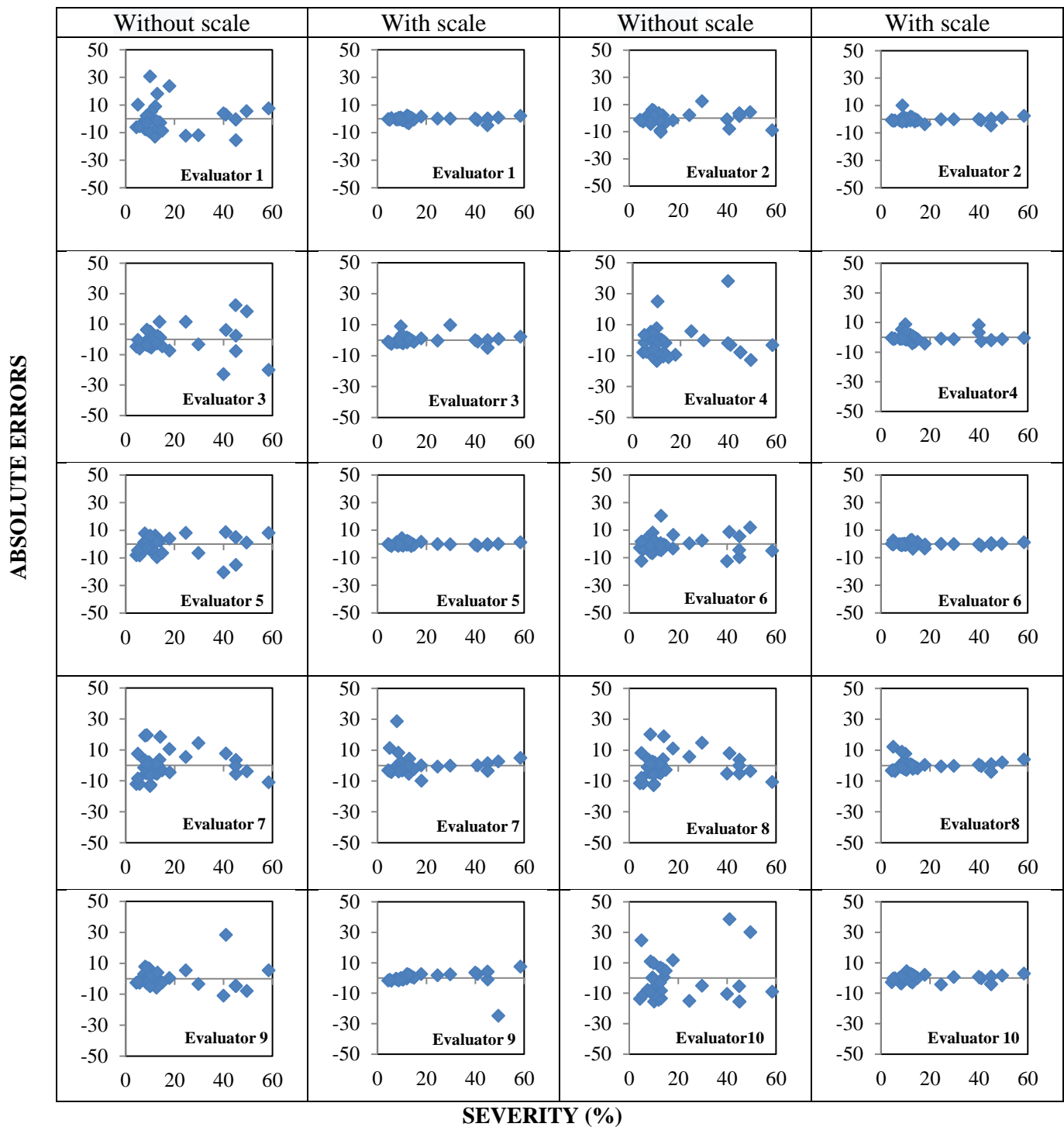


Figure 3. Absolute errors (estimated severity minus actual severity) for 10 raters without and with the aid of leaf spot scale caused by *Pestalotiopsis* sp. in coconut palm seedlings.

Conclusion

The accuracy, precision and reproducibility levels of *Pestalotiopsis* sp. spot severity measurements in Brazilian dwarf coconut palms improve with the use of the

proposed diagrammatic scale, which proves to be a useful tool for severity assessments. The diagrammatic scale allows decision making and optimization of coconut tree nursery management program.

Acknowledgment

We acknowledge the Federal Rural University of Amazonia and the Plant Protection Laboratory for the structure provided, and for the partnership and financial support from FAPESPA and Sococo S/A.

References

Bergamin Filho, A., & Amorim, L. (1996). Doenças de plantas tropicais: epidemiologia e controle econômico.

Cardoso, G. D., Barreto, A. F., Araújo, E., Almeida, F. A. D., & Carvalho, R. A. G. D. (2003). Etiologia e progresso da mancha de *Pestalotia* do coqueiro (*Cocos nucifera* L.), em São Gonçalo, Paraíba. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 25(2). <https://doi.org/10.1590/S0100-29452003000200039>

Cuenca, M. A. G. (2001). Aspectos econômicos da cocoicultura. In: Manual do Produtor do Coco. Brasília: EMBRAPA-SPI.

Halfeld-Vieira, B. A., & Nechet, K. L. (2006). Elaboração e validação de escala diagramática para avaliação da mancha-de-cercospora em melancia. *Fitopatologia Brasileira*, 31(1), 46-50. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582006000100008>

Horsfall, J. G. (1945). An improved grading system for measuring plant diseases. *Phytopathology*, 35, 655.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2017). Levantamento sistemático da produção agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. *Levant. Sistem. Prod. Agríc.*, 24(5).

Karakaya, A. (2001). First report of infection of kiwifruit by *Pestalotiopsis* sp. in Turkey. *Plant disease*, 85(9), 1028-1028. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.9.1028C>

Lamari, L. (2008). Assess 2.0 [recurso electrónico]: image analysis software for plant disease quantification (No. 632.3 L215a). APS Press., <https://doi.org/10.1094/AssessHelp>

Martins, M. C., Guerzoni, R. A., Cámara, G. D. S., Mattiazzi, P., Lourenço, S. A., & Amorim, L. (2004). Escala diagramática para a quantificação do complexo de doenças

foliares de final de ciclo em soja. *Fitopatologia Brasileira*, 29(2), 179-184. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582004000200009>

Moraes, W. B., de Jesus Junior, W. C., Belan, L. L., de Azevedo Peixoto, L., Moraes, W. B., & Cecílio, R. A. (2011). Mudanças climáticas e seus potenciais impactos sobre os métodos de manejo de doenças de planta. *Nucleus*, 8(1), 1-22. <https://doi.org/10.3738/1982.2278.555>

Nutter Jr, F. W., & Schultz, P. M. (1995). Improving the accuracy and precision of disease assessments: selection of methods and use of computer-aided training programs. *Canadian Journal of plant pathology*, 17(2), 174-184. <https://doi.org/10.1080/0706069509500709>

Nutter Jr, F. W., & Worawitlikit, O. (1989). Disease. Pro: a computer program for evaluating and improving a person ability to assess disease proportion. *Phytopathology*, 79(111), e135. <https://doi.org/10.1094/Phyto-79-958>

Nutter Jr, F. W., Gleason, M. L., Jenco, J. H., & Christians, N. C. (1993). Assessing the accuracy, intra-rater repeatability, and inter-rater reliability of disease assessment systems. *Phytopathology*, 83(8), 806-812. <https://doi.org/10.1094/Phyto-83-806>

Siqueira, L. A. S. (2002). A introdução do coqueiro no Brasil: importância histórica e agrônômica. Embrapa Tabuleiros Costeiros.

Spósito, M. B., Amorim, L., Belasque Jr, J., Bassanezi, R. B., & Aquino, R. D. (2004). Elaboração e validação de escala diagramática para avaliação da severidade da mancha preta em frutos cítricos. *Fitopatologia Brasileira*, 29(1), 81-85. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582004000100012>

Tomerlin, J. R., & Howell, T. A. (1988). DISTRAIN: a computer program for training people to estimate disease severity on cereal leaves. *Plant Disease*, 72(5), 455-459.

Trojan, D. G., & Pria, M. D. (2018). Validation of a diagrammatic scale to quantify the severity of corn leaf anthracnose. *Summa Phytopathologica*, 44(1), 56-64. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/172675>

Warwick, D. R. N. (1989). Principais doenças do coqueiro (*Cocos nucifera* L.) no Brasil. Embrapa Tabuleiros Costeiros-Documents (INFOTECA-E).

Warwick, D. R. N., & Leal, E.C. (2002). Doenças e métodos de controle In: Fontes, H. R. F., Ferreira, J. M. S., & Siqueira, L. A. Sistema de produção para a cultura do coqueiro. Aracaju-SE: Embrapa Tabuleiros Costeiros.

Capítulo 4: *Bacillus cereus* protege o aparato fotossintético e reduz a severidade da queima foliar (*Pestalotiopsis* sp.) em mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil

Resumo

Os problemas fitossanitários de mudas de coqueiro abrangem a ação de fungos fitopatogênicos que causam redução de área foliar sadia e fotossinteticamente ativas. A adoção de microrganismos benéficos para minimizar efeitos negativos da ação de patógenos nas plantas, tem se mostrado uma importante ferramenta. O objetivo deste estudo, foi avaliar os efeitos da inoculação de *Bacillus cereus* sobre o aparato fotossintético de mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil com sintomas naturais de queima foliar em viveiro. Dois tratamentos foram realizados: plantas controle e plantas com inoculação de *Bacillus cereus*, com cinco repetições cada. Foram avaliados severidade (%), trocas gasosas, fluorescência da clorofila a, concentração de clorofilas a, b e a+ab. Os resultados evidenciam que mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil, inoculadas com *B. cereus* reduzem a severidade de queima foliar causada por *Pestalotiopsis* sp., aumentam a taxa líquida de assimilação de CO₂ (*A*), condutância estomática ao vapor de água (*gs*), taxa de transpiração (*E*), eficiência de carboxilação (*A/Ci*) e área foliar e, reduziram a concentração de CO₂ intercelular (*Ci*) a partir de três meses de idade. Após quatro meses de idade, mudas inoculadas com *B. cereus* também aumentam a eficiência fotoquímica (máxima razão de eficiência fotoquímica (*Fv/Fm*), eficiência fotoquímica efetiva do PSII (*Fv'/Fm'*), coeficiente de extinção fotoquímico (*qp*), taxa de transferência de elétrons (*ETR*), rendimento quântico de dissipação de energia regulada [*Y (NPQ)*]), e ao completarem seis meses foi detectado maior teor de clorofila. Os resultados deste estudo sugerem que a inoculação precoce de *B. cereus* em mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil protege e otimiza a eficiência do processo fotossintético, devido aos estímulos etapa bioquímica e dos componentes da etapa fotoquímica, que resultam em expansão foliar e redução dos sintomas de queima foliar.

Key-words: Fotossíntese, PGPR, mudas de coqueiro.

1 Introdução

Em mudas de coqueiro são descritas algumas doenças foliares causada por fungos fitopatogênicos, como *Bipolaris setariae* e *Curvularia oryzae* (Niu et al., 2014; Xu et al., 2020) e *Pestalotiopsis palmarum* (Niu et al., 2015). No Brasil há registro de *Pestalotiopsis guepinii* causando mancha em mudas de coqueiro híbrido (Cardoso et al., 2003), e *Pestalotiopsis* sp. em mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil no estado do Pará-Brasil (Cardoso et al., 2019). O gênero *Pestalotiopsis* é um grupo heterogêneo dos fungos Coelomycetes (Liu et al., 2018). Seus conidióforos são produzidos dentro de um corpo de frutificação compacto, o acérvulo, e os conídios são fusiformes, em geral apresentam

cinco células com dois ou mais apêndices apicais (sétulas) (Jeewon *et al.*, 2002; Maharachchikumbura *et al.*, 2014).

