

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**DIVERSIDADE GENÉTICA, DENSIDADE POPULACIONAL E  
POTENCIAL DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE  
RIZOBACTÉRIAS ASSOCIADAS AO CACAUEIRO**

**AUGUSTO CÉSAR MOURA DA SILVA**

**CRUZ DAS ALMAS - BAHIA  
MARÇO - 2007**

**DIVERSIDADE GENÉTICA, DENSIDADE POPULACIONAL E  
POTENCIAL DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE  
RIZOBACTÉRIAS ASSOCIADAS AO CACAUEIRO**

**AUGUSTO CÉSAR MOURA DA SILVA**

Engenheiro Agrônomo  
Universidade Estadual de Santa Cruz, 2005

Dissertação submetida à Câmara de Ensino de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Agrárias, Área de Concentração: Fitotecnia.

**Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Cristina Fermino Soares**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA - 2007

## FICHA CATALOGRÁFICA

S586

Silva, Augusto César Moura da

Diversidade genética, densidade populacional e potencial de promoção de crescimento de rizobactérias associadas ao cacauero / Augusto César Moura da Silva. - Cruz das Almas, BA, 2007.

78f.: il., tab., graf

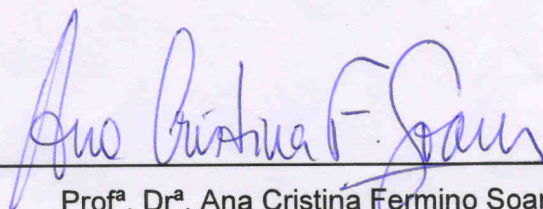
Orientador: Ana Cristina Fermino Soares.

Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2007.

1. Rizobactérias. 2. Variabilidade genética. 3. Promoção de crescimento. 4. cacauero. I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas II. Título.

CDD 20ed. 633.74

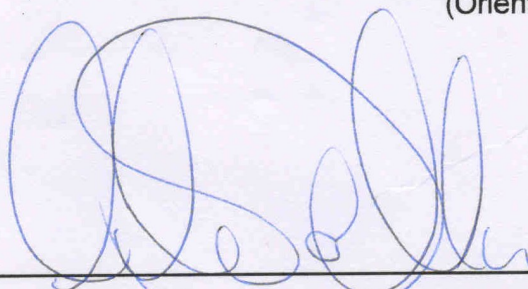
**COMISSÃO EXAMINADORA**



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Cristina Fermino Soares

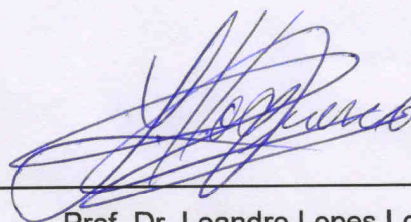
Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - UFRB

(Orientadora)



Dr. Alan William Vilela Pomella

Pesquisador – Sementes Farroupilha/MG



Prof. Dr. Leandro Lopes Loguercio

Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC

Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias em.....

Conferindo o Grau de Mestre em Ciências Agrárias em.....

Aos meus pais José Augusto e Maria do Rosário,  
pelo carinho, incentivo e exemplo de  
vida.  
Ao meu irmão André pela alegria e descontração.

**DEDICO**

A minha grande companheira Tâmara que tanto  
admiro e amo.

**OFEREÇO**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por ter me proporcionado a vida e a oportunidade de crescer com mais uma experiência.

Aos meus pais José Augusto e Maria do Rosário, por todo amor e apoio, alicerces fundamentais para que eu pudesse desenvolver este trabalho.

Ao meu irmão André pela amizade e companheirismo.

À minha noiva Tâmara pelo grande amor, carinho, amizade e apoio dedicados.

À orientadora Dra. Ana Cristina F. Soares pela amizade, paciência, atenção e fundamentais ensinamentos proporcionados.

Ao co-orientador Dr. Jorge T. de Souza pela amizade, companheirismo, dedicação e apoio incondicional durante todo o desenvolvimento da dissertação.

Aos colegas de curso, em especial Candice, Gean, Geógenes, Lauro e Leônidas pela amizade.

Aos amigos da república que proporcionaram tantas alegrias: Edivânia, Franklim, Luana, Maria Alice, Tâmara e Zuzinaide.

Aos estagiários e técnicos do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola da UFRB pela ajuda no desenvolvimento dos trabalhos.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia que me deu a oportunidade de crescer profissionalmente.

Aos funcionários do Programa de Pós-graduação, especialmente Sidinha e Til, pela atenção e carinho.

À FAPESB, pelo apoio financeiro na concessão da bolsa de Mestrado e auxílio ao projeto de dissertação, possibilitando o desenvolvimento deste trabalho.

À CEPLAC e ao IBC pelo auxílio e infra-estrutura indispensáveis para a realização do trabalho.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a execução deste Trabalho. Muito Obrigado!

*“A mente que se abre a uma idéia jamais  
voltará ao seu tamanho normal”.*

**(Albert Einstein)**

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO.....	01
Capítulo 1	
Densidade populacional de rizobactérias associadas ao cacauero na região sul da Bahia.....	18
Capítulo 2	
Diversidade genética de rizobactérias associadas ao cacauero e seu efeito no crescimento de mudas seminais .....	43
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75



# DIVERSIDADE GENÉTICA, DENSIDADE POPULACIONAL E POTENCIAL DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE RIZOBACTÉRIAS ASSOCIADAS AO CACAUEIRO

**Autor:** Augusto César Moura da Silva

**Orientadora:** Ana Cristina Fermino Soares

**RESUMO:** O objetivo desse trabalho foi estudar a densidade populacional e a diversidade genética de bactérias da rizosfera do cacau, bem como avaliar o potencial das rizobactérias na promoção de crescimento de mudas desta cultura. A densidade populacional de bactérias do gênero *Pseudomonas* é maior nas raízes da planta, enquanto a do gênero *Bacillus* é maior no solo. A caracterização fisiológica revelou que, dos isolados testados, 17,5% apresentaram atividade quitinolítica, 6,4% apresentaram atividade xilanolítica, 88,9% produziram ácido indolacético e 85,7% solubilizaram fosfato inorgânico. Nenhum isolado produziu celulase. O estudo de diversidade genética por PCR-RAPD e a identificação das rizobactérias através do sequenciamento do gene *hsp60* revelaram grande variabilidade genética e a presença de representantes das famílias *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas* spp.), *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Pantoea* spp. e *Serratia* spp.), *Flavobacteriaceae* (*Flavobacterium* spp.) e *Bacillaceae* (*Bacillus* spp.) associadas à rizosfera do cacau. A avaliação da promoção de crescimento de mudas 60 dias após a inoculação das sementes com isolados bacterianos mostrou haver efeitos benéficos ou deletérios, dependendo do isolado testado, apenas no plantio em solo, não sendo detectado efeitos no plantio em substrato Plantmax®. Houve aumento significativo na matéria seca da raiz para 17 isolados testados em solo, obtendo-se até 91,8% de incremento. Estes isolados bacterianos apresentam potencial para promoção de crescimento de mudas de cacau em solo.

**Palavras-chave:** *hsp60*, PCR-RAPD, promoção de crescimento, *Theobroma cacao*.

# GENETIC DIVERSITY POPULATION DENSITY AND POTENTIAL FOR GROWTH PROMOTION OF RHIZOBACTERIA ASSOCIATED TO CACAO

**Author:** Augusto César Moura da Silva

**Advisor:** Ana Cristina Fermino Soares

**ABSTRACT:** The objective of this work was to study the population densities, genetic diversity and the potential of cacao rhizobacteria to promote growth on cacao seedlings. The population density of bacteria from the genus *Pseudomonas* is higher on roots, while *Bacillus* is higher in the soil. Bacterial physiological characterization indicated that among the tested isolates, 17.5 % presented chitinolytic activity, 6.4 % presented xylanolytic activity, 88.9 % produced indolacetic acid, and 85.7 % solubilized inorganic phosphate. These isolates did not present cellulolytic activity. The genetic diversity study, through PCR-RAPD and the identification through *hsp60* gene sequence analyses demonstrated high genetic variability and the presence of bacteria from the following families: *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas* spp.), *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Pantoea* spp., and *Serratia* spp.), *Flavobacteriaceae* (*Flavobacterium* spp.), and *Bacillaceae* (*Bacillus* spp.). The evaluation of seedling growth promotion, 60 days after seed inoculation with rhizobacteria isolates, promoted beneficial and deleterious effects on plant growth, depending on the isolate tested, and only for seedlings grown in soil, with no effect on seedlings grown in Plantmax® potting mix. There was a significant increase in root dry weight matter for 17 isolates tested in soil, with increments of root dry matter reaching 91.8 %. These bacteria isolates presented a potential for growth promotion of cocoa seedlings.