A infecção causada por fungos do gênero *Pestalotiopsis* pode ocorrer após 96 horas do contato com o hospedeiro, a adesão inicial do conídio na superfície do hospedeiro ocorre a partir dos apêndices, em decorrência de liberação da matriz extracelular, e a penetração pode ocorrer com a produção de tubos germinativos que diretamente penetram na cutícula (Gevens *et al.*, 2001), suas hifas crescem intracelularmente no parênquima lacunoso e também através de elementos traqueares (Rodrigues *et al.*, 2014). Outra forma de penetração ocorre através de aberturas naturais, como os estômatos, fungos patogênicos através de suas estruturas causam comprometimento dos estômatos o que resulta em em perdas associadas a fotossíntese (Zeng *et al.*, 2010). Em resposta a invasão dos tecidos a planta tende a fechar os estômatos, o que reduz a difusão de CO₂, influenciando diretamente na atividade da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase (RuBisCo), que catalisa a principal etapa de fixação de carbono (Pinkard e Mohammed, 2006).

Patógenos foliares em outros estudos estão associados a alterações negativas sobre fluorescência da clorofila *a*, Castro *et al.*, (2017), afirmam que o aumento no número de lesões está associado a redução da eficiência fotoquímica em mudas de açaí desafiada por *Colletotrichum*. Estudo com milho aponta que a infecção por *Fusarium verticillioides* o que tornou possível a identificação de problemas no aparato fotossintético a partir da avaliação do fotossistema (Baghbani *et al.*, 2019). Vitorino *et al.*, (2020), confirmam a importância de o uso da fluorescência da clorofila para o diagnóstico de doenças e a eficiência do uso de *Bacillus cereus* como remediador dos efeitos negativos causados por *Sclerotinia sclerotiorum* é um fungo causa a podridão do caule em soja.

No presente estudo, foi avaliado as limitações bioquímicas e fotoquímicas do processo fotossintético em mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil infectadas naturalmente por *Pestalotiopsis* sp. e tratadas com *Bacillus cereus* (UFRABC40), durante a fase de viveiro.

2 Material e métodos

Local do experimento

O experimento foi conduzido em condições de viveiro no município de Santa Isabel do Pará-Brazil (1°13'26" S and 48°02'29" W), que apresenta clima do tipo Af1 de acordo com a classificação de Koppen-Geiger (SEMA, 2017).

Preparo de plântula de coqueiro

Em viveiro de mudas de coqueiro, as sementes foram semeadas em caixas de madeira (30 cm de altura, dois metros de largura e 10 metros de comprimento) contendo fibra de coco, e umedecidas diariamente por 90 dias. A caracterização química do substrato de fibra de coco (Golden-Mix tipo 4-amafibra) foi a seguinte: 0,086 g/kg⁻¹ nitrogênio (N); 0,264 g kg⁻¹ fósforo (P); 0,580 g kg⁻¹ potássio (K); 0,128 mg kg⁻¹ cálcio(Ca); 0,447 mg kg⁻¹ magnésio (MgO); 42,25mg sódio (Na); 0,703 mg L⁻¹ Boro (B); 0,12 g kg⁻¹ cobre (Cu); 0,5 mg kg⁻¹ ferro (Fe); 0,6 mg kg⁻¹ manganês (Mn); 0,78 mg kg⁻¹ zinco (Zn) and 92,43% matéria orgânica (OM).

Preparo das mudas de coqueiro

A plântulas com 15 cm de altura e duas folhas foram transferidas para sacos de polietileno (40 x 40 x 40 cm), contendo 7,5 kg de fibra de coco cada, com 50% de umidade. Segundo Lins e Viegas (2008), a recomendação de fertilização química de mudas de coqueiro segue: após 30 dias do transplantio (DAT) as mudas recebem 3 g ureia, 40g superfosfato simples-SFS (18% P₂O₅), 10 g cloreto de potássio-KCL (60% K₂O), 5g óxido de magnésio-MgO (30 % Mg) e aos 90 DAT as mudas receberam (6 g Ureia, 80g SFS (18% P₂O₅), 20g KCL (60% K₂O), 10 g MgO (30 % Mg). A irrigação foi realizada diariamente por aspersores para repor a água evapotranspirada, 7 mm d⁻¹ (7 L m⁻²) (Fontes et al., 1989).

Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições e dois tratamentos constituídos: Controle com 100% da fertilização química recomendada (CF) e tratamento com inoculação de suspensão do isolado *Bacillus cereus* (10⁸ u.f.c) com 50% fertilização química recomendada.

Obtenção e preparo da suspensão de *Bacillus cereus*

O isolado de *B. cereus* foi obtido de área de plantio comercial de coqueiro anão-verde-do-brasil, e está armazenado em um banco de microrganismos do Laboratório de Proteção de Plantas da Universidade Federal Rural da Amazônia. A sequência foi depositada no Genbank como UFRABC40 com o número de acesso MN393059.

O isolado de *B. cereus* foi crescido em meio líquido 523 (Kado e Heskett, 1970) e submetido a agitação (114 rpm) por 24 horas a 28°C. A concentração foi ajustada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm, correspondendo a 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC) (Filippi et al., 2011). A inoculação das mudas do tratamento com *B. cereus* ocorreu em meses alternados a fertilização química, para menor interferência sobre a ação do microrganismo, foi realizada aplicando 300 mL/planta da suspensão via rega aos 60 e 120 DAT.

Avaliações

A queima foliar causada por *Pestalotiopsis* sp. ocorre naturalmente no viveiro, as avaliações ocorreram mensalmente longo de seis meses. Foram avaliados: severidade da doença (%), área foliar, trocas gasosas e fluorescência da clorofila a. O conteúdo de clorofila avaliado com auxílio do SPAD-502 (Soil Plant Analysis Development) e o teor de clorofilas foram estimadas aos seis meses de idade.

Severidade da doença (%)

Para severidade foram avaliadas folhas das mudas de coqueiro, individualmente, por meio de uma escala de notas de acordo com Cardoso et al., (2019). A área foliar foi determinada por meio da digitalização das imagens das folhas, individualmente, e as leituras realizadas utilizando-se o software APS Assess versão 2.0 (Lamari, 2002).

Trocas gasosas

Os parâmetros de trocas gasosas foram estimados na primeira folha, fisiologicamente madura, e totalmente expandida, do ápice à base. A assimilação líquida de CO₂ (*A*), condutância estomática ao vapor de água (*gs*), taxa de transpiração (*E*), concentração intercelular de CO₂ (*C_i*), e eficiência de carboxilação (*A/C_i*), foram estimadas entre 08:00 e 11:00 usando um sistema portátil de troca de gás de fluxo aberto

(LI6400XT, LI-COR, Lincoln, NE), sob concentração externa de CO₂ de 400 μmol mol⁻¹ de ar e radiação fotossinteticamente ativa artificial (PAR) de 900 μmol de fótons m⁻² s⁻¹.

A fluorescência da clorofila *a*

Para avaliar a fluorescência da clorofila *a*, foi considerada a primeira folha fisiologicamente madura, e totalmente expandida, do ápice à base, foi utilizada a câmara de fluorescência (IG 6400-40; LI-COR Inc.) integrada ao sistema portátil de troca de gás de fluxo aberto. As folhas foram adaptadas ao escuro por 30 min para se obter a razão de eficiência fotoquímica máxima (F_v / F_m), calculada a partir da fluorescência inicial (F_0) e das emissões máximas de fluorescência (F_m). Foi obtido também, o rendimento quântico de dissipação de energia não regulada ($Y [NO]$), coeficiente de extinção fotoquímica (qP), rendimento quântico de dissipação de energia regulada ($Y [NPQ]$), rendimento quântico efetivo de PSII ($Y [II]$) e transferência de elétrons taxa (ETR) (Oxborough; Baker, 1997; Maxwell; Johnson, 2000).

SPAD e teor de clorofilas

Ao final do experimento no sexto mês de idade foram realizadas as leituras com SPAD-502 (Soil Plant Analysis Development) realizadas em três pontos ao longo do limbo foliar da última folha totalmente expandida. Foram coletadas informações considerando a base, terço médio e o ápice da folha (Jesus e Marengo, 2008). As áreas das folhas avaliadas foram destacadas e armazenadas em caixa térmica contendo gelo, para em laboratório serem realizados os processo de quantificação de clorofilas. A quantificação das clorofilas foram de acordo com Lichtenthaler (1987), considerando as áreas de avaliação com SPAD. Foram separados 30 mg de amostras de cada região, totalizando 90 mg; a amostra fresca foi macerada junto a um grama de areia lavada e de CaCO₃, e cerca de 5 mL de acetona 80%. Após, o extrato foi filtrado e o volume completado em 25 mL. A quantificação dos teores de clorofila *a* e *b* (mg L⁻¹) foram procedidos por espectrofotometria de emissão a 646,8 nm e 663,2 nm, e aplicadas as equações abaixo:

$$\text{Clorofila } a = C_a = 12,25 A_{663,2} - 2,79 A_{646,8}$$

$$\text{Clorofila } b = C_b = 21,50 A_{646,8} - 5,10 A_{663,2}$$

$$\text{Clorofilas totais} = C_{(a+b)} = 7,15 A_{663,2} + 18,71 A_{646,8}$$

2.8 Análise estatística

Foi realizada análise de variância e as médias foram comparadas mensalmente pelo teste t ($p < 0,05$), utilizando a linguagem de programação R (Team, 2017).

3 Resultados

A severidade da queima foliar ocasionada por *Pestalotiopsis* sp. em mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil aumentou drasticamente a partir dos dois meses de idade, ultrapassando 45%, nas mudas controle. Em todas as avaliações feitas a partir dos três meses, a severidade da doença nas mudas que receberam *B. cereus* foi reduzida entre 56% e 190%, em relação ao controle (Figura 1). Plantas infectadas exibiram danos pronunciados em sua maquinaria fotossintética e na área foliar, mas o mesmo resultado não foi observado naquelas que receberam aplicação de *B. cereus*. Em geral, a partir dos três meses, quase todos os parâmetros foram negativamente afetados em plantas infectadas pela queima foliar, com exceção de *Ci*. Plantas controle, aos três e quatro meses de idade, exibiram redução expressiva em A , g_s , E , A/Ci que refletiram na redução de área foliar variando entre 31% e 76%. Os parâmetros de fluorescência de clorofila a foram alterados positivamente a partir do quarto mês e com a aplicação do *B. cereus*. Plantas controle exibiram redução em F_v/F_m e ETR aos quatro meses, e aos cinco meses para F_v'/F_m' e qP , em relação às plantas inoculadas com *B. cereus*.

No terceiro mês, o uso de *B. cereus* reduziu a severidade de queima foliar em 65% (Figura 1), e induziu aumento em 73% em A , 76% em g_s , 75% em E e 73% A/Ci , comparada a planta controle (Figura 2), resultando em aumento de área foliar sadia em 66%. No quarto mês, plantas inoculadas com *B. cereus* exibiram redução em 37% na severidade da queima foliar e incremento em 93% em A , 31% em g_s , 32% em E e 136% A/ci . Além de redução em 20% de Ci . Ainda no quarto mês verificou-se incremento em 30% na área foliar (Figura 2), em 4% no F_v/F_m e 7,5% no ETR , comparadas às plantas controle (Figura 3).