**Key-words:** *hsp60*, PCR-RAPD, growth promotion, *Theobroma cacao*

## INTRODUÇÃO

O cacau (*Theobroma cacao*) é uma planta perene, arbórea, típica de clima tropical e nativa da região da floresta úmida da América (SOUZA & DIAS, 2001). Do fruto do cacau se extraem sementes que após sofrerem fermentação, transformam-se em amêndoas, das quais se obtêm produtos como a manteiga de cacau e o chocolate.

A principal zona produtora de cacau do Brasil está localizada na região sul baiana. Nos últimos anos, essa cultura vem sofrendo grandes danos em função da ação do fitopatógeno *Moniliophthora perniciosa* (AIME & PHILLIPS-MORA, 2005), fungo causador da doença vassoura de bruxa. Desde a sua chegada à Bahia no final da década de 1980 (PEREIRA et al., 1989), essa doença tem se disseminado rapidamente, provocando uma diminuição de aproximadamente 60 % na produção do cacau que, associada aos baixos preços do produto no mercado internacional, fez com que as divisas geradas com a cultura diminuíssem drasticamente (SANTOS FILHO et al., 1998). Também tem se observado, em menor escala, reduções na produção devido à doença podridão-parda do cacau, ocasionada pela ação de quatro espécies do gênero *Phytophthora*: *P. capsici*, *P. palmivora*, *P. citrophthora* e *P. heveae* (LUZ & SILVA, 2001).

Para tentar recuperar a cacauicultura regional, algumas medidas vêm sendo recomendadas pela CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira), dentre as quais se destacam a substituição de plantas susceptíveis por clones tolerantes à vassoura de bruxa e a condução de podas de limpeza nos plantios de cacau (ALBUQUERQUE, 2006). Nos últimos anos, algumas estratégias como o controle biológico vem se tornando uma importante alternativa no combate a diversos fitopatógenos associados a culturas de importância econômica (MENEZES, 2006). Nesse contexto, o conhecimento e aproveitamento das interações benéficas entre as plantas e os microrganismos do solo são de

fundamental importância, principalmente no processo oneroso de produção de mudas.

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de metodologias rápidas e eficientes para avaliar e monitorar a comunidade microbiana do solo, em relação a sua composição, diversidade, biomassa e seu impacto sobre a produtividade das plantas, vem sendo uma das prioridades entre diversos grupos de pesquisa (ATKINSON & WATSON, 2000; ZILLI et al., 2003) e as associações de plantas com rizobactérias vêm merecendo destaque (OLIVEIRA et al., 2003; MAZZOLA, 2004).

Bactérias associadas à rizosfera e colonizadoras de raízes de plantas podem promover efeitos benéficos às plantas, sendo estas denominadas rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs). Esse efeito benéfico das rizobactérias refere-se ao maior crescimento das plantas, refletido pela altura, crescimento das raízes, produção de biomassa vegetal, vigor e produtividade maiores, quando comparadas a plantas não associadas às RPCPs (BERTRAND et al., 2001; ROMEIRO & BATISTA, 2002). Essas bactérias têm sido estudadas em uma extensa variedade de plantas, incluindo muitas de interesse agrícola, tais como, eucalipto (MAFIA et al., 2005), citrus (ARAÚJO et al., 2001; AMORIM & MELO, 2002), milho (ARAÚJO et al., 2000), batata (REITER et al., 2002), trigo e sorgo (ZINNIEL et al., 2002), feijão (SILVEIRA et al., 1995), arroz (NANDAKUMAR et al., 2001), entre outras.

O mecanismo de promoção de crescimento vegetal por bactérias é um processo complexo que pode ser influenciado por diversos fatores abióticos (temperatura, pH, radiação, umidade, íons e elementos minerais e orgânicos do solo) e bióticos (características do hospedeiro, presença de patógenos e outros microrganismos associados à planta) (SILVEIRA, 2001; BLOEMBERG & LUGTENBERG, 2001; ARAÚJO et al., 2002). O estímulo ao crescimento vegetal por estas bactérias pode ser o resultado tanto de ações diretas, como o aumento da disponibilidade de nutrientes para a planta e a produção de substâncias reguladoras de crescimento vegetal (SHISHIDO et al., 1999; STURZ et al., 2000), como de ações indiretas, a exemplo do controle de fitopatógenos por competição, produção de sideróforos, antibiose e indução de resistência sistêmica no hospedeiro (VAN LOON et al., 1998; STURZ et al., 2000; RAMAMOORTHY et al., 2001). Vários destes mecanismos de ação podem ocorrer simultaneamente.

A extensiva colonização radicular pelas RPCPs é essencial para uma eficiente promoção de crescimento vegetal. Em raízes recém formadas, a colonização por RPCPs é mínima, mas após alguns dias, microcolônias aparecem em associação com a matéria orgânica que entra em contato com as pontas das raízes, à medida que estas crescem, e disponibilizam nutrientes como carboidratos e aminoácidos nos exsudados radiculares (FREITAS, 2006). Essa colonização ocorre rapidamente e as bactérias competem com outros microrganismos, podendo suprimir microrganismos deletérios presentes na superfície das raízes (RANGARANJAN et al., 2003). No entanto, o sucesso da introdução desses microrganismos requer que esse estabelecimento, proliferação e atividade ocorram nas condições encontradas no solo (VAN VEEN et al., 1997). Nem sempre isso acontece: se as condições não forem favoráveis, pode haver perda da atividade metabólica (SORENSEN et al., 2001).

Dentre os gêneros de rizobactérias mais estudados, pode-se citar *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Hydrogenophaga*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas* e *Burkholderia* (OLIVEIRA et al., 2003). Destas, as bactérias do gênero *Pseudomonas* se destacam devido, principalmente, à sua grande capacidade de suprimir patógenos de solo e também pela sua ocorrência no solo em elevadas populações, pelo fato de serem nutricionalmente versáteis e possuírem habilidade de crescer numa ampla faixa de condições ambientais, além de produzirem uma grande variedade de antibióticos, sideróforos e reguladores de crescimento vegetal (MELLO, 1998a).

Através da produção de reguladores de crescimento vegetal (substâncias ativas como fitohormônios), os microrganismos podem promover o estímulo ao crescimento vegetal e aumentar a produção de metabólitos pelas plantas que podem ser utilizados para o seu próprio crescimento. Esse mecanismo de interação bactéria-planta é influenciado por vários fatores como genótipo do hospedeiro e do próprio microrganismo (PATTEN & GLICK, 2002). Estudos relacionados às diversas culturas demonstraram a produção de auxinas (atuam na diferenciação celular, crescimento radicular e promoção de crescimento dos frutos), citocininas (atuam na regulação do crescimento, diferenciação e senescência vegetal), giberelinas (atuam na divisão e alongamento celular, interrupção da dormência e aumento do desenvolvimento dos frutos) e etileno (promove o amadurecimento dos frutos, abscisão de folhas, flores e frutos e

influência na expressão do sexo feminino) pela ação das rizobactérias (CATTELAN, 1999; RAVEN et al., 2001; CASSÁN et al., 2001; VERMA et al., 2001; KOENING et al., 2002). Entre os hormônios microbianos, a auxina AIA (ácido indol-3-acético) é produzida por grande parte das bactérias e a resposta das plantas pode variar de efeitos benéficos a deletérios, dependendo de sua concentração. Quando em baixas concentrações, o AIA pode estimular enquanto que em altas concentrações, pode inibir o crescimento das raízes das plantas. Os níveis de AIA produzidos pelas bactérias dependem do crescimento bacteriano, da atividade metabólica e da expressão de genes que codificam enzimas para a biossíntese de AIA (LAMBRECHT et al., 2000).

AS RPCPs podem favorecer as plantas, mineralizando e solubilizando nutrientes, deixando-os prontamente disponíveis para as raízes. A capacidade de solubilizar compostos fosfatados é uma característica importante dessas bactérias, visto que o fósforo (P) é o nutriente mais limitante ao crescimento vegetal na maioria dos solos brasileiros, porque a concentração de P livre (forma disponível para as plantas), mesmo em solos férteis, é geralmente baixa (BARROTI & NAHAS, 2000). Quase a totalidade do fosfato inorgânico solúvel aplicado regularmente nos solos agrícolas é rapidamente imobilizada logo após sua aplicação, devido a sua alta reatividade com cálcio, ferro e alumínio, tornando-o indisponível para as plantas (RODRIGUEZ & FRAGA, 1999). Os mecanismos pelos quais as bactérias solubilizam esses fosfatos envolvem a produção de CO<sub>2</sub> e ácidos orgânicos (resultantes da mineralização do C orgânico), redução de Fe<sup>3+</sup> para Fe<sup>2+</sup> (mais solúvel e facilmente assimilável pelas raízes) e produção de H<sub>2</sub>S sob baixas concentrações de O<sub>2</sub> que, em condições redutoras, favorece a solubilização de fosfatos de ferro (CATTELAN, 1999). Diferentes gêneros de bactérias foram identificados como capazes de solubilizar compostos fosfatados inorgânicos, destacando-se os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Rhizobium* como principais, e entre outros como *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aereobacter*, *Flavobacterium* e *Erwinia*. Existem populações consideráveis destes grupos de bactérias no solo e na rizosfera vegetal (RODRIGUEZ & FRAGA, 1999; RODRIGUEZ et al., 2000; VERMA et al., 2001).

O aumento no crescimento vegetal também pode ser observado pelo biocontrole de fitopatógenos (efeito indireto), através da produção de sideróforos

por RPCPs. Sideróforos são substâncias de baixo peso molecular, produzidas em situações de deficiência de ferro, capazes de imobilizar o íon férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (RAMAMOORTHY et al., 2001; PIDELLO, 2003). Como os patógenos necessitam de uma concentração de ferro de aproximadamente  $10^{-6}$  M, estes compostos atuam como promotores de crescimento pela capacidade de prevenir a proliferação de fitopatógenos no ambiente rizosférico, seqüestrando a maior parte do  $\text{Fe}^{3+}$  disponível e desta forma facilitando o crescimento vegetal (RAMAMOORTHY et al., 2001). Entretanto, os vegetais dificilmente sofrem limitações de crescimento por deficiências de ferro, e possuem inclusive moléculas de membrana receptoras do complexo ferro-sideróforo bacteriano (BAR-NESS et al. 1992). Vários fatores estão envolvidos na eficiência da supressão de organismos patogênicos associados à rizosfera, como a espécie vegetal, as características físicas e químicas do solo, o patógeno a ser suprimido, a espécie bacteriana produtora do sideróforo e a afinidade do sideróforo pelo íon ferro, entre outros. Este mecanismo de controle é eficaz somente quando a disponibilidade de  $\text{Fe}^{3+}$  é muito baixa, sendo esta disponibilidade relacionada ao pH do solo (menores valores de pH, maior disponibilidade de  $\text{Fe}^{3+}$ ) (MELLO, 1998a).

Outro mecanismo de promoção de crescimento indireto dos vegetais é a antibiose, na qual um ou mais metabólitos produzidos por um organismo têm um efeito danoso sobre o outro, inibindo o crescimento ou inativando a célula por toxicidade química (SILVEIRA, 2001). Contudo, a ação efetiva de um antibiótico contra uma população de um determinado fitopatógeno pode não ter a mesma eficiência sobre outra população da mesma espécie, pela existência de mecanismos genéticos de resistência, ou ainda por perda da eficiência devido a condições variáveis do ambiente (OLIVEIRA et al., 2003). Entre os antibióticos com propriedades de biocontrole já bem caracterizados, podemos citar as fenazinas, pioluteorinas, pirrolnitrina, piocianina, 2,4-diacetilfloroglucinol e cianeto de hidrogênio (RAMAMOORTHY et al., 2001; RAMETTI et al., 2003). São conhecidas produtoras de antibióticos, espécies de bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* fluorescentes, *Streptomyces*, entre outros (MELLO, 1998b).

Algumas rizobactérias promotoras de crescimento são capazes de induzir resistência sistêmica em plantas. A ISR (Induced Systemic Resistance) pode ser

definida como um processo de defesa ativa da planta, em que esta utiliza múltiplos mecanismos induzidos sistemicamente por rizobactérias e que se apresenta eficiente contra uma variedade de patógenos de plantas (LUZ, 1996). Alguns dos mecanismos propostos para indução de resistência sistêmica em plantas por RPCPs incluem vários processos fisiológicos, tais como: aumento da produção das proteínas solúveis em ácido (ZDOR & ANDERSON, 1992), acúmulo de fitoalexinas (VAN PEER et al., 1991), lignificação (HOFFLAND & BIK, 1993), produção de ácido salicílico em baixa concentração de ferro (LEEMAN et al., 1995) e estímulo da atividade da peroxidase (WEI et al., 1996). Os agentes de indução são geralmente substâncias produzidas por essas rizobactérias, como por exemplo, lipossacarídeos presentes no exterior da membrana de células bacterianas, sideróforos e ácido salicílico (RAMAMOORTHY et al., 2001; WHIPPS, 2001).

Outros importantes mecanismos de supressão de patógenos por rizobactérias são a produção de enzimas líticas que atuam na lise de células fúngicas, como quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases, que degradam a quitina e o glucano presentes nas paredes dos fungos, a produção de ácido cianídrico (HCN) e a degradação de toxinas produzidas pelos patógenos (BERG et al., 2000; RAMAMOORTHY et al., 2001).

A detecção de metabólitos produzidos pelas rizobactérias, bem como a identificação e a utilização desses microorganismos foram facilitadas pelo advento da biotecnologia que na sua amplitude, engloba técnicas que usam organismos vivos ou partes destes para produzir ou modificar produtos, melhorar geneticamente as plantas ou animais e modificar geneticamente microorganismos para fins específicos. Os produtos biotecnológicos encontram aplicação nos campos científico, agrícola, médico e ambiental (AMBIENTE BRASIL, 2006).

O uso dos métodos moleculares oferece respostas às perguntas sobre diversidade microbiana, taxonomia de microorganismos e seus mecanismos de ação e permite acompanhar o destino de microorganismos introduzidos no ambiente (ROSADO et al., 1997; SCHLOTTER et al., 2003). Embora exista um grande número de técnicas moleculares que revelam polimorfismo de DNA, é importante considerar o tipo de organismo em estudo. O método de amplificação de ácidos nucleicos conhecido como PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foi



concebido em 1983 por Kary Mullis (Saiki et al., 1985) e tornou-se uma das mais importantes inovações científicas das últimas décadas. O PCR utiliza uma DNA polimerase termoestável para produzir múltiplas cópias de regiões específicas do DNA, incluindo regiões não-codificadoras ou genes específicos. Os produtos obtidos após amplificação podem ser analisados através de eletroforese em gel de agarose, quanto ao tamanho do fragmento amplificado (ROSADO & DUARTE, 2002; REIS JÚNIOR et al., 2002). Atualmente, o PCR tornou-se uma das técnicas mais simples e rápidas para a identificação e comparação de microrganismos. Estratégias variadas usando a técnica de PCR têm sido descritas e utilizadas para identificar genes que são característicos de uma espécie em particular, auxiliando na identificação dos microrganismos. Entretanto, apesar da grande contribuição das novas ferramentas moleculares para estudos sobre a biodiversidade, as técnicas tradicionais de enriquecimento e cultivo são também importantes para o conhecimento da capacidade metabólica e das características fenotípicas dos microrganismos, sendo necessária uma abordagem através de vários enfoques (polifásica) para se chegar o mais próximo possível do quadro real de um ambiente (MUYZER & SMALLA, 1998).

Dentre as técnicas da biologia molecular mais utilizadas no estudo da diversidade e identificação de rizobactérias destacam-se: mapas de restrição; hibridização DNA-DNA ou DNA-RNA; seqüências de subunidades do rRNA; RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*); ARDRA (*Amplified Ribossomal DNA Restriction Analysis*); RISA (*Ribossomal Intergenic Spacer Analysis*); DGGE (*Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis*) e comparação de seqüências de diversos genes (RANJARD et al., 2000; NANNIPIERI et al., 2003; KIRK et al., 2004). A busca de um método que não requer nenhuma informação prévia acerca da seqüência-alvo resultou na técnica denominada RAPD (OLIVEIRA et al., 2000). O RAPD utiliza como iniciadores, oligonucleotídeos curtos (geralmente decâmeros) de seqüência arbitrária. Esse método consiste na escolha arbitrária de um único oligonucleotídeo iniciador (*primer*), combinado com ciclos de baixa stringência resultando em fragmentos amplificados característicos de um genoma em particular (FUNGARO & VIEIRA, 1998), os quais, após separação por eletroforese em gel, produzem um padrão de bandas específico conhecido como impressão digital genômica (*DNA fingerprint*). Os *fingerprints* permitem distinguir

diferentes espécies e até mesmo populações distintas da mesma espécie. O RAPD é o método de escolha para muitos estudos, uma vez que é rápido e relativamente simples, além de não requerer informações acerca da seqüência nucleotídica do DNA genômico (OLIVEIRA et al. 2000; REIS JÚNIOR et al. 2002). Essa técnica pode ser utilizada para avaliar a diversidade genética dentro de grupos microbianos e associá-las ao nicho ocupado (OLIVEIRA et al., 2000; ARAÚJO et al., 2001).

As regiões do DNA bacteriano que codificam o RNA estrutural das subunidades menores dos ribossomos (rDNA) são altamente conservadas no genoma e podem ser hibridizadas com os genes de rDNA de muitas espécies de microrganismos (WOESE, 1987), bem como terem suas seqüências determinadas através de sequenciamento para a posterior determinação das espécies por comparação com seqüências conhecidas depositadas nos bancos de dados. Os genes de rDNA em bactérias estão organizados em unidades transcricionais denominadas *operons*, nos quais estão os genes individuais dos rRNA 16S, 23S e 5S que são separados por seqüências não codificadas (MACRAE, 2000).