Nas avaliações ao quinto mês, foi evidenciado redução da queima foliar em 43% e Ci em 14% em plantas com *B. cereus* comparada a plantas controle (Figura 1, Figura 2G). Neste cenário, plantas inoculadas com *B. cereus* promoveram ainda, aumento em 37% para A , 44% de g_s e 55% de E , em 45% de A/Ci , 4% em F_v/F_m , 8% em F_v'/F_m' ,

62% em ETR e 86% de qp e 81% da variável $Y(NQP)$ (Figura 2 e 3), que resultou em incremento em 37% no crescimento de área foliar (Figura 2A), comparada às mudas controle. Aos seis meses, as mudas de coqueiro bioestimuladas exibiram redução em 35% na severidade e incremento em 45% em A , 42% em gs , em 45% E (Figura 2), em 6% em Fv/Fm , em 16% em Fv'/Fm' , 46% em ETR , 60% de qp e em $Y(NQP)$ de 20% (Figura 3) que resultou em 45% a mais de área foliar.

Aos seis meses de idade, foi realizada a avaliação de SPAD e a quantificação de clorofilas. As plantas inoculadas com *B. cereus*, ocorreu aumento em 24% em SPAD, 26% clorofilas *a*, 25% em clorofilas *b* e em 26% em clorofilas totais, comparadas às plantas controle (Figura 4).

4 Discussão

Foi demonstrado pela primeira vez que os sintomas da queima foliar causada por *Pestalotiopsis* sp. reduzem a área foliar de mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil (Cardoso *et al.* 2019). O presente estudo demonstra como consequência do desenvolvimento da queima foliar de coqueiro, os prejuízos na atividade fotossintética em folhas de coqueiro infectadas com *Pestalotiopsis* sp. Assim, como constata-se que *B. cereus* reduz a severidade da queima foliar ao melhorar o desempenho fotossintético, iniciando pela maior difusão de CO_2 , e seguindo nas fases bioquímica e fotoquímica. Assim, o presente estudo revela informações sobre o efeito do *B. cereus* no aumento da resistência das mudas de coqueiro à queima foliar sob uma perspectiva fisiológica.

Pestalotiopsis é um gênero fitopatogênico importante, principalmente nos trópicos, onde causa queima nas folhas (Guba, 1961) em muitas espécies de plantas (Das *et al.* 2010). É um fungo necrotrófico que, logo em seguida da fase inicial de infecção, secreta enzimas líticas e fitotoxinas que degradam parede celular e componentes de membrana, causando morte celular rápida nos hospedeiros e provocando respostas moleculares importantes na planta (Meinhardt *et al.*, 2014).

No presente estudo foi demonstrado que a aplicação de *B. cereus* coordenou alterações iniciais na fase bioquímica da fotossíntese, na difusão de CO_2 (devido apresentar maior gs - Figura 2), assimilação líquida (maior A , conforme figura 2), transpiração e carbolixalacao, que resultaram em expansão acentuada de área foliar desde o primeiro mês após a aplicação do *B. cereus* (2º mês de avaliação) e consequente

redução da severidade da queima foliar. Esta informação indica que todas as etapas principais da fotossíntese foram afetadas positivamente por *B. cereus* em plantas, mesmo em níveis de severidade inferiores a 10% de queima foliar. Assim, os resultados sugerem um efeito protetor induzido por *B. cereus* na preservação na atividade fotossintética em plantas doentes.

O gênero *Bacillus* exibe vários mecanismos que podem afetar o "triângulo da doença" direta, indiretamente ou sinérgicamente, como resultado de múltiplos mecanismos, incluindo promoção do crescimento vegetal, antibiose, pela formação do biofilme, lise celular do patógeno e resistência sistêmica induzida (ISR). A aplicação do *Bacillus* preventivamente em plantas pode desencadear efeito *primer*, que consiste em uma resposta imune e leva a rápida e intensa resposta ao ataque de patógenos (Conrath et al., 2015, Mauch-Mani et al., 2017).

Um dos tipos de elicitores são os compostos voláteis endógenos como Indol que é registrado como desencadeador de proteínas PR, fitoalexinas e de enzimas antioxidantes (Shen et al., 2018). No presente estudo, plantas que receberam *B. cereus* exibiram aumento de AIA, GA-3 que podem juntamente com outras moléculas sinais ter contribuído para incremento da condutância estomática, que pode ser indicativo que nestas plantas há menor resistência estomática, em decorrência de maior *gs* (Guerra, 2014), este comportamento, influenciou também na maior taxa de transpiração. Fan *et al.*, (2015) ressaltam, que o aumento da transpiração quando relacionado ao crescimento acelerado, é favorável à medida que o suprimento hídrico seja adequado.

Infecção por *Colletotrichum* sp. reduz o desempenho fotossintético de mudas de açaí, devido à menor captura de luz e assimilação de CO₂ no mesofilo, alterando drasticamente a fluorescência da clorofila *a*, acompanhada do aumentaram com o número de lesões (Castro et al., 2016). Em plantas de arroz inoculadas com *P. fluorescens* e *B. pyrrocinia* e desafiadas com *Monographela albescens*, ocorreu aumento na taxa de assimilação líquida de CO₂, atribuído a maior abertura dos estômatos. Nessas plantas, a redução do *Ci* correspondeu a maior atividade de carboxilação da rubisco e, conseqüentemente, maior assimilação de CO₂ (Bueno et al., 2017).

Limitações bioquímicas da fotossíntese em plantas infectadas têm sido frequentemente avaliadas usando curvas *A/Ci* tradicionais (Debona *et al.* 2014). E quando

considerados g_s podem levar a resultados mais robustos (Pereira *et al.*, 2020). Mudanças de coqueiro infectadas por *Pestalotiopsis* sp. exibiram elevada concentração de C_i , baixa g_s e A/C_i com o aumento da severidade da doença. Por outro lado, plantas que receberam aplicação do *B. cereus* exibiram incremento em A/C_i que evidenciam que este isolado aumenta a atividade de carboxilação da rubisco, principal enzima responsável pela regulação estomática e fixação de CO_2 no ciclo de Calvin, resultando em produção de trioses P (Shi *et al.*, 2010). Para que esse evento ocorra é importante que o suprimento de ATP e NADPH para a enzima seja, constante e eficiente, evidenciando a importância da integridade das clorofilas, pois são as responsáveis pela absorção de luz (Maxwell; Johnson, 2000).

No presente estudo, os parâmetros de fluorescência da clorofila exibiram perdas a partir do 4º mês em plantas doentes (controle) (Figura 3), provavelmente em decorrência das limitações bioquímicas, como a dissipação de luz absorvida no aparelho fotossintético. O fotossistema II (*PSII*) ajustes de captura, uso e dissipação de luz são necessários para fornecer fotoproteção a maquinaria fotossintética. Notavelmente as mudas que receberam *B. cereus*, revelam eficiência das reações fotoquímicas comparada a mudas do tratamento controle. Nas mudas com *B. cereus* ocorreu aumento do rendimento quântico fotoquímico máximo de *PSII* (F_v/F_m) e no F_v'/F_m' , demonstrando a eficiência na utilização da energia luminosa e aumento da integridade do aparato fotossintético (Schreiber *et al.*, 1994), pois, está relacionada à dissipação da energia termal no sistema antena (Demmig-Adams *et al.*, 1989; Logan *et al.* 2007), sem ocorrência de dano foto inibitório.

Samaniego-Gómez *et al.*, (2016), avaliando o efeito de *Bacillus* spp. sobre parâmetros fisiológicos, em plantas de pimenta, verificaram que a inoculação promoveu incremento da taxa de transporte de elétrons, aumentou a eficiência do *PSII*, o rendimento quântico fotoquímico (F_v/F_m), promoveu aumento de qP e NPQ , quando comparadas a plantas controle não inoculadas. Essas alterações em plantas com *B. cereus* foram acompanhadas por aumento em ETR e qP , indicando que ocorreu estímulo à captura da energia de excitação a serem convertidas em energia química (A luz é absorvida, transportada na forma de energia até que ocorre a excitação do *PSII*. Após isso, ocorrerá o transporte de elétrons ao longo da cadeia específica na membrana do tilacóide - não

existe formação de energia química no PSII, ocorre somente no PSI - no estroma do cloroplasto no centro de reação do *PSII*.

Em mudas bioestimuladas ocorreu aumento de *qP* e *NQP*, onde o parâmetro *qP* representa a dissipação fotoquímico, enquanto o *NPQ* representa a dissipação não fotoquímico, relativa à dissipação de calor que ocorre como uma fotoproteção do PSII (Zhang et al. 2017). Resultados semelhantes foram encontrados por Khan; Siddiqui (2019), avaliando a inoculação de *Pseudomonas putida* e *Bacillus subtilis*, de forma isolada e o mix, em plantas de beterraba com a inoculação de *Meloidogyne incognita*, *Pectobacterium betavasculorum* e *Rhizoctonia solani*, verificaram que plantas controle inoculadas com os três patógenos juntos promoveram acentuada redução nos parâmetros da fluorescência da clorofila *a*, com redução de *Fv/Fm*, *qP*, *NPQ* e *ETR*. Por outro lado, plantas com a aplicação de *P. putida* e *B. subtilis*, inoculadas com os patógenos, apresentaram incremento significativos entre os parâmetros da fluorescência da clorofila, com maiores incrementos quando houve coinoculação.

Os resultados deste estudo sugerem que a inoculação precoce de *B. cereus* em mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil protege e otimiza a eficiência do processo fotossintético, devido aos estímulos da etapa bioquímica e dos componentes da etapa fotoquímica, que resultam em expansão foliar e redução dos sintomas de queima foliar. A avaliação de parâmetros fisiológicos foram importantes para detecção das alterações promovidas com avanço da doença, com e sem uso de *B. cereus*, e reforçando o potencial deste isolado para o desenvolvimento de processos agrícolas mais sustentáveis.

Agradecimentos

Agradecemos à Universidade Federal Rural da Amazônia e ao Laboratório de Fitossanidade pela cessão das instalações e à Fundação Amazônica de Amparo a Estudos e Pesquisas do Estado do Pará (FAPESPA), e à Sococo S/A pela parceria e apoio, em especial a equipe do setor de fitossanidade.

Conflito de interesses

Declaramos que não temos interesses financeiros, profissionais ou pessoais concorrentes significativos que possam ter influenciado o desempenho ou a apresentação do trabalho descrito neste manuscrito.

Author Contributions

Aline Cardoso: a autora esteve presente em todos os ensaios do estudo e foi responsável pela análise de campo e pela análise estatística dos dados e interpretação dos resultados, além da redação do manuscrito. Jennyfer Campos e Sidney da Costa: os autores estiveram presentes em todos os ensaios do estudo, sendo responsáveis pelo campo. Gledson Castro e Paulo Lins: os autores foram responsáveis pela análise estatística, análise dos indicadores econômicos, interpretação dos resultados e auxiliou na redação e revisão do manuscrito. Gisele Barata da Silva: a autora foi a responsável pelo projeto, orientando os alunos em todas as etapas do processo. Foi responsável pela verificação e acompanhamento dos dados de campo, além da redação do manuscrito.

Referências

Asadhi, S. Reddy; Bhaskara, B. V; Sivaprasad, Y; Prathyusha M; Krishna T. M. Krishna;

Asadhi, S.; Bhaskara Reddy, B. V.; Sivaprasad, Y.; Prathyusha, M.; Murali Krishna, T.; Vijay Krishna Kumar, K.; Raja Reddy, K. (2013). Characterisation, genetic diversity and antagonistic potential of 2,4-diacetylphloroglucinol producing *Pseudomonas fluorescens* isolates in groundnut-based cropping systems of Andhra Pradesh, India. Arch Phytopathol. Plant Prot. 45 1966–1977.

Baghbani, F; Lotfi, R; Moharramnejad, S; Bandehagh, A; Roostaei, M; Rastogi, A; and Kalaji, H. M. (2019). Impact of *Fusarium verticillioides* on chlorophyll fluorescence parameters of two maize lines. European Journal of Plant Pathology, 154(2), 337-346.

Bueno, A. C. S. O; Castro, G. L. S; Silva Junior, D. D; Pinheiro, H. A; Filippi, M. C. C; Silva, G. B. (2017). Response of photosynthesis and chlorophyll *a* fluorescence in leaf scald-infected rice under influence of rhizobacteria and silicon fertilizer. Plant Pathology, 66(9), 1487-1495.

Cardoso, A. F; de Oliveira, Louzano. F. S; Pinheiro, C. C. C; Lins, P. M. P; and da Silva, G. B. (2020). Validation of Diagram Scale for Leaf Spot Caused by *Pestalotiopsis* sp. in Coconut Seedlings. Journal of Agricultural Studies, 8(2), 32-41.

Cardoso, G. D; Barreto, A. F; Araújo, E; Almeida, F. A. D; Carvalho, R. A. G. D. (2003). Etiologia e progresso da mancha de *Pestalotia* do coqueiro (*Cocos nucifera* L.), em São Gonçalo, Paraíba. Revista Brasileira de Fruticultura, 25(2), 335-336.

Castro, G. L; Júnior, D. D. S; Bueno, A. C. S; Silva, G. B. (2017). Anthracnose in açai palm leaves reduces leaf gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence. Tropical Plant Pathology, 42(1), 13-20.

Chauhan, R. S; Singh, B. M; Develash, R. K. 1997. Effect of toxic compounds of *Exserohilum turcicum* on chlorophyll content, callus growth and cell viability of susceptible and resistant inbred lines of maize. *J. Phytopathol.* 145:435-440.

Conrath, U; Beckers, Gerold, J. M; Langenbach; Caspar J. G; Jaskiewiczet, MichaL R. Priming for Enhanced Defense. *Phytopathol.* 2015. 514 53:97–119.

Debona, D; Rodrigues, F. A; Rios, J. A; Martins, S. C. V; Pereira, L. F; Damatta, F. M. (2014). Limitations to photosynthesis in leaves of wheat plants infected by *Pyricularia oryzae*. *364 Phytopathology* 104:34-39

Demmig-Adams, B; Adams, W. W; Winter, K., Meyer, A; Schreiber, U; Pereira, J. S; Lange, O. L. (1989). Photochemical efficiency of photosystem II, photon yield of O₂ evolution, photosynthetic capacity, and carotenoid composition during the midday depression of net CO₂ uptake in *Arbutus unedo* growing in Portugal. *Planta*, 177(3), 377-387.

Evidente, A; Zonno, M. C; Andolfi, A; Troise, C; Cimmino, A; Vurro, M. (2012). Phytotoxic α -pyrones produced by *Pestalotiopsis guepinii*, the causal agent of hazelnut twig blight. *The Journal of antibiotics*, 65(4), 203-206.

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

FILIPPI, M. C. C; SILVA, G. B; SILVA-LOBO, V. L; CÔRTEZ M. V. C. B; MORAES, A. J. G; PRABHU, A. S. 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.

Gevens, A. J; Carver, T. L. W; Thomas, B. J; Nicholson, R. L. 2001. Visualization and partial characterization of the ECM of *Pestalotia malicola* on artificial and natural substrata. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 58, 77–285.

Guerra, A. M. N. M; Rodrigues, F. A; Lima, T. C; Berger, P. G; Barros, A. F; Silva, Y. C. R (2014). Photosynthetic capacity of cotton boll rot infected plants and supplied with silicon. *370 Bragantia* 73:50-64. (In Portuguese).

KADO, C. J; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, v.60, n.6, p.969-976. 1970.

Khan, M. R; Siddiqui, Z. A. (2019). Potential of *Pseudomonas putida*, *Bacillus subtilis*, and their mixture on the management of *Meloidogyne incognita*, *Pectobacterium betavasculorum*, and *Rhizoctonia solani* disease complex of beetroot (*Beta vulgaris* L.). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 29(1), 1-14.

Krause, G. H; Weis, E. (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. *375 Annual review of plant biology* 42:313-349

- Lamari, L. (2002). Assess: image analysis software for plant disease quantification. APS press.
- Lamari, L. (2008). Assess 2.0 [recurso electrónico]: image analysis software for plant disease quantification (No. 632.3 L215a). APS Press,.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in enzymology*, 148, 350-382.
- Lin, H. F; Chen, T. H; Da Liu, S. (2011). The antifungal mechanism of *Bacillus subtilis* against *Pestalotiopsis eugeniae* and its development for commercial applications against wax apple infection. *African Journal of Microbiology Research*, 5(14), 1723-1728.
- Liu, F; Bonthond, G; Groenewald, J. Z. 2018. Sporocadaceae, a family of coelomycetous fungi 412 with appendage-bearing conidia. *Stud. Mycol.* 92:287-415
- Maharachchikumbura, S. S. N; Hyde, K. D; Groenewald, J. Z; Xu, J; Crous, P. W. 2014. *Pestalotiopsis* revisited. *Stud. Mycol.* 79:121-186
- Maharachchikumbura, S. S; Hyde, K. D; Groenewald, J. Z; Xu, J; Crous, P. W. (2014). *Pestalotiopsis* revisited. *Studies in Mycology*, 79, 121-186.
- Marenco, R. A.; Lopes, N. F. *Fisiologia Vegetal: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral*. Viçosa: UFV. 451 p, 2007
- Maxwell, K; Johnson, G. N. (2000) Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J Exp Bot* 51(345):659–668. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.345.659>
- Meinhardt, L. W; Costa, G. G. L; Thomazella, D. P. T; Teixeira, P. J. P. L; Carazzolle, M. F; Schuster, S. C; Carlson, J. E; Gultinan, M. J; Mieczkowski, P; Farmer, A; Ramaraj, T; Crozier, J; Davis, R. E; Shao, J; Melnick, R. L; Pereira, G. A.. G; Bailey, BA. 2014 – Genome and secretome analysis of the hemibiotrophic fungal pathogen, *Moniliophthora roreri*, which causes frosty pod rot disease of cacao: mechanisms of the biotrophic and necrotrophic phases. *BioMed Central Genomics* 15, 164–189
- Niu, X. Q; Yu, F. Y; Zhu, H; Qin, W. Q. (2014). First report of leaf spot disease in coconut seedling caused by *Bipolaris setariae* in China. *Plant disease*, 98(12), 1742-1742.
- Niu, X. Q; Zhu, H; Yu, F. Y; Tang, Q. H; Song, W. W; Liu, L; Qin, W. Q. (2015). First report of *Pestalotiopsis menezesiana* causing leaf blight of coconut in Hainan, China. *Plant Disease*, 99(4), 554.
- Oxborough, K; Baker, N. R. (1997) Resolving chlorophyll a fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components - calculation of qP and Fv'/Fm' without measuring Fo' . *Photosynth R.*
- Pereira, L. F; Martins, S. C. V; Aucique-Pérez, C. E; Silva, E. T; Ávila, R. T; DaMatta, F. M; Rodrigues, F. Á. (2020). Silicon alleviates mesophyll limitations of photosynthesis on rice leaves infected by *Monographella albescens*. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 32, 163-174

Pinkard, E. A; Mohammed, C. L. 2006. Photosynthesis of *Eucalyptus globulus* with *Mycosphaerella* leaf disease. *New Phytologist* 170, 119–127.

Rodrigues, F. A; Silva, I. T; Antunes Cruz, M. F; Carré-Missio, V. (2014). The Infection Process of *Pestalotiopsis Longisetula* Leaf Spot on Strawberry Leaves. *Journal of Phytopathology*, 162(10), 690–692

Samaniego-Gámez, B. Y; Garruña, R; Tun-Suárez, J. M; Kantun-Can, J; Reyes-Ramírez, A; Cervantes-Díaz, L. (2016). *Bacillus* spp. inoculation improves photosystem II efficiency and enhances photosynthesis in pepper plants. *Chilean journal of agricultural research*, 76(4), 409-416.

Saraf. M; Pandya. U; Thakkar. A., (2014). Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens. *Microbiol. Res.* 169 18–29.

Schreiber, U; Bilger, W; Neubauer, C. Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: SCHULZE, E.D.; CALDWELL, M.M. (Ed.). *Ecophysiology of photosynthesis*. Berlin: Springer, 1994. p.49-70. (Ecological Studies, 100

SEMA. Classificação Climática do Pará Método de Köppen. 2017. Disponível em:< [www.sema.pa.gov.br > classificacao_climatica_do_para](http://www.sema.pa.gov.br/classificacao_climatica_do_para)>. Acesso em 22 out. 2019.

Shen, Q; Liu, L; Wang, L; Wang, Q. (2018). Indole primes plant defense against necrotrophic fungal pathogen infection. *PloS one*, 13(11), e0207607.

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

Solanki, M. K; Robert, A. S; Singh, R. K; Kumar, S; Pandey, A. K; Srivastava, A. K; Arora, D. K. Characterization of mycolytic 957 enzymes of *Bacillus* strains and their bio-protection role against *R. solani* in tomato. *Curr Microbiol* 2012; 65 (3): 958 330-336

Sprangers, K; Thys, S; Van Dusschoten, D; Beemster, G. T. (2020). Gibberellin Enhances the Anisotropy of Cell Expansion in the Growth Zone of the Maize Leaf. *Frontiers in plant science*, 11, 1163.

Sutton, B.C; In: *The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervular and Stromata*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, p. 696, 1980.

Vitorino, L. C., Silva, F. O. D., Cruvinel, B. G., Bessa, L. A., Rosa, M., Souchie, E. L., & Silva, F. G. (2020). Biocontrol potential of *Sclerotinia sclerotiorum* and physiological changes in soybean in response to *Butia archeri* Palm Rhizobacteria. *Plants*, 9(1), 64. doi: 10.3390/plants9010064.

Team; R. C. (2017) R: A language and environment for statistical computing. R Found Stat Comput Vienna, Austria <https://www.Rproject.org>. Accessed 2 Dec 2019.

Türkkan, M; Andolfi, A; Zonno, M. C; Erper, I; Perrone, C; Cimmino, A; Evidente, A. (2011). Phytotoxins produced by *Pestalotiopsis guepinii*, the causal agent of hazelnut twig blight. *Phytopathologia Mediterranea*, 50(1), 154-158.

Xu, G; Qiu, F; Zhou, J; Zheng, F. Q; Zheng, L; Miao, W. G; Xie, C. P. (2020). First Report of *Curvularia oryzae* Causing Leaf Spot of Coconut Seedling in China. *Plant Disease*, 104(2), 574.

Zalila-Kolsi, I; Mahmoud, A. B; Ali, H; Sellami, S; Nasfi, Z; Tounsi, S; Jamoussi, K. (2016). Antagonist effects of *Bacillus* spp. strains against *Fusarium graminearum* for protection of durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. durum). *Microbiological research*, 192, 148-158.

Zeng, W; Melotto, M; He, S.Y; 2010. Plant stomata: a checkpoint of host immunity and pathogen virulence. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21, 599–603.