Vários estudos com bactérias foram realizados utilizando o gene 16S rDNA. Contudo, pesquisas mostram que para alguns gêneros, esse gene apresenta algumas limitações (REVA et al., 2004), principalmente por existirem várias cópias diferenciadas desse gene em uma única célula bacteriana. Esta heterogeneidade pode inviabilizar muitos estudos taxonômicos e levar pesquisadores a conclusões errôneas a respeito da identificação de bactérias. Por esses motivos, outros genes estão sendo adotados na identificação e em estudos taxonômicos (YAMAMOTO & HARAYAMA, 1995; DAHLLOF et al., 2000; SOUZA et al., 2003). Genes mais específicos apresentam inúmeras vantagens em relação ao 16S, entre elas, a presença de uma única cópia por célula e uma evolução mais acelerada que o 16S, permitindo a identificação de espécies filogeneticamente próximas (FOX et al., 1992). Assim, a busca por esses genes é uma realidade quando se deseja identificar bactérias (SOUZA et al., 2003).

Genes considerados marcadores altamente específicos vêm sendo utilizados na identificação e filogenia de bactérias, como: genes *gyrB*, que codificam a proteína da subunidade B do DNA gyrase (necessária para a

replicação do DNA); genes *gacA*, que influenciam na produção de vários metabólitos secundários em espécies patogênicas e benéficas de *Pseudomonas* spp.; genes *rpoB*, que codificam a subunidade  $\beta$  da RNA polimerase; genes *cheA*, que codificam uma histidina quinase; genes *ompA*, que codificam uma proteína da membrana externa e genes *hsp60*, que codificam uma proteína de choque térmico (*Heat Shock Protein*) (LAWRENCE et al., 1991; HEDEGAARD et al., 1999; KASAI et al., 2000; DAUGA, 2002). Proteínas de choque térmico representam um grupo particular de proteínas que têm merecido destaque principalmente por constituírem uma resposta comum nos mais distintos organismos, sendo conservada ao longo de toda a escala evolutiva (KWOK et al., 1999). Esta resposta pode ser observada nas arqueobactérias, eubactérias (LINDQUIST & GRAIG, 1988), fungos, plantas e animais (VIERLING, 1991), inclusive seres humanos (RIZZO et al., 1998), onde podem estar relacionadas com a resposta do sistema inume. A tendência atual é a utilização de múltiplos genes (no mínimo dois ou três) na identificação e filogenia de bactérias (YAMAMOTO et al., 1999; WANATABE et al., 2001).

Diante do exposto, o presente trabalho objetivou quantificar a população de bactérias totais e dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* presentes na rizosfera de cacauero, verificar a diversidade existente entre os isolados obtidos através da técnica RAPD e avaliar o potencial de alguns isolados na promoção de crescimento em mudas seminais de cacauero em substrato comercial não-estéril (Capítulo 1). Também foi interesse de estudo a caracterização fisiológica e a variabilidade genética dos isolados através do sequenciamento do gene *hsp60*, além da promoção de crescimento em mudas seminais de cacauero em solo não-estéril (Capítulo 2).

## REFERÊNCIAS

AIME, M. C.; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, v.97, n.5, p.1012-1022, 2005.

ALBUQUERQUE, P. S. B. **Mapas de ligação e identificação de Locos Controladores de características quantitativas (QTLs) associados à resistência a *Crinipellis pernicios* em acessos de cacauero (*Theobroma***

**cacao) originários da Amazônia brasileira.** 2006, 133p., Tese (Doutorado em Agronomia). Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.

AMBIENTE BRASIL. **Glossário/b.** Disponível em: <http://www.ambientebrasil.com.br/composer.php3?base=./educacao/index.php3&conteudo=./glossario/b.html>>. Acessado em Dezembro de 2006.

AMORIM, E. P. R.; MELO, I. S. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasítica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citrus. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v.24, n.2, p.565-568, 2002.

ARAÚJO, J. M.; SILVA, A. C.; AZEVEDO, J. L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.) **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.43, p.447-451, 2000.

ARAÚJO, W. L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; AGUIAR-VILDOSO, C. I.; BARROSO, P. A. V.; SARIDAKIS, H. O.; AZEVEDO, J. L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p.229-236, 2001.

ARAÚJO, W. L.; MARCON, J.; MACCHERONI JUNIOR, W.; VAN ELSAS, J. D.; VAN VUURDE, J. W. L.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.4906-4914, 2002.

ATKINSON, D.; WATSON, C. A. The Beneficial Rhizosphere: a dynamic entity. **Applied Soil Ecology**, v.15, p.99-104, 2000.

BAR-NESS, E.; HADAR, Y.; SHANZER, A.; LIBMAN, J. Iron uptake by plants from microbial siderophores. A study with 7-nitrobenz-2 Oxa-1,3-diazole-desferrioxamine as fluorescent ferrioxamine B analog. **Plant Physiology**, Bethesda, v.99, p.1329-1335, 1992.

BARROTI, G.; NAHAS, E. População microbiana total e solubilizadora de fosfato em solo submetido a diferentes sistemas de cultivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.2043-2050, 2000.

BERG, G.; KURZE, S.; BUCHNER, A.; WELLINGTON, E. M.; SMALLA, K. Successful strategy for the selection of new strawberry-associated rhizobacteria antagonist to *Verticillium* wilt. **Canadian Journal of Microbiology**, v.46, p.1-10, 2000.

BERTRAND, H., NALIN, R., BALLI, R., CLEYET-MAREL, J. C. Isolation and identification of the most efficient plant growth promoting bacteria associated with canola (*Brassica napus*). **Biology and Fertility Soils**, v.33, p.142-156. 2001.

BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. **Current Opinion in Plant Biology**, v.4, p.343-350, 2001.

CASSÁN, F. D.; LUCANGELI, C. D.; BOTTINI, R.; PICCOLI, P. N. *Azospirillum* spp. metabolize [17,17-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]gibberellin A<sub>20</sub> to [17,17-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]gibberellin A<sub>1</sub> *in vivo* in dry ice mutant seedlings. **Plant Cell Physiology**, v.42, p.763-767, 2001.

CATTELAN, A. J. **Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Londrina: Embrapa Soja, 36p. (Embrapa Soja. Documentos, 139), 1999.

DAHLLOF, I.; BAILLIE, H.; KJELLEBERG, S. rpoB-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.3376-3380, 2000.

DAUGA, C. Evolution of the gyrB gene and the molecular phylogeny of *Enterobacteriaceae*: a model molecule for molecular systematic studies. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.52, p.531-547, 2002.

FREITAS, L. G. **Rizobactérias versus nematóides**. Artigo da Universidade Federal de Viçosa: [www.ufv.br/dfp/lab/nematologia/rizo.pdf](http://www.ufv.br/dfp/lab/nematologia/rizo.pdf). Acessado em Dezembro de 2006.

FOX, G. E.; WISOTZKEY, J. D.; JURTSCHUK, P. J. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. **International Journal Systematic Bacteriology**, v.42, p.166-170, 1992.

FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. Aplicações da PCR em ecologia molecular. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Eds.). **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa/CNPMA, p.205-227, 1998.

HEDEGAARD, J.; STEFFENSEN, S. A.; NORSKOV-LAURITSEN, N.; MORTENSEN, K. K.; SPERLING-PETERSEN, H. U. Identification of *Enterobacteriaceae* by partial sequencing of the gene encoding translation initiation factor 2. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.49, p.1531-1538, 1999.

HOFFLAND, E.; BIK, L. *Pseudomonas*-induced resistance against *Fusarium* wilt In: International Congress of Plant Pathology, Montreal, Canada, **International Society of Plant Pathology**, p.216 (abstr), 1993.

KASAI, H.; TAMURA, T.; HARAYAMA, S. Intrageneric relationships among *Micromonospora* species deduced from *gyrB*-based phylogeny and DNA relatedness. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, DC, v.50, p.127-134, 2000.

KIRK, J. L.; BEAUDETTE, L. A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J. N.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiology Methods**, v.58, p.169-188, 2004.

KOENING, R. L.; MORRIS, R. O.; POLACCO, J. C. tRNA is the source of low-level trans-zeatin production in *Methylobacterium* spp. **Applied Environmental Microbiology**, v.184, p.1832-1842, 2002.

KWOK, A. Y. C.; SU, S. C.; REYNOLDS, R. P.; BAY, S. J.; AV-GAY, Y.; DOVICH, N. J.; CHOW, A. W. Species identification and phylogenetic relationships based on partial HSP60 gene sequences within the genus *Staphylococcus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.49, p.1181-1192, 1999.

LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; BROEK, A. V.; VANDERLEYDEN, J. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signaling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, v.8, p.298-300, 2000.

LEEMAN, M.; VAN PELT, J. A.; HENDRICKX, M. J.; SCHEFFER, R. J.; BAKKER, P. A. H. M.; SCHIPPERS, B. Bicontrol of fusarium wilt of radish in commercial greenhouse trial by seed treatment with *Pseudomonas fluorescens* WCS374, **Phytopathology**, v.85, p.1301-1305, 1995.

LAWRENCE, J. G.; OCHMAN, H.; HARTL, D. L. Molecular and evolutionary relationships among enteric bacteria. **Journal of General Microbiology**, v.137, p.1911-1921, 1991.