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

Lista de Figuras

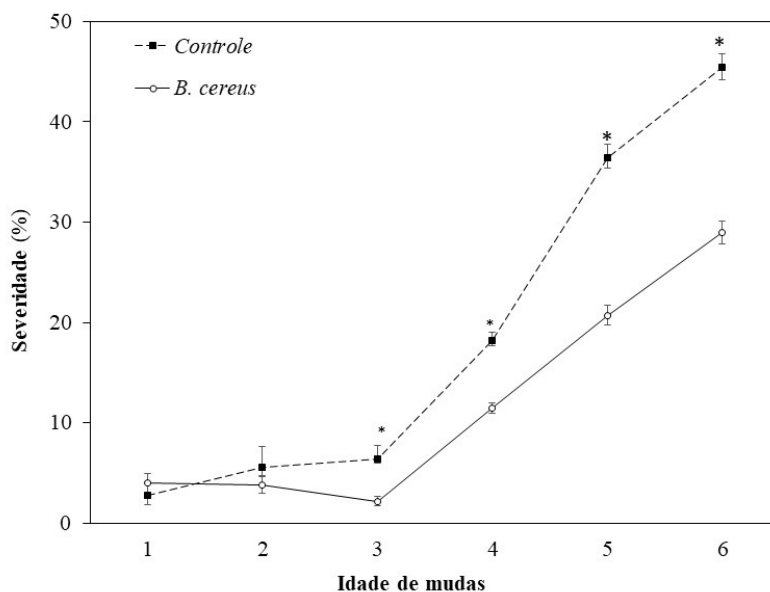


Figura 1. Severidade da queima das folhas ocasionada por *Pestalotiopsis* sp. Plantas controle e plantas inoculadas com *B. cereus*, ao longo de seis meses. As médias por tratamento comparadas mensalmente seguidas por um asterisco (*) foram significativas comparadas pelo teste *t* ($p < 0,05$). As barras representam os desvios padrão das médias.

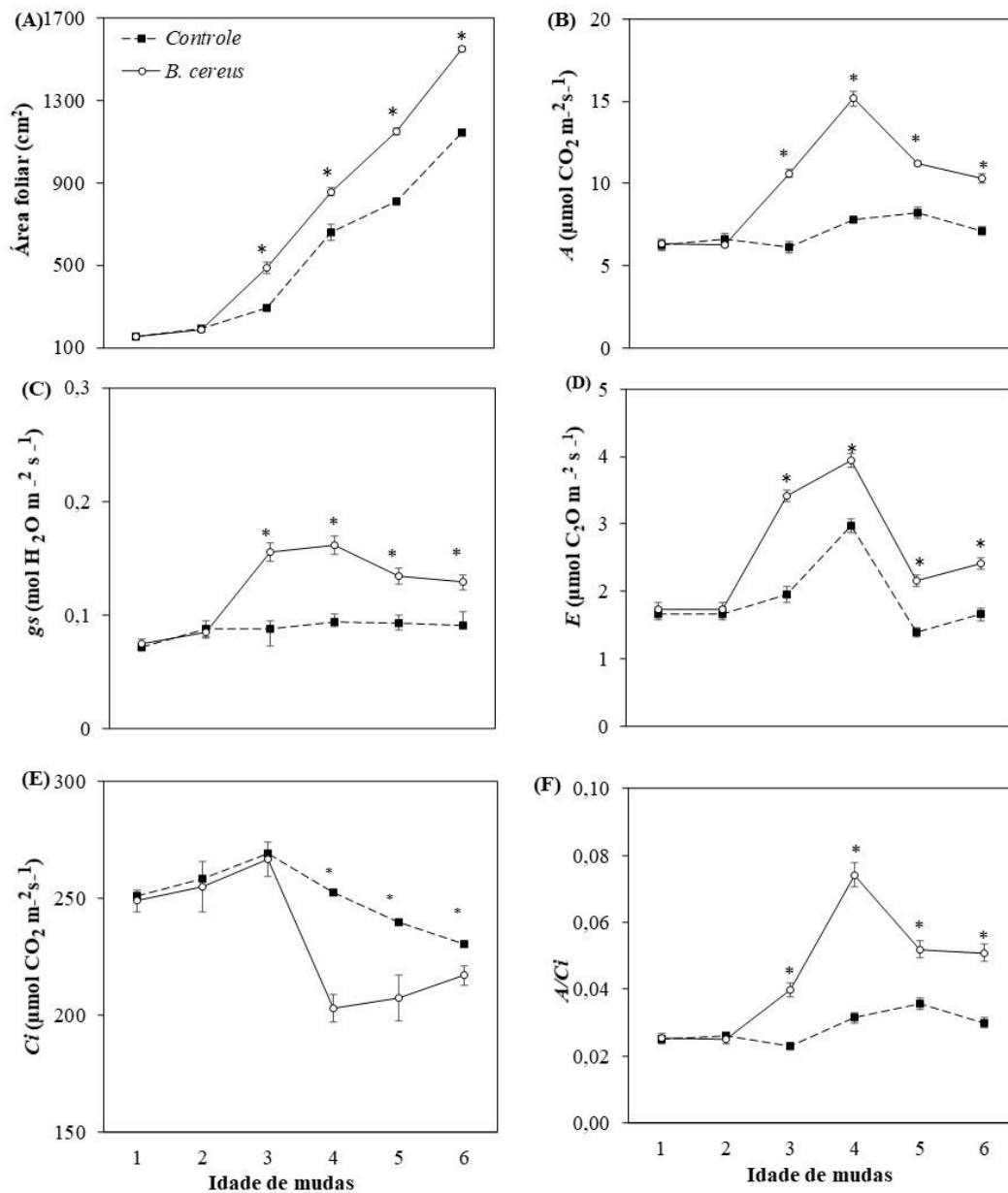


Figura 2. Área foliar e Trocas gasosas de mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil. Área foliar (A), Taxa líquida de assimilação de CO_2 (A)(B), condutância estomática ao vapor de água (g_s)(C), taxa de transpiração (E)(D), concentração de CO_2 intercelular (C_i)(E) e eficiência de carboxilação (A/C_i), obtidas de amostras de folha de plantas controle e de plantas inoculadas com *B. cereus*, ao longo de seis meses de idade. Letras iguais não diferem entre si quando comparadas pelo teste t ($p < 0,05$). As barras representam os desvios padrão das médias.

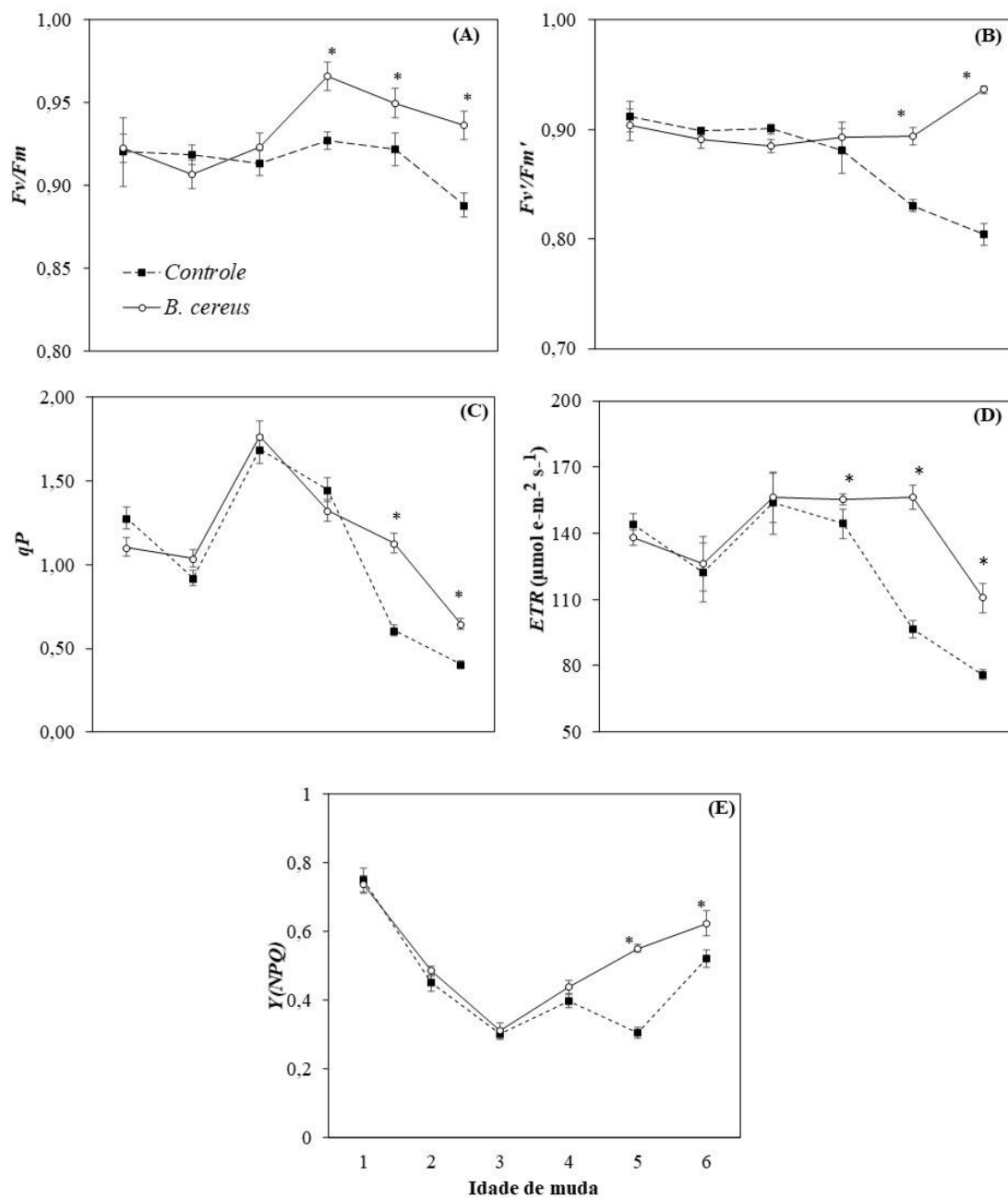


Figura 3. Fluorescência da clorofila *a*. máxima razão de eficiência fotoquímica (F_v / F_m)(A), eficiência fotoquímica efetiva do PSII (F_v'/F_m')(B), coeficiente de extinção fotoquímico (q_p)(C), taxa de transferência de elétrons (ETR)(D), rendimento quântico de dissipação de energia regulada [$Y(NPQ)$](E) obtidas de amostras de folha de plantas controle e de plantas inoculadas com *B. cereus*, ao longo de seis meses de idade. As médias por tratamento comparadas mensalmente seguidos por um asterisco (*) foram significativas comparadas pelo teste t ($p < 0,05$). As barras representam os desvios padrão das médias.