LINDQUIST, S.; GRAIG, E. A. The heat shock proteins. **Annual Reviews of Genetics**, Palo Alto, v.22, p.631-677, 1988.

LUZ, W. C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v.4, p.1-50, 1996.

LUZ, E. D. M. N.; SILVA, S. D. V. M. Podridão-parda dos frutos, cancro e outras doenças causadas por *Phytophthora* no cacauzeiro. In: LUZ, E. D. M. N.; SANTOS, A. F. D.; MATSUOKA, K.; BEZERRA, J. L. (Eds.). **Doenças causadas por Phytophthora no Brasil**. Campinas, Livraria Editora Rural, p.175-265, 2001.

MACRAE, A. The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.31, p.77-82, 2000.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; FERREIRA, E. M.; ZARPELON, T. G.; SIQUEIRA, L. Crescimento de mudas e produtividade de minijardins clonais de eucalipto tratados com rizobactérias selecionadas. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.29, p.843-851, 2005.

MAZZOLA, M. Assessment and management of soil microbial community structure for disease suppression. **Annual revision of Phytopatology**, v. 42, p. 35-59, 2004.

MELLO, I. S. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas: descrição e potencial de uso na agricultura. In: MELLO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (ed.) **Ecologia microbiana**. Brochura: Embrapa Meio Ambiente, p.88-112, 1998a.

MELLO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELLO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Controle Biológico**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, v.1, p.17-67, 1998b.

MENEZES, J. P. 2006. **Controle biológico**. Agronline.com.br. Disponível em: <<http://www.agronline.com.br/artigos/artigo.php?id=42>>. Acessado em: 10 de Dezembro de 2006.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Mini review**. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.73, p.127-141, 1998.

NANDAKUMAR, R.; BABU, S.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.33, p.603-612, 2001.

NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M. T.; LANDI, L.; PIETRAMELLARA, G. E.; RENELLA, G. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, v.54, p.655-670, 2003.

OLIVEIRA, I. A.; VASCONCELLOS, M. J.; SELDIN, L.; PAIVA, E.; VARGAS, M. A.; SÁ, N. M. H. Random amplified polymorphic DNA analysis of effective *Rhizobium* sp. associated with beans cultivated in Brazilian cerrado soils. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.31, p.39-44, 2000.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA S.; BALDANI, J. I. **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal**.

Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 40p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 161), 2003.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.3795-3801, 2002.

PEREIRA, J. L.; RAM, A.; FIGUEIREDO, J. M.; ALMEIDA, L. C. Primeira ocorrência da Vassoura-de-bruxa na principal região produtora de cacau do Brasil. **Agrotropica**, v.1, n.1, p.79-81, 1989.

PIDELLO, A. The effect of *Pseudomonas fluorescens* strains varying in pyoverdine production of the soil redox status. **Plant and Soil**, v.253, p.373-379, 2003.

RAMAMOORTHY, V.; VIWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systems resistance by plant growth promotion rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, v.20, p.1-11, 2001.

RAMETTI, A.; MOENNE-LOCCOZ, Y.; DEFAGO, G. Prevalence of fluorescent *Pseudomonas* producing antifungal phloroglucinols and/or hydrogen cyanide in soils naturally suppressive or conducive to tobacco black root rot. **FEMS Microbiology Ecology**, v.44, p.35-43, 2003.

RANGARANJAN, S.; SALEENA, L. M.; VASUDEVAN, P.; NAIR, S. Biological suppression of rice diseases by *Pseudomonas* spp. under saline soil conditions. **Plant and Soil**, v.251, p.73-82, 2003.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environmental. **Research in Microbiology**, v.151, p.167-177, 2000.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. Regulando o crescimento e o desenvolvimento: os hormônios vegetais. In: RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. (Eds.). **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.28, p.646-675, 2001.

REIS JÚNIOR, F. B.; MENDES, I. C.; TEIXEIRA, K. R. S.; REIS, V. M. **Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo**. Planatina, DF:Embrapa Cerrados, 33p. (Documentos, 51), 2002.

REITER, B.; PFEIFER, U.; SCHWAB, H.; SESSITSCH, A. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* sbsp. *Atrospica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.2261-2268, 2002.



REVA, O. N.; DIXELIUS, C.; MEIJER, J.; PRIEST F. G. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. **FEMS Microbiology Ecology**, v.48, p.249–259, 2004.

RIZZO, M.; ALEVY, Y. G.; SUNDARESAN, S.; LYNCH, J.; TRULOCK, E. P. COOPER, J. D.; PATTERSON. G. A.; MOHANALUMAR, T. Increased expression of HDJ-2 (heat shock protein 40) and heat shock portein 70 in biopsy specimens of transplanted human lungs. **The Journal of Heart and Lung Transplant**, v.17, n.3, p.341-349, 1998.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v.17, p.319-339, 1999.

RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; SELMAN, G. Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. **Journal of Microbiology**, v.84, p.155-161, 2000.

ROMEIRO, R. S.; BATISTA, U. G. (2002) Preliminary results on PGPR research at the Universidade Federal de Viçosa, Brasil. [http\\:www.ufv.br/dfp/bac/Cordoba.html](http://www.ufv.br/dfp/bac/Cordoba.html). Acessado em Dezembro de 2006.

ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J. D. Molecular Microbial Ecology: a minireview. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.28, p.135-147, 1997.

ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F. Utilização de eletroforese em gel com gradientes de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura para estudar a diversidade microbiana. In: **Genética e melhoramento de microrganismos**. MELLO, I. S. (ed). EdUSP, São Paulo, p.97-129, 2002.

SAIKI, R. K.; SCARF, F.; FALOONA, F. A.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, DC, v.230, p.1350-1354, 1985.

SANTOS FILHO, L. P.; FREIRE, E. S.; CARZOLA, I. M. Estimativas de Perdas de Produção de Cacau por Vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer) na Bahia. **Agrotrópica**, v.3, p.127-130, 1998.

SCHLOTTER, M.; DILLY, O.; MUNCH, J. C. Indicators for evaluating soil quality. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v.98, p.255-262, 2003.

SHISHIDO, M.; BREUIL, C.; CHANWAY, C. P. Endophytic colonization of spruce by growth-promotion rhizobacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v.29, p.191-196, 1999.

SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S.; SILVA, L. R. C.; LOMBARDI, M. L. C. O.; CARDOSO, E. J. B. N. Interações de micorrizas arbusculares e rizobactérias promotoras do crescimento em plantas de feijão. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.19, p.205-211, 1995.

SILVEIRA, E. B. Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontrole de doenças. In: MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. (Eds.). **Proteção de Plantas na Agricultura Sustentável**. Recife, UFRPE, 2001.

SORENSEN, J.; JENSEN, L. E.; NYBROE, O. Soil and rhizosphere as habitats for *Pseudomonas* inoculants: new knowledge on distribution, activity and physiological state derived from micro-scale and single-cell studies. **Plant and Soil**, v.232, p.97-108, 2001.

SOUZA, C. A. S.; DIAS, L. A. S. Melhoria Ambiental e Socio-econômico. In: DIAS, L. A. S. (Ed.). **Melhoramento Genético do Cacaueiro**. Viçosa:FUNAPE-UFG, p.01-47, 2001.

SOUZA, J. T.; MAZZOLA, M.; RAAIJMAKERS, J. M. Conservation of the response regulator gene *gacA* in *Pseudomonas* species. **Environmental Microbiology**, v.5, p.1328-1340, 2003.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potencial role developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.19, p.1-30, 2000.

VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M.; PIETERSE, C. M. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Reviews in Phytopathology**, v.36, p.453-483, 1998.

VAN PEER, R.; NIEMANN, G. J.; SCHIPPERS, B. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biology control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp.strain WCS417r. **Phytopathology**, v.81, p.728-734, 1991.

VAN VEEN, J. A.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.61, n.2, p.121-135, 1997.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v.91, p.127-141, 2001.

VIERLING, E. The role of Heat Shock Proteins in Plants. **Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.42 p.579-620, 1991.

WANATABE, K.; NELSON, J. S.; SHIGEAKI, H.; KSAI, H. ICB database: the *gyrB* database for identification and classification of bacteria. **Nucleic Acids Research**, London, v.29, p.344-345, 2001.

WEI, G.; KLOEPPER, J. W.; TUZUN, S. Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. **Phytopathology**, v.86, n.2, p.221-224, 1996.

WOESE, C. R. Bacterial Evolution. **Microbiological Reviews**, v.51, n.2, p.221-271, 1987.

WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v.52, p.487-511, 2001.

YAMAMOTO, S.; HARAYAMA, S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.3, p.1104-1109, 1995.

YAMAMOTO, S.; BOUVET, P. J. M.; HARAYAMA, S. Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on *gyrB* sequences: comparison with the grouping by DNA-DNA hybridization. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, DC, v.49, p.87-95, 1999.

ZDOR, R.; ANDERSON, A. J Influence of root colonizing bacteria on the defense responses of beans. **Bulletin-SROP**, v.14, n.8, p.187-190, 1992.

ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. C.; NEVES, M. C. P. N. Diversidade microbiana como indicador de qualidade de solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v.20, n.3, p.391-411, 2003.

ZINNIEL, D. K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N. B.; FENG, Z.; KUCZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C. A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R. G.; VIDAVER, A. K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.2198-2208, 2002.

# **CAPÍTULO 1**

## **DENSIDADE POPULACIONAL DE RIZOBACTÉRIAS ASSOCIADAS AO CACAEIRO NA REGIÃO SUL DA BAHIA<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup> Artigo submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Brazilian Journal of Microbiology

## DENSIDADE POPULACIONAL DE RIZOBACTÉRIAS ASSOCIADAS AO CACAUUEIRO NA REGIÃO SUL DA BAHIA

### RESUMO

O estudo da comunidade microbiana associada a uma cultura é de grande importância, principalmente quando se busca o conhecimento de microrganismos capazes de estimular o melhor desenvolvimento de plantas, como as rizobactérias promotoras de crescimento. Este trabalho teve o objetivo de estudar a densidade populacional e a diversidade genética de bactérias da rizosfera do cacauueiro, além de avaliar o potencial de alguns isolados bacterianos na promoção de crescimento de mudas desta cultura. A quantificação das populações de bactérias totais, *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp. em duas localidades e em plantios com mais e com menos de três anos de idade, revelou diferenças significativas entre as populações presentes nas raízes e no solo destes plantios. As densidades populacionais de bactérias totais e *Pseudomonas* spp. são maiores nas raízes enquanto que as de *Bacillus* spp. são maiores no solo. A diversidade genética estudada pela técnica PCR-RAPD mostrou uma grande variabilidade das rizobactérias associadas à cultura, sendo definidos 12 grupos bacterianos ao nível de 51 % de similaridade. A avaliação do número de folhas, altura da planta, matéria seca da parte aérea e raiz de mudas de cacauueiro, inoculadas com 22 isolados de rizobactérias via semente, mostrou não haver diferenças significativas para nenhum dos parâmetros analisados. Estes isolados bacterianos não apresentaram potencial de promoção de crescimento de mudas de cacauueiro em substrato orgânico comercial.

**Palavras-chave:** Rizobactérias, quantificação, RAPD, *Theobroma cacao*.

## POPULATION DENSITY OF RIZOBACTERIA ASSOCIATED WITH CACAO CROP IN THE SOUTHERN REGION OF BAHIA STATE

### ABSTRACT

The study of microbial communities associated to a crop is very important, mainly when searching for plant growth promoting microorganisms, such as rhizobacteria. This work had the objective of studying the population density and genetic diversity of cacao rhizosphere bacteria, and also the potential of some bacteria for growth promotion of cacao seedlings. The quantification of total bacteria, *Pseudomonas* spp., and *Bacillus* spp. populations in two cacao orchards, in plants with more than three years of age and plants with less than three years of age, showed significant differences between the population density in roots and in soil from these orchards. The population densities from total bacteria and *Pseudomonas* spp. were higher in the roots, while those of *Bacillus* spp. were higher in the soil. The genetic diversity studied with PCR- RAPD technique indicated a high variability of rhizobacteria associated to cacao crop, with 12 groups of bacteria being differentiated at a level of 51 % of similarity. The evaluation of leaf number, plant height, shoot and root dry weight of cacao seedlings inoculated with 22 rhizobacteria isolates, did not show any significant differences for the parameters evaluated. These isolates did not present the potential for growth promotion of cacao seedlings in commercial organic plant growth potting mix.

**Key-words:** Rhizobacteria, quantification, RAPD, *Theobroma cacao*

## INTRODUÇÃO

O cacaeiro (*Theobroma cacao*) é uma planta perene, arbórea, típica de clima tropical e nativa da região da floresta úmida da América (Souza & Dias, 2001). A principal área produtora de cacau do Brasil está localizada na região sul do Estado da Bahia. Contudo, nos últimos anos, essa cultura vem sofrendo grandes danos em função da ação do fitopatógeno *Moniliophthora perniciosa* (Aime & Phillips-Mora, 2005), fungo causador da vassoura de bruxa.

Para tentar recuperar a cacauicultura, algumas medidas vêm sendo recomendadas pela CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira), dentre as quais se destacam a substituição de plantas suscetíveis por clones tolerantes à vassoura de bruxa e a condução de podas de limpeza nos plantios de cacau (Albuquerque, 2006). Algumas estratégias de controle biológico com isolados de *Trichoderma stromaticum* vêm se tornando também, uma importante alternativa no combate à vassoura de bruxa (Souza et al., 2006).

Para a produção de mudas de cacaeiro tolerantes à vassoura de bruxa, com boa qualidade nutricional e fitossanitária, o conhecimento e aproveitamento das interações benéficas entre plantas e microrganismos do solo são de fundamental importância, principalmente no processo de produção de mudas, o qual é oneroso e, por ser conduzido em recipientes pequenos e em condições de viveiro ou casa de vegetação, permite a inoculação das plantas com microrganismos promotores de crescimento.

O solo se encontra entre os habitats mais complexos do globo terrestre, cuja interação da sua microbiota com as plantas representa um mecanismo vital para a sustentabilidade da produção agrícola (Fonseca et al., 2000). Dentre os microrganismos benéficos presentes no solo, as bactérias denominadas de rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCPs) têm merecido destaque, por estimularem o desenvolvimento de uma gama de espécies vegetais anuais, a exemplo da abóbora (Chen et al., 2000), alface (Freitas et al., 2003) e tomate (Sousa et al., 2006) e perenes, como eucalipto (Mafia et al., 2005) e citrus (Amorim & Melo, 2002).

Na cultura do cacaeiro, o período de formação de mudas em viveiro representa uma fase onerosa, na qual o uso de RPCPs pode gerar benefícios significativos. Em plantas anuais, o benefício das RPCPs é dado pelo aumento da

produção de massa seca da parte aérea e raiz, podendo resultar em encurtamento do ciclo da planta ou aumento na produtividade, dependendo da espécie vegetal e do isolado bacteriano (Freitas et al., 2003). Em plantas perenes, principalmente as culturas que passam por um período de viveiro, como o cacauzeiro, é altamente desejável obter um isolado bacteriano eficiente que possa aumentar a qualidade nutricional e fitossanitária das mudas e diminuir seu tempo de permanência em viveiro (Freitas & Aguilar-vildoso, 2004), constituindo-se em uma alternativa para a melhoria do processo de produção de mudas, com redução nos custos.

O crescimento vegetal por RPCPs é dado principalmente pela solubilização de fosfatos, fixação do nitrogênio atmosférico, produção de substâncias reguladoras de crescimento vegetal e outros metabólitos secundários (sideróforos,  $\beta$ -1,3 glucanase, quitinases e antibióticos), pela inibição de microrganismos deletérios e pela indução de resistência sistêmica nas plantas (Sturz et al., 2000; Ramamoorthy et al., 2001).

Dentre os vários gêneros de bactérias benéficas presentes no solo, grande ênfase tem sido dada aos gêneros *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* spp. em sistemas de produção agrícola, devido às suas características altamente desejadas em termos de promoção de crescimento de plantas de interesse econômico, tais como, capacidade de produção de diversos metabólitos secundários, grande versatilidade nutricional, habilidade de crescer em uma ampla variedade de ambientes e o potencial de colonização das raízes (Chanway et al., 2000; Aagot et al., 2001).

Mesmo dentro de cada gênero de RPCPs, existe uma imensa variabilidade fenotípica e, principalmente, genotípica entre os isolados estudados (Spiers et al., 2000). Uma das técnicas de grande auxílio nas pesquisas com genética de microrganismos é a utilização de marcadores moleculares do tipo RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), baseada na amplificação de fragmentos aleatórios, por meio de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). A técnica de RAPD permite de forma rápida e relativamente barata a avaliação da diversidade genética entre indivíduos ao nível de DNA (Coutinho et al., 1999; Zilli et al., 2003). Araújo et al. (2001) isolaram fungos e bactérias de tecidos foliares de citrus e testaram a variabilidade genética por RAPD de 36 isolados de duas espécies de bactérias encontradas, *Bacillus pumilus* e *Pantoea agglomerans*, observando uma maior



diversidade na primeira em relação à segunda. Bactérias endofíticas isoladas de raízes de cana-de-açúcar foram investigadas por Sumam et al. (2001). Neste estudo, 22 linhagens bacterianas foram comparadas morfolologicamente, bioquimicamente e geneticamente por RAPD. A diversidade estimada por RAPD foi mais evidente que a obtida pela análise dos caracteres morfológicos e bioquímicos.