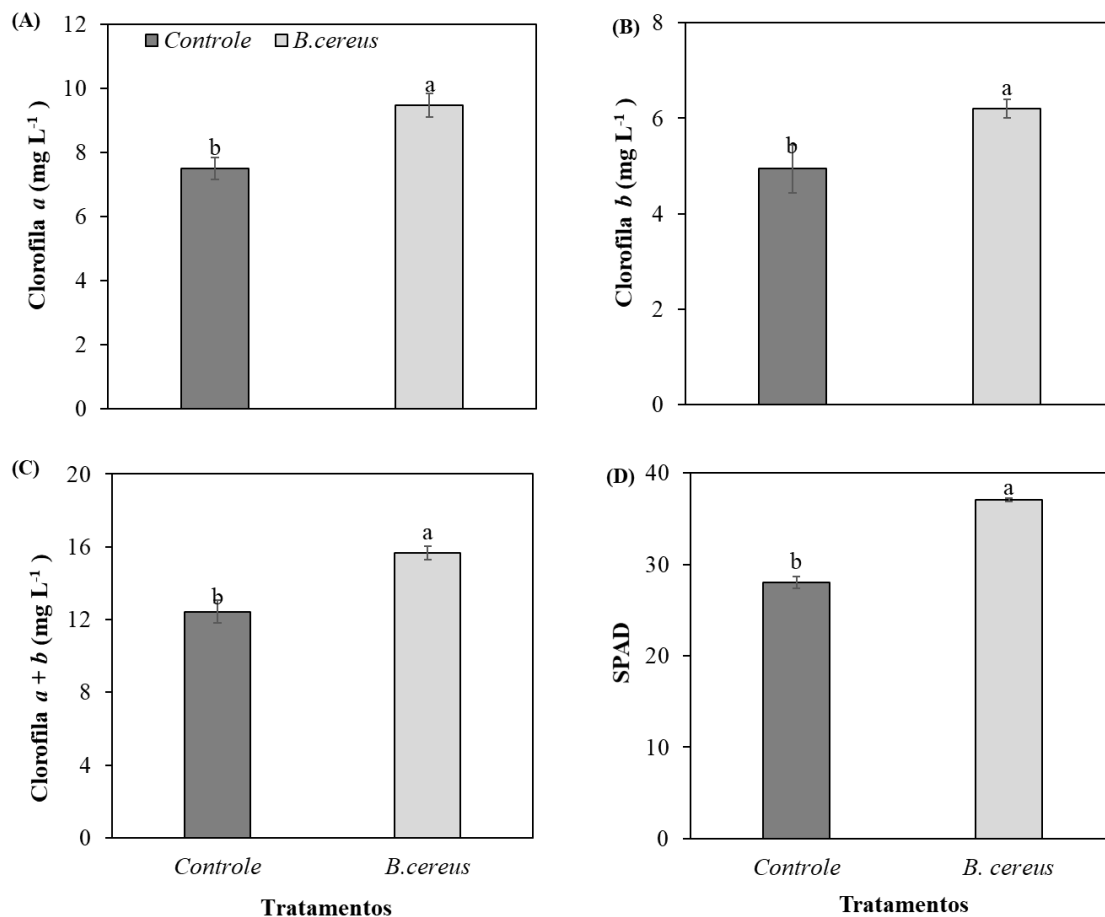


Figura 4. Concentração de clorofilas e SPAD em mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil. Concentração de clorofila *a* (A) clorofila *b*, clorofilas totais (C) e SPAD(D), obtidas de amostras de folha de plantas controle e de plantas inoculadas com *B. cereus*, aos seis meses de idade. Letras iguais não diferem entre si quando comparadas pelo teste *t* ($p < 0,05$). As barras representam os desvios padrão das médias.

Capítulo 5: Eficiência econômica e desenvolvimento de mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil bioestimuladas com *Bacillus cereus*

Resumo

A produção de mudas de coqueiro é uma etapa importante do processo produtivo, pois afeta substancialmente o desempenho produtivo da planta adulta e, o modo de obtenção de mudas reflete diretamente aos custos agregados. Para minimizar os custos, a introdução de bioestimulantes pode ser considerada uma tecnologia viável e sustentável. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de *Bacillus cereus* como promotor de crescimento e a eficiência econômica do seu uso na produção de mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil. O experimento foi conduzido em viveiro comercial, no município de Santa Isabel do Pará, Amazônia Oriental, Brasil. O delineamento foi inteiramente casualizado, com dois tratamentos: controle (sem inoculação e 100% de fertilização química) e inoculação de *B. cereus* (50% da adubação química), com cinco repetições cada. Foram avaliados os parâmetros biométricos e o determinados o custo operacional efetivo (COE) e o custo operacional total (COT). Constatou-se que o maior crescimento das mudas ocorreu quando bioestimuladas. Em fibra de coco, *B. cereus* aumentou altura (16%), diâmetro do coleto (31%), biomassa aérea (52%) e biomassa radicular (22%). Mudas bioestimuladas com *B. cereus* reduziram o ciclo de produção em dois meses de idade. O COT para tratamento controle foi de R\$109.698,56 e, as mudas bioestimuladas reduziram o COT para R\$97.702,73. As reduções ocorreram em insumos e serviços, e provoveram redução do custo médio da muda em 11%. Logo, o uso de *B. cereus* em mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil promove o crescimento, reduz o de tempo de viveiro e o custo de produção em decorrência das alterações positivas provocadas nas plantas

Palavras-chave: Análise econômica, custos de produção, PGPR, sustentabilidade, *Cocos nucifera*.

Introdução

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) desempenha um papel na economia, cultural e social de mais de 80 países (Oyoo et al., 2015). A produção mundial corresponde a 60 milhões de toneladas de frutos com 110 milhões de hectares de área plantada. O Brasil é o quinto maior produtor, com destaque para a região nordeste do país que compõe 74,5% da produção nacional (IBGE, 2020). A Região Amazônica corresponde a 11% da produção do país e destes, 10% são referentes ao estado do Pará, com 197,3 mil toneladas (IBGE, 2017). A maior concentração de produção no estado do Pará deve-se a existência de cultivos comerciais.

A variedade anão-verde é destinada principalmente a produção de água de coco e consumo “*in natura*”, desempenha papel importante a saúde humana, por ser rica em açúcares e minerais (Waziri; Audu; Suleiman, 2013). A cultura do coco exige alto nível

tecnológico para alcançar a produtividade adequada que resulta em elevados custos (Martins; Jesus, 2014). A produção de mudas de coqueiro deve ser associada a um planejamento para gerenciamento de recursos financeiro alocados em cada etapa da atividade (Leite, 2008). O sistema de produção de mudas de coqueiro pode variar entre regiões e finalidade, e influencia no custo total, a escolha do recipiente, substrato e sementes de boa qualidade são primordiais. Assim, a introdução de inovações tecnológicas ao sistema de produção de mudas dessa cultura requer que seja realizado estudo econômico para tomadas de decisão.

O uso de microrganismos promotores de crescimento para a agricultura está associado aos efeitos benéficos e possíveis reduções em custos associados. Os benefícios com a inoculação de microrganismos são descritos em diversos estudos com arroz, cana de açúcar e milho (Regar; Yadav, 2017; Santos et al., 2017; Calvo et al., 2017), e em palmeiras, como o açaí (Castro et al., 2019). A promoção de crescimento promovida pelo uso de bioestimulante como rizobactérias está associada a capacidade de regulação de rotas metabólicas dos fitohormônios, que alteram a arquitetura radicular e, aumentam a altura e produção de biomassa, em decorrência da maior disponibilidade de nutrientes a partir de mecanismos de mineralização e solubilização da matéria orgânica (Doornbos et al., 2012; Ahemad; Kibret, 2014; Stewart; Hill, 2014; Timmusk et al., 2017; Pagano et al., 2017). Outros benefícios associados a rizobactérias são as reduções proporcionadas, principalmente com insumos químicos (Lima et al., 2020), que diretamente reduzem custos e promovem o uso sustentável dos recursos (Kakraliya et al., 2017).

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de *B. cereus* como promotor de crescimento e a eficiência econômica do seu uso na produção de mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil.

Material e métodos

Local experimento

O experimento foi conduzido em condições de viveiro comercial, no município de Santa Isabel do Pará-Brazil (1°13'26" S and 48°02'29" W), que apresenta clima do tipo Af1 de acordo com a classificação de Koppen-Geiger (SEMA, 2017).

Preparo de plântula de coqueiro

Em viveiro de mudas de coqueiro, as sementes foram semeadas em caixas de madeira (30 cm de altura, dois metros de largura e 10 metros de comprimento) contendo fibra de coco, e umedecidas diariamente por 90 dias. A caracterização química do substrato de fibra de coco (Golden-Mix tipo 4-amafibra) foi a seguinte: 0,086 g/kg⁻¹ nitrogênio (N); 0,264 g kg⁻¹ fósforo (P); 0,580 g kg⁻¹ potássio (K); 0,128 mg kg⁻¹ cálcio(Ca); 0,447 mg kg⁻¹ magnésio (MgO); 42,25mg sódio (Na); 0,703 mg L⁻¹ Boro (B); 0,12 g kg⁻¹ cobre (Cu); 0,5 mg kg⁻¹ ferro (Fe); 0,6 mg kg⁻¹ manganês (Mn); 0,78 mg kg⁻¹ zinco (Zn) and 92,43% matéria orgânica (OM).

Preparo das mudas de coqueiro

A plântulas com 15 cm de altura e duas folhas foram transferidas para sacos de polietileno (40 x 40 x 40 cm), contendo 7,5 kg de fibra de coco cada, com 50% de umidade. Segundo Lins e Viegas (2008), a recomendação de fertilização química de mudas de coqueiro segue: após 30 dias do transplântio (DAT) as mudas recebem 3 g ureia, 40g superfosfato simples-SFS (18% P₂O₅), 10 g cloreto de potássioKCL (60% K₂O), 5g óxido de magnésio-MgO (30 % Mg) e aos 90 DAT as mudas receberam (6 g Ureia, 80g SFS (18% P₂O₅), 20g KCL (60% K₂O), 10 g MgO (30 % Mg). A irrigação foi realizada diariamente por aspersores para repor a água evapotranspirada, 7 mm d⁻¹ (7 L m⁻²) (Fontes et al., 1989). As mudas que compõem o tratamento controle receberam duas aplicações mensal de inseticida

Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições e dois tratamentos constituídos: Controle com 100% da fertilização química recomendada (CF) e tratamento com inoculação de suspensão do isolado *Bacillus cereus* (10⁸ u.f.c) com 50% fertilização química recomendada.

Obtenção e preparo da suspensão de *Bacillus cereus*

O isolado de *B. cereus* foi obtido de área de plantio comercial de coqueiro anão-verde-do-brasil, e está armazenado em um banco de microrganismos do Laboratório de Proteção de Plantas da Universidade Federal Rural da Amazônia. A sequência foi depositada no Genbank como UFRABC40com o número de acesso MN393059.

O isolado de *B. cereus* foi crescido em meio líquido 523 (Kado e Heskett, 1970) e submetido a agitação (114 rpm) por 24 horas a 28°C. A concentração foi ajustada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm, correspondendo a 10⁸ unidades formadoras de colônia (UFC) (Filippi *et al.*, 2011). A Inoculação das mudas do tratamento com *B. cereus* ocorreu em meses alternados a fertilização química, para menor interferência sobre a ação do microrganismo, foi realizada aplicando 300 mL/planta da suspensão via rega aos 60 e 120 DAT.

Avaliações biométricas e análise estatística

Foram realizadas avaliações biométricas de altura, diâmetro do coleto, biomassas aérea e radicular aos seis meses de idade das mudas. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de SNK ($p < 0,05$), utilizando o software SISVAR versão 5.7.

Estimativa do custo de produção

Para a estimativa do custo de produção foi utilizada a metodologia do custo operacional total de produção do Instituto de Economia Agrícola (IEA). Inicialmente foi determinado o custo operacional efetivo (COE) que englobam os insumos, serviços, depreciação e manutenção. O custo operacional total (COT) foi obtido ao se acrescentar a taxa de 5% do total das despesas com o COE. Também foram adicionados os juros de custeio, considerando-se a taxa de 6,75% a.a. (taxa de juros utilizada em operações de crédito rural) sobre 50% do COE (Matsunaga; Bemelmans; Toledo, 1976). O fornecimento de água foi efetuado pelo sistema de irrigação do tipo aspersor, e os custos foram estimados baseado custo de diesel para a bomba de irrigação, a irrigação ocorreu durante cinco meses em mudas padrão. O custo unitário de produção da muda de coco anão-verde-do-brasil foi determinado a partir da divisão do custo operacional total pela quantidade de mudas produzidas, considerando um hectare de viveiro com capacidade de produzir 11.500 mudas. A avaliação da eficiência econômica da tecnologia microbiana foi efetuada a partir da análise comparativa do custo unitário de produção dos tratamentos controle e com *B. cereus*. Valores utilizados nesta pesquisa foram obtidos a partir de tabela de preços praticada e disponível no mercado no ano de 2019.

Resultados

Os resultados deste estudo, mostram que mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil bioestimuladas com *B. cereus* tiveram incremento em seu crescimento e, que seu uso comparado ao tratamento controle, proporcionou aumento de 16% na altura, 31% no diâmetro do coleto, 52% em biomassa aérea e 22% em biomassa radicular (Tabela 1). A obtenção de mudas de coqueiro ocorre ao final dos oitos meses de idade. Entretanto, mudas inoculadas com *B. cereus* reduzem em dois meses, o tempo em viveiro. A partir destes resultados, foram comparados os custos de produção das mudas, levando-se em consideração o tempo de viveiro dos tratamentos com e sem inoculação de *B. cereus*.

Nas Tabela 2 e 3 são apresentadas as estimativas dos custos operacionais totais obtidos com a produção de 1 hectare de mudas em viveiro, correspondendo a 11.500 mudas irrigadas, no município de Santa Isabel do Pará. Este modelo de estrutura de COT foi utilizado individualmente para os dois tratamentos. Na produção de mudas de coqueiro, independente do tratamento, os gastos com insumos e serviços correspondem a mais de 70% dos custos da produção de mudas, enquanto custo com manutenção e depreciação correspondem em até 2,5%.

Quanto a serviço, nas mudas com aplicação de *B. cereus* não houve custos com tratamento fitossanitário de fungicida e acaricida e ocorreu redução em 50% na adubação química, ou seja, de R\$ 11.666,75 para R\$ 3.720,24. Além de redução em três meses do período da irrigação, correspondendo os três últimos meses do ciclo, que diminuiu os custos com diesel de R\$ 3.195,00 para R\$ 1.917,00. Em seguida, ocorreu redução de serviços de inspeção fitossanitária, de R\$ 1.400,24 reais para R\$ 1.050,18 reais. Os serviços com pulverizações que abrangem aplicação de fungicidas, inseticidas e herbicidas reduziram de R\$ 2.800,48 reais para R\$ 365,28 reais, em função da aplicação apenas de herbicidas. Houve também redução de custos com o número de aplicações da adubação, de três para duas, correspondendo a redução de R\$ 1.050,18 para R\$ 700,12. Deste modo, O COT para tratamento com inoculação de *B. cereus* foi reduzido em R\$ 12.145,34, quando comparado ao tratamento controle. As plantas controle tem custo unitário de R\$9,56, enquanto que, as mudas bioestimuladas com *B. cereus*, o custo passou a ser de R\$8,50/muda (Tabela 4), redução de 11% custo de produção de uma muda de coqueiro anão-verde-do-brasil.

O cultivo de 11.500 mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil sem inoculação de *B. cereus*, o COT é de R\$109.698,56. Quando essa mesma quantidade de mudas foram bioestimuladas com *B. cereus*, houve o acréscimo ao custo do manejo de R\$ 4.485,00, que correspondeu ao valor total do bioestimulante para o ciclo. No entanto, em mudas bioestimuladas ocorreu redução em insumos e serviços.

Discussão

Neste estudo é mostrado que a bioestimulação de mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil com *B. cereus*, além de aumentar a performance do crescimento da planta, altera positivamente o manejo de produção, resultado na redução de custos.

O crescimento das mudas de coqueiro promovido por *B. cereus* está associado aos mecanismos de ação de rizobactérias deste gênero (Sun et al., 2016). A promoção de crescimento inicia-se com a interação positiva dos microrganismos com a rizosfera da planta alvo, o que é potencializado pelo isolado *B. cereus*, uma vez que pertence a rizosfera de coqueiro, e é adaptado as condições climáticas da região amazônica. Este é um dos fatores mais importantes, a especificação reflete diretamente ao melhor desempenho do bioestimulante (Kristin; Miranda, 2013). Rizobactérias promotoras de crescimento atuam na modulação hormonal, estimulando o desenvolvimento e a modificação da arquitetura do sistema radicular, a partir do balanço do ácido indolacético (AIA) e etileno (Glick, 2014). favorecendo maior absorção de água e nutrientes (Philippot et al., 2013).

O aumento do crescimento das mudas de coqueiro com redução de 50% da adubação química neste estudo, mostrou que a inoculação com *B. cereus* promoveu a eficiência do uso dos nutrientes, segundo Bhattacharyya e Jha (2012) a maior eficiência no uso de nutrientes realizada por microrganismos, é favorecida pela capacidade de rizobactérias em mineralização de matéria orgânica e solubilização de fosfatos . Os efeitos positivos na redução da fertilização são descritos em outras culturas. Em tomate a produção se igualou quando usado 70% da fertilização química (Adesemoye; Torbert; Kloepper, 2009); em mudas de palma de óleo na região amazônica, a promoção de crescimento foi acompanhada da redução em 50% da adubação (Lima et al., 2020). Estes mecanismos resultam no maior crescimento das plantas e pode contribuir no aumento da

aérea foliar, maior taxa fotossintética, maior conteúdo de clorofilas e maior acúmulo de biomassa (Sofó et al., 2011; Castro et al., 2019).

A inoculação de *B. cereus* proporcionou mudanças ao manejo padrão de preparo de mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil, em decorrência principalmente da redução de custos com fertilização química e com tratamento fitossanitário, que diretamente alteraram os serviços de pulverização, inspeção e adubação. Há no mercado muitos produtos a base de PGPR, principalmente porque em outras culturas, os custos de produção ao aplicar esta tecnologia já foram realizados. O mercado de bioestimulante possui grande capacidade de crescimento, em decorrência do custo benefício agregado. Segundo Sessitsch et al. (2018), para este mercado é esperado um aumento na taxa anual de 10,2% até 2022, e pode atingir 250 milhões de dolares em 2023 (Market Research Future, 2018).

Atualmente, um dos maiores desafios na agricultura são a aplicação de tecnologias ecologicamente corretas que supra a demanda alimentar mundial. Nesse sentido, sabe-se que a utilização de fertilizantes sintéticos de baixa eficiência está amplamente relacionado à perda de lixiviação e evaporação para a atmosfera (Delin; Stenberg, 2014). A utilização de *B. cereus* neste estudo, promoveu mudanças principalmente quanto ao uso de insumos químicos combinados ao aumento de crescimento das mudas. Espera-se que a utilização de microrganismos seja uma inovação que promova o melhor proveito dos recursos. Paungfoo-Lonhienne et al., (2019), mostraram que as PGPR melhoram a eficiência do fertilizante nitrogenado e reduz em 95% a lixiviação em relação ao tratamento com fertilizantes convencionais, e conseqüentemente há redução dos impactos negativos que são associados a fertilização química.

Aplicação de 75% da dose recomendada de fertilizante químico junto com *Azospirillum* (HAU) + Bactéria solubilizadora de rendeu 2,91t / ha de algodão em caroço com maior retorno líquido (R\$ 40,553) e valor líquido da relação B:C de R\$ 1,94, enquanto aplicação de 100% Aplicação de 75% da dose recomendada de fertilizante químico sem bioinoculantes rendeu 2,54 t / ha (Nalayini; Sankaranarayanan; Anandham., 2010). Yasmin et al. (2013) mostraram que a co-inoculação de *Pseudomonas aeruginosa* Z5 e *Bacillus fusiformis* S10 com metade e 1/4 dos fertilizantes N e P recomendados melhorou a massa da cápsula do algodão e a fibra de algodão, bem como o rendimento

de sementes em comparação com controles não inoculados. Outros estudos forneceram evidências de que *B. Pumilus* S1r1 pode fixar biologicamente o N₂ atmosférico e fornecer uma técnica alternativa, além do cultivo de plantas, para atrasar a remobilização de N na planta de milho para maior rendimento de espigas (até 30,9%) com entrada reduzida de fertilizante N (kuan et al., 2016)

Na cultura do coqueiro e, particularmente no processo de produção de mudas, ainda não há resultados que mostrem o impacto econômico da adoção de tecnologia microbiana, sobretudo quanto ao seu potencial de reduzir o custo de produção. Resultados dessa natureza são importantes para o setor produtivo, pois podem contribuir para a diminuição no uso de fertilizantes químicos, com redução direta nos custos de produção, atribuindo maior sustentabilidade ao sistema de produção de mudas.

Conclusão

A inoculação de bioestimulantes na produção de mudas de coco anão-verde-do-brasil constitui alternativa tecnológica eficiente sob a ótica econômica, pois permitiu produzir mudas a custo unitário inferior ao dos sistemas convencionais praticado na região, resultando em tecnologia promissora para adoção por empresas e produtores da cadeia produtiva da cocoicultura.

Agradecimentos

Agradecemos a Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA e o Laboratório de Proteção de Plantas pela estrutura fornecida, e pela parceria e ajuda financeira da FAPESPA e da empresa Sococo S/A.

Referência

- Adesemoye, A. O.; Torbert, H. A.; Kloepper, J. W. (2009). Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microb. Ecol.* 58, 921–929.
- Ahemad, M.; Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King saud University-science*, 26(1), 1-20.
- Bhattacharyya, P. N.; Jha, D. K. (2012). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): Emergence in Agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 28, n. 4, p. 1327–1350.
- Calvo, P.; Watts, D. B.; Kloepper, J. W.; Torbert, H. A. (2017). Effect of microbial-based inoculants on nutrient concentrations and early root morphology of corn (*Zea mays*). *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 180(1), 56-70.
- Castro, G. L. S.; da Silva Júnior, D. D.; Viana, R. G.; Rêgo, M. C. F.; da Silva, G. B. (2019). Photosynthetic apparatus protection and drought effect mitigation in açai palm seedlings by rhizobacteria. *Acta Physiologiae Plantarum*, 41(9),163.
- Doornbos, R. F.; Van Loon, L. C.; Bakker, P. A. (2012). Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 32(1), 227-243.
- Filippi, M. C. C.; Da Silva, G. B.; Silva-Lobo, V. L.; Côrtes, M. V. C.; Moraes, A. J. G.; Prabhu, A. S. (2011). Leaf blast (*Magnaporthe oryzae*) suppression and growth promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil. *Biological Control*, 58(2), 160-166.
- Fontes, H. R. F. Produção de mudas de coqueiro. Aracaju^ eSE SE: Embrapa Tabuleiros Costeiros (1989).
- Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol. Res.* 169, 30–39.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. LSPA - Levantamento sistemático da Produção Agrícola. Fortaleza: IBGE/GCEA-CE. Dezembro. Séries 2020. Dados preliminares>>. Acesso em: 02 jun. 2021
- IBGE. (2017). Levantamento Sistemático Produção Agrícola Rio de Janeiro v.30 n.1 p.81.
- Kakraliya, S. K.; Jat, R. D.; Kumar, S.; Choudhary, K. K.; Prakash, J.; Singh, L. K. (2017). Integrated nutrient management for improving, fertilizer use efficiency, soil biodiversity and productivity of wheat in irrigated rice wheat cropping system in Indo-Gangatic plains of India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(3), 152-163.
- Kristin, A.; Miranda, H. (2013). The root microbiota a fingerprint in the soil? *Plant Soil* 370, 671–686.

Kuan, K. B.; Othman, R.; Abdul Rahim, K.; Shamsuddin, Z. H. (2016). Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions. *PloS one*.

Leite R. M.; Cherobim, A. P. M. S.; Silva, H. F. N.; Bufre, L. S. (2008). Orçamento empresarial: levantamento da produção científica no período de 1995 a 2006 [Periódico]. - São Paulo: R. Cont. Fin. USP São Paulo. P. 56 - 72: Vols. v. 19, n. 47.

Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in enzymology*, 148, 350-382.

Lins, P.; Viégas, I. (2008). Adubação do coqueiro no Pará. Embrapa Amazônia Oriental- Documentos (INFOTECA-E).

Market Research Future. (2018). Microbial Products Market Research Report - Forecast to 2023. Disponível em: <https://www.marketresearchfuture.com>.

Martins, C. R.; Jesus, L. A. (2014). Produção e comercialização de coco no Brasil frente ao comércio internacional: panorama 2014. Documentos 184. Embrapa Tabuleiros Costeiros. Aracaju, SE. pp. 51. Matson, P.A., Parton, W.J., Power; A.G.

Matsunaga, M.; Bemelmans, P. F.; de Toledo, P. E. N. (1976). Metodologia de custo de produção utilizada pelo IEA [Brasil]. *Agricultura em Sao Paulo (Brasil)*. v. 23 (1) p. 123-139.