Estudos sobre bactérias da rizosfera do cacau ainda não foram realizados. Assim, os objetivos deste trabalho foram estudar a densidade populacional de bactérias na rizosfera do cacau, a diversidade genética dos isolados obtidos e o potencial de alguns isolados bacterianos para a promoção de crescimento em mudas de cacau.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Quantificação e isolamento de rizobactérias do cacau

Amostras de solo e de raízes de cacau, na área de projeção da copa das plantas, foram coletadas de jardins clonais de cacau do Instituto Biofábrica de Cacau (IBC) e da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (Ceplac), ambos localizados no município de Ilhéus - Bahia, e acondicionadas em sacos plásticos. Em cada área (IBC e Ceplac), as amostras foram coletadas em um plantio de cacau com mais de três anos de idade (denominada de cacau velho) e em um plantio de cacau com até três anos de idade (denominada de cacau novo), totalizando quatro locais de coleta (Velho IBC; Novo IBC; Velho Ceplac; Novo Ceplac). Em cada local, foram coletadas sub-amostras de solo e raízes, na projeção da copa de seis plantas escolhidas aleatoriamente, sendo estas misturadas para formar uma amostra composta. As características químicas e físicas das amostras de solo estão apresentadas na Tabela 1.

A quantificação populacional bacteriana, dividida em três grupos (bactérias totais, *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp.), foi determinada pelo método de diluição seriada seguido de plaqueamento em meio de cultura, conforme descrito a seguir. Inicialmente, para cada amostra, de cada local, separou-se o solo das raízes. Em seguida, fez-se a diluição seriada (1:10) de cada amostra, colocando-se 10 g de raiz ou de solo em frascos de Erlenmeyer contendo 90 mL de solução

salina (NaCl a 0,85 %) estéril, sendo este agitado em agitador orbital por 30 minutos, a temperatura ambiente ( $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Após esse período, fez-se a diluição seriada ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) em tubos de ensaio com 9 mL de solução salina (NaCl a 0,85 %) estéril e o plaqueamento em meio de cultura, sendo o inóculo espalhado com o auxílio de uma alça de Drigalsky estéril. Foram plaqueadas três repetições para cada diluição de cada amostra de solo e de raiz. Utilizou-se o meio nutriente ágar - NA (Levine, 1954) com ciclohexamida (10 mg/L) para a determinação da densidade populacional das bactérias totais, o meio NAA (Aagot et al., 2001) com 50 mg de Casamino Acids (Difco) para a quantificação de *Pseudomonas* spp. e o meio ATCC 573, com a seguinte composição:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  - 1,3 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,37 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,25 g;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  - 0,07 g;  $\text{FeCl}_3$  - 0,02 g; glicose - 1,0 g; extrato de levedura - 1,0 g; ágar - 25 g; água destilada - 1000 mL e ciclohexamida (10 mg/L), para a população de *Bacillus* spp. Antes do plaqueamento em meio ATCC 573, as diluições das amostras de solo e raízes foram incubadas a  $80^\circ\text{C}$  por 10 minutos, em banho-maria (Sneath, 1986). O meio NA foi utilizado por permitir o crescimento de uma ampla gama de gêneros de bactérias encontradas no solo e na rizosfera (Levine, 1954). O meio ATCC 573, juntamente com o tratamento térmico, e o meio NAA permitem o crescimento de *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* spp., respectivamente (Sneath, 1986; Aagot et al., 2001).

As placas foram incubadas em condições de temperatura ambiente ( $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ), sendo as populações bacterianas avaliadas após 36-48 horas. O cálculo das populações bacterianas foi determinado pela contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) resultante da seguinte fórmula:  $\text{UFC} \cdot \text{g}^{-1} = N \times 10 \times F \times Y$ , sendo: N = o número de colônias, F = 20 (fator de correção do plaqueamento de 50  $\mu\text{l}$  de suspensão por placa para 1 mL), Y = fator de diluição da amostra. Para a análise estatística, os dados foram transformados em  $\log(x + 1)$ , em que x corresponde ao número de UFC. Foi utilizado o programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000) para a realização da análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Este trabalho foi repetido nas mesmas condições experimentais e a análise estatística foi realizada separadamente.

As colônias obtidas no meio NA, correspondentes às bactérias totais foram repicadas para meio NA para obtenção de culturas puras e transferidas para frascos de vidro contendo água estéril, os quais foram em seguida vedados com

tampa de borracha e filme PVC, para preservação das culturas. Todos os isolados foram codificados e os frascos com as culturas foram mantidos a temperatura ambiente.

**Tabela 1.** Propriedades físico-químicas das amostras de solo coletadas para o isolamento das bactérias.

Amostra/ Local*	pH	cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup>				g/dm <sup>3</sup>	mg/dm <sup>3</sup>					g/kg		
		H <sub>2</sub> O	Al	Ca	Mg	K	C	P	Fe	Zn	Cu	Mn	Areia	Silte
Velho IBC	4,8	0,8	4,4	1,6	6,0	18,24	115	73	6	6	63	569	212	219
Novo IBC	4,9	1,2	4,2	1,0	5,2	21,36	184	87	5	25	31	559	221	220
Velho Ceplac	5,5	0	14,9	3,9	18,8	39,48	20	30	27	129	185	333	511	156
Novo Ceplac	5,4	0	13,2	4,0	17,2	25,20	17	93	29	18	206	381	448	171

\* Amostras coletadas no IBC (Instituto Biofábrica de Cacau) e na Ceplac (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira), em plantios de cacauzeiro com mais de três anos de idade (Velho) e com menos de três anos de idade (Novo).

### Diversidade genética de rizobactérias

Foram utilizados 63 isolados para o estudo de diversidade genética através da técnica de RAPD. Desses isolados, quatro (353, 369, 629 e 684) foram obtidos do interior de cacauzeiros sadios e gentilmente cedidos pelo Centro de Estudos do Cacau Almirante Cacau – Agrícola, Comércio e Exportação LTDA, para servirem como padrões de comparação. Para a extração do DNA genômico, os isolados de rizobactérias foram crescidos em meio TSA (peptona - 5 g; triptona - 15 g; NaCl - 5 g; ágar - 15 g; água destilada - 1000 mL) e após 24 horas, colônias de cada isolado foram transferidas para tubos de microcentrifuga de 1 mL contendo 100 µL de solução tampão de lise celular (0,05 M NaOH + 0,25 % SDS) e incubados em banho-maria por 15 minutos a 100 °C. Em seguida, os tubos contendo as amostras foram centrifugados a 10.000 rpm por 1 minuto em microcentrifuga (Eppendorf 5417R) e o DNA no sobrenadante foi coletado, diluído 20 vezes em água MilliQ e preservado a -20 °C.

Amostras de DNA de cada isolado foram amplificadas pela técnica PCR-RAPD. As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 25 µl, contendo Tris-HCl 10 mM, (pH 8,3), MgCl<sub>2</sub> 2 mM, 200 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dGTP e dCTP) [Promega, Madison, WI, USA], 40 pmol de *primer* (Operon Technologie Inc., Alameda, CA, EUA), 1 U da Taq polimerase e 30 ng de DNA. Os *primers* decâmeros: D7 (TTGGCACGGG), M12 (GGGACGTTGG) e M13 (GGTGGTCAAG) foram utilizados neste trabalho para obtenção dos marcadores RAPD. Esses *primers* foram selecionados por produzirem um distinto e consistente padrão de bandas em bactérias (Keel et al., 1996). As amplificações foram efetuadas em termociclador PTC-100 (MJ Research Inc., Watertown, MA), programado com a seguinte seqüência de passos: 94 °C por 2 minutos, seguidos de 40 ciclos de 94 °C por 15 segundos, anelamento de *primers* a 35 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 90 segundos. Após os 40 ciclos, foi feita uma etapa de extensão final de 7 minutos a 72 °C e, finalmente, a temperatura foi reduzida para 4 °C.

Após a amplificação, foram adicionados a cada amostra 5 µl de corante (azul de bromofenol a 0,25 % e glicerol a 60 % em água MilliQ). Essas amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,5 %) contendo brometo de etídio, submerso em tampão TAE (Tris-Acetato 90 mM e EDTA 1 mM). O DNA *ladder* de 100 pb foi utilizado como marcador de peso molecular. A separação eletroforética foi de 3 horas a 100 Volts. Ao término da corrida, os géis foram fotografados em transiluminador de UV e fotodocumentados. A presença ou ausência de bandas geradas pela análise de RAPD foram convertidas em uma matriz de dados binários (1 para presença e 0 para ausência de um particular tamanho de banda no gel), que foi usada para calcular o coeficiente de similaridade Nei-Li. As análises de agrupamento com o método *neighbor-joining* e análise de *bootstrap* foram realizadas com o programa FreeTree (Hampel et al., 2001). O dendrograma foi editado e visualizado no TreeView (Page, 1996) e a confiabilidade do dendrograma foi testada por meio de análise de *bootstrap* com 1000 reamostragens.

### **Promoção de crescimento de mudas de cacauero**

Nas instalações do Instituto Biofábrica de Cacau (IBC) em Ilhéus, Bahia, foi montado um experimento para avaliar o potencial de rizobactérias associadas ao

cacaueiro, na promoção de crescimento de mudas seminais. Foram escolhidos 22 isolados de rizobactérias, representantes dos diferentes grupos bacterianos obtidos pela análise RAPD.