Nalayini, P.; Sankaranarayanan, K.; Anandham, R. (2010). Bio inoculants for enhancing the productivity and nutrient uptake of winter irrigated cotton (*Gossypium hirsutum*) under graded levels of nitrogen and phosphatic fertilizers. *Indian Journal of Agronomy*, 55(1), 64-67.

Oyoo, M. E.; Najya, M.; Githiri, S. M.; Ojwang, P. O.; Muniu, F. K.; Masha, E.; Owuochi, J. O. (2015). In-situ morphological characterization of coconut in the Coastal Lowlands of Kenya. *African Journal of Plant Science*, 9(2), 65-74.

Pagano, M.; Correa, E.; Duarte, N.; Yelikbayev, B.; O'Donovan, A.; Gupta, V. (2017). Advances in eco-efficient agriculture: the plant-soil mycobiome. *Agriculture*, 7(2), 14.

Philippot L.; Raaijmakers, J.M.; Lemanceau, P.; Van DerPutten, W.H. (2013). Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews. Microbiology*.;11(11):789.

Regar, K. L.; Yadav, J. (2017). Influence of PGPR and Zinc Enriched FYM on Growth and Yield of Rice at Different Levels of Phosphors in an Inceptisol of Varanasi, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(4), 1453-1464.

Santos, S. G.; da Silva Ribeiro, F.; Da Fonseca, C. S.; Pereira, W.; Santos, L. A.; Reis, V. M. (2017). Development and nitrate reductase activity of sugarcane inoculated with five diazotrophic strains. *Archives of microbiology*, 199(6), 863-873.

Sessitsch, A.; Brader, G.; Pfaffenbichler, N.; Gusenbauer, D.; Mitter, B. (2018). The contribution of plant microbiota to economy growth. *Microb. Biotechnol.* 11, 801–805.

Sofo, A.; Scopa, A.; Manfra, M.; De Nisco, M.; Tenore, G.; Troisi, J.; Novellino, E. (2011). *Trichoderma harzianum* strain T-22 induces changes in phytohormone levels in cherry rootstocks (*Prunus cerasus* × *P. canescens*). *Plant Growth Regulation*, 65(2), 421-425.

Stewart, A.; Hill, R. (2014). Applications of *Trichoderma* in plant growth promotion. In *Biotechnology and biology of Trichoderma* (pp. 415-428). Elsevier.

Timmusk, S.; Behers, L.; Muthoni, J.; Muraya, A.; Aronsson, A. C. (2017). Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. *Frontiers in plant science*, 8, 49.

Waziri, M.; Audu, A. A.; Suleiman, F. (2013). Analysis of some mineral elements in major coconut cultivars in Nigeria. *Journal of Natural Sciences Research*, 3(8), 7-11.

Yasmin, S.; Hafeez, F. Y.; Schmid, M.; Hartmann, A. (2013). Plant-beneficial rhizobacteria for sustainable increased yield of cotton with reduced level of chemical fertilizers. *Pak J Bot*, 45(2), 655-662.

Lista de tabelas

Tabela 1. Bioindicadores de crescimento de mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil. Parâmetros biométricos de mudas de coqueiro controle e de mudas inoculadas com *B. cereus*.

Bioindicadores	Tratamentos	
	Controle	<i>B. cereus</i>
Altura	28,70b	33,30a
Diâmetro coleto	27,34b	35,74a
Biomassa aérea	80,14b	122,35a
Biomassa raíz	72,22b	87,93a

Médias seguidas pelas mesmas letras na mesma linha não diferiram entre si a 5% de probabilidade pelo teste *t*.

Tabela 2. Estimativa do custo operacional e percentagem de cada custo obtido a produção de 1 hectare de viveiro correspondendo a 11.500 mudas para o ciclo de oito meses de idade, sem inoculação de *B.cereus*, junho de 2019.

Descrição	Especificação	Quantidade	Valor unitário	Total(R\$)	Percentagem
A-Insumos					
Sementes de anão-verde-do-brasil	ud	23.000,00	0,50	11.500,00	10,46
Sacos de polietilenos para mudas	ud	11.500,00	0,84	9.637,00	8,76
Herbicida Roudup Transorb (0, 2% p.c)	l	14,35	19,50	279,83	0,25
SAM (21%) (21% N)	kg	966,00	1,70	1.642,20	1,49
MAP (53% P2O5)	kg	1.667,50	2,30	3.835,25	3,49
Cloreto de Potassio	kg	1.610,00	1,80	2.898,00	2,64
Kieserita (17% Mg)	kg	1.610,00	1,8	2.898,00	2,64
Borogran (10%B) (1 saca)	kg	103,50	3,8	393,30	0,36
Fungicida Score (80mL/pl*0,02%, mensal)	kg	1,47	133,8	196,69	0,18
inseticida Marshal 400SC(80mL/pl*0,05%)	l	0,50	62,00	31,00	0,03
inseticida Decis 25 CE (80mL/pl*0,05%,)	l	0,50	65,00	32,50	0,03
Substrato	m3	261,50	135,00	35.302,50	32,10
Diesel (Bomba para irrigação) (~5 meses)	l	900,00	3,55	3.195,00	2,91
Subtotal A				71.841,26	65,32
B-Serviços					
Confecção de caixas de germinação	m2	43,67	60,88	2.658,63	2,42
Enchimento (mão-de-obra)	H/dia	4,6	60,88	280,05	0,25
Transporte de sementes para caixa	H/dia	4,6	60,88	280,05	0,25
encanteitamento	H/dia	4,6	60,88	280,05	0,25
capina manual	H/dia	4,6	60,88	280,05	0,25
Piqueteamento	H/dia	32,85	60,88	1.999,91	1,82
seleção e transporte	H/dia	23	60,88	1.400,24	1,27
Ensacamento de solo	H/dia	57,5	60,88	3.500,60	3,18
Transporte de saco	H/dia	57,5	60,88	3.500,60	3,18
Capina química	H/dia	2	60,88	121,76	0,11
Adubação	ud	17,25	60,88	1.050,18	0,95
irrigação	H/dia	120	60,88	7.305,60	6,64
Inspeção fitossanitaria	H/dia	23	60,88	1.400,24	1,27
Pulverizações	H/dia	46	60,88	2.800,48	2,55
Subtotal B				26.858,43	24,42
C- Depreciação					

sistema de irrigação	ha	1	10% de 300.000,00	R\$ 2.000,00	
Subtotal C				R\$ 2.000,00	1,82
D-Manutenção					
Sistema completo de irrigação	ha	1	2,5% de 300.000,00	R\$ 500,00	
Subtotal D				R\$ 500,00	0,45
Custo operacional efetivo (COE)				R\$ 101.199,69	92,02
Outras despesas (5% do COE)				R\$ 5.073,95	4,61
Juros de custeio				R\$ 3.424,92	3,11
Custo operacional total (COT)				R\$ 109.698,56	100

Tabela 3. Estimativa do custo operacional e percentagem de cada custo obtido a produção de 1 hectare de viveiro correspondendo a 11.500 mudas para o ciclo de seis meses de idade e inoculadas com *Bacillus cereus* junho de 2019

Descrição	Especificação	Quantidade	Valor unitário	Total(R\$)	Percentagem
A-Insumos					
Sementes de anão-verde-do-brasil	ud	23.000,00	0,50	11.500,00	11,77
Sacos de polietilenos para mudas	ud	11.500,00	0,84	9.637,00	9,86
Herbicida Roudup Transorb (0, 2% p.c)	l	14,35	19,50	279,83	0,29
SAM (21%) (21% N)	kg	318,78	1,70	541,93	0,55
MAP (53% P2O5)	kg	550,28	2,30	1.265,63	1,29
Cloreto de Potassio	kg	531,30	1,80	956,34	0,98
Kieserita (17% Mg)	kg	531,30	1,8	956,34	0,98
Substrato	m3	261,50	135,00	35.302,50	36,08
Tecnologia microbiana	Kg	69,00	65,00	4.485,00	4,58
Diesel (Bomba para irrigação) (~5 meses)	l	540,00	3,55	1.917,00	1,96
Subtotal A				66.841,56	68,32
B-Serviços					
Confecção de caixas de germinação	m ²	43,67	60,88	R\$ 2.658,63	2,72
Enchimento (mão-de-obra)	H/dia	4,6	60,88	R\$ 280,05	0,29
Transporte de sementes para caixa	H/dia	4,6	60,88	R\$ 280,05	0,29
encanteitamento	H/dia	4,6	60,88	R\$ 280,05	0,29
capina manual	H/dia	4,6	60,88	R\$ 280,05	0,29
Piqueteamento	H/dia	32,85	60,88	R\$ 1.999,91	2,04
seleção e transporte	H/dia	23	60,88	R\$ 1.400,24	1,43
Ensacamento de solo	H/dia	57,5	60,88	R\$ 3.500,60	3,58
Transporte de saco	H/dia	57,5	60,88	R\$ 3.500,60	3,58
Capina química	H/dia	2	60,88	R\$ 121,76	0,12
Adubação	ud	11,5	60,88	R\$ 700,12	0,72
irrigação	H/dia	72	60,88	R\$ 4.383,36	4,48
Inspeção fitossanitaria	H/dia	17,25	60,88	R\$ 1.050,18	1,07
Pulverizações	H/dia	6	60,88	R\$ 365,28	0,37
Subtotal B				20.800,87	21,26
C- Depreciação					
sistema de irrigação	ha	1		R\$ 2.000,00	
Subtotal C				R\$ 2.000,00	2,04
D-Manutenção					
Sistema completo de irrigação	ha	1		R\$ 500,00	
Subtotal D				R\$ 500,00	0,51
Custo operacional efetivo (COE)				R\$ 90.142,43	92,14
Outras despesas (5% do COE)				R\$ 4.513,61	4,61
Juros de custeio				R\$ 3.046,69	3,11
Custo operacional total (COT)				R\$ 97.702,73	100

Tabela 4. Estimativa do custo operacional para produção de mudas de coqueiro anão-verde-do-brasil, sem inoculação e com inoculação de *B. cereus* em um hectare de viveiro, junho de 2019.

Custos de produção de mudas	Tratamentos	
	Controle	<i>B. cereus</i>
Custo operacional efetivo (COE)	101.478,99	90.142,43
Outras despesas (5% do COE)	5.073,95	4.513,61
Juros de custeio	3.424,92	3.046,69
Custo operacional total (COT)	109.977,86	97.702,73
Tempo (meses)	8	6
Custo de muda	R\$ 9,56	R\$ 8,50

Conclusão geral

O uso de tecnologia microbiana na agricultura é uma ferramenta que desperta interesses sociais e econômicos, principalmente pela busca de vias sustentáveis que garantam o bom funcionamento do sistema ecológico. Nesse estudo, abordamos a importância da cultura do coqueiro para o estado do Pará e suas problemáticas, acometimento de doenças foliares e uso intensivo de insumos químicos, o que justificou a busca por tecnologias que possam atenuar os efeitos negativos. Apresentamos os efeitos benéficos do uso de *Bacillus cereus*, mostrando ser eficaz ao crescimento de mudas em condições de redução de fertilização química em 50%. Além de favorecer a redução de manchas foliares causadas por *Pestalotiopsis* sp. melhorando o sistema fotossintético e a performance das mudas em viveiro comercial. Ao ser avaliado a agroeficiência econômica, foi possível verificar que o uso de *B. cereus* promoveu mudanças significativas no manejo da produção de mudas quando comparado ao modelo convencional praticado, possibilitando redução do custo médio da muda em 11%. Deste modo, a aplicação de *B. cereus* na produção de mudas de coqueiro no Estado do Pará promove crescimento, reduz manchas foliares causadas por *Pestalotiopsis* sp. e aumenta a eficiência econômica.