Cada isolado foi cultivado separadamente em meio TSA a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  e após 48 horas de crescimento, as colônias foram ressuspensas em água destilada e esterilizada. A concentração de cada suspensão foi ajustada para aproximadamente  $10^8$  UFC/mL, utilizando como referência a turbidez 0,5 da escala de McFarland. Em paralelo, de forma asséptica, foi retirado o tegumento das sementes de cacaueiro do tipo comum e feita a desinfestação das sementes, com imersão por 10 minutos em hipoclorito de sódio (2,5 % de cloro ativo), seguida de três lavagens com água destilada esterilizada.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 23 tratamentos (22 isolados de rizobactérias + 1 controle) e 20 repetições. As sementes foram submersas na suspensão bacteriana por 30 minutos e semeadas logo em seguida em tubetes de  $288\text{ cm}^3$  contendo o substrato não esterilizado Plantmax® (casca de *Pinus* sp. processada, vermiculita expandida, turfa processada e enriquecida e carvão granulado) adicionado à fibra de coco na relação 1:1 (v:v), conforme protocolo do IBC. O tratamento controle consistiu na imersão das sementes em água destilada esterilizada por 30 minutos.

Os tubetes foram mantidos em viveiro telado (50 % de sombra, à temperatura ambiente) e regime de irrigação de 40 segundos de aspensão, três vezes ao dia. Após 60 dias no viveiro, as mudas foram coletadas, avaliando-se os seguintes parâmetros: número de folhas, altura da planta, massa seca da parte aérea e massa seca da raiz. A biomassa seca foi determinada após a eliminação dos resíduos de substrato da raiz e separação da parte aérea. A parte aérea e as raízes foram secas em estufa com ventilação forçada a  $70^\circ\text{C}$  até atingir massa constante. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000), sendo realizada a análise de variância (ANOVA) e em seguida, a comparação das médias pelo teste de Scott & Knott a 5 % de probabilidade. Este experimento foi repetido nas mesmas condições experimentais e avaliado separadamente.

## RESULTADOS

### Densidade populacional de grupos bacterianos na rizosfera do cacauero

A densidade populacional de bactérias foi diferente ( $P<0,05$ ) no solo e nas raízes de cacauero, para algumas amostras (Tabela 2). As maiores populações de bactérias totais e de *Pseudomonas* spp. foram observadas nas amostras de raízes (Tabela 2). O contrário foi verificado na quantificação de *Bacillus* spp., para a qual, a maior densidade foi observada na amostra de solo. De forma geral, o número de bactérias presentes nas amostras da Ceplac foi superior ao do IBC ( $P<0,05$ ). Em relação às bactérias totais, houve diferença significativa apenas entre as amostras de cacauero com mais de três anos de idade da Ceplac, sendo a população encontrada na amostra de raízes superior à encontrada no solo.

Com relação ao gênero *Pseudomonas*, as amostras provenientes do IBC apresentaram quantidades superiores de bactérias nas raízes ( $P<0,05$ ). No gênero *Bacillus* foi verificada diferença significativa ( $P<0,05$ ) em ambas as amostras da Ceplac, sendo os valores superiores nas amostras de solo, quando comparadas com as amostras de raízes (Tabela 2).

Nas amostras de raízes e nas amostras de solo, o gênero *Bacillus* representou em média, 2,4 % e 25,4 % do total de bactérias, respectivamente, enquanto que o gênero *Pseudomonas* representou 1,7 % e 1,1 % desse total (Tabela 2). Os resultados da repetição deste estudo foram semelhantes.

**Tabela 2.** Densidade populacional bacteriana na rizosfera do cacauero.

Amostra/Local*	UFC.g <sup>-1</sup>						%**			
	Bactérias Totais		<i>Pseudomonas spp.</i>		<i>Bacillus spp.</i>		<i>Pseudomonas spp.</i>		<i>Bacillus spp.</i>	
	Raízes	Solo	Raízes	Solo	Raízes	Solo	Raízes	Solo	Raízes	Solo
Velho IBC	5,30 x 10 <sup>7</sup> a	2,50 x 10 <sup>7</sup> a	1,01 x 10 <sup>6</sup> a	1,0 x 10 <sup>5</sup> b	3,56 x 10 <sup>6</sup> a	5,82 x 10 <sup>6</sup> a	1,92	0,41	6,75	23,25
Novo IBC	8,23 x 10 <sup>8</sup> a	1,90 x 10 <sup>8</sup> a	1,94 x 10 <sup>7</sup> a	1,80 x 10 <sup>5</sup> b	5,79 x 10 <sup>6</sup> a	1,25 x 10 <sup>7</sup> a	2,31	0,09	0,70	6,57
Velho Ceplac	1,21 x 10 <sup>9</sup> a	1,53 x 10 <sup>8</sup> b	1,52 x 10 <sup>7</sup> a	4,26 x 10 <sup>6</sup> a	1,84 x 10 <sup>7</sup> b	7,73 x 10 <sup>7</sup> a	1,26	2,79	1,53	50,67
Novo Ceplac	7,07 x 10 <sup>8</sup> a	2,10 x 10 <sup>8</sup> a	1,02 x 10 <sup>7</sup> a	2,38 x 10 <sup>6</sup> a	6,84 x 10 <sup>6</sup> b	4,43 x 10 <sup>7</sup> a	1,45	1,13	0,97	21,11
<b>Médias</b>	6,98 x 10 <sup>8</sup> a	1,44 x 10 <sup>8</sup> b	1,14 x 10 <sup>7</sup> a	1,73 x 10 <sup>6</sup> b	8,65 x 10 <sup>6</sup> b	3,49 x 10 <sup>7</sup> a	1,73	1,10	2,49	25,4

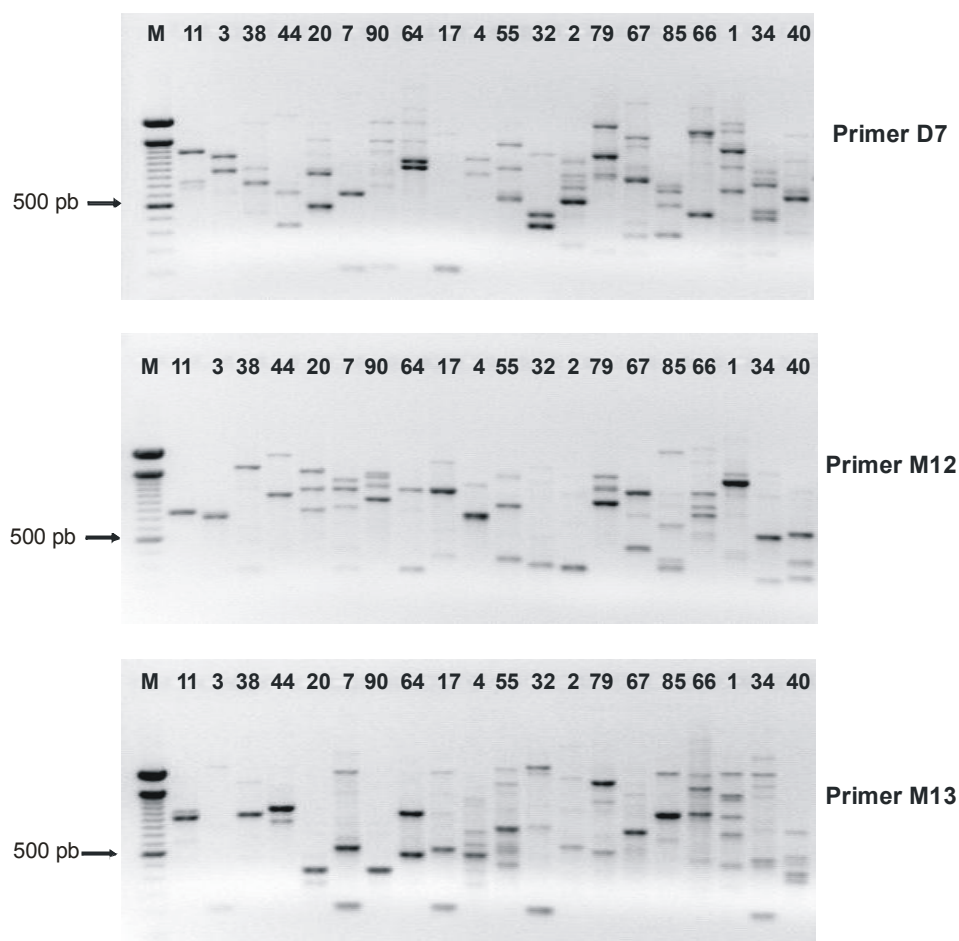
\* Amostras coletadas no IBC e na Ceplac, em plantios de cacauero com mais de três anos de idade (Velho) e com menos de três anos de idade (Novo).

\*\* Porcentagem em relação à população de bactérias totais.

Dentro de cada grupo ou gênero bacteriano, médias seguidas de mesma letra na linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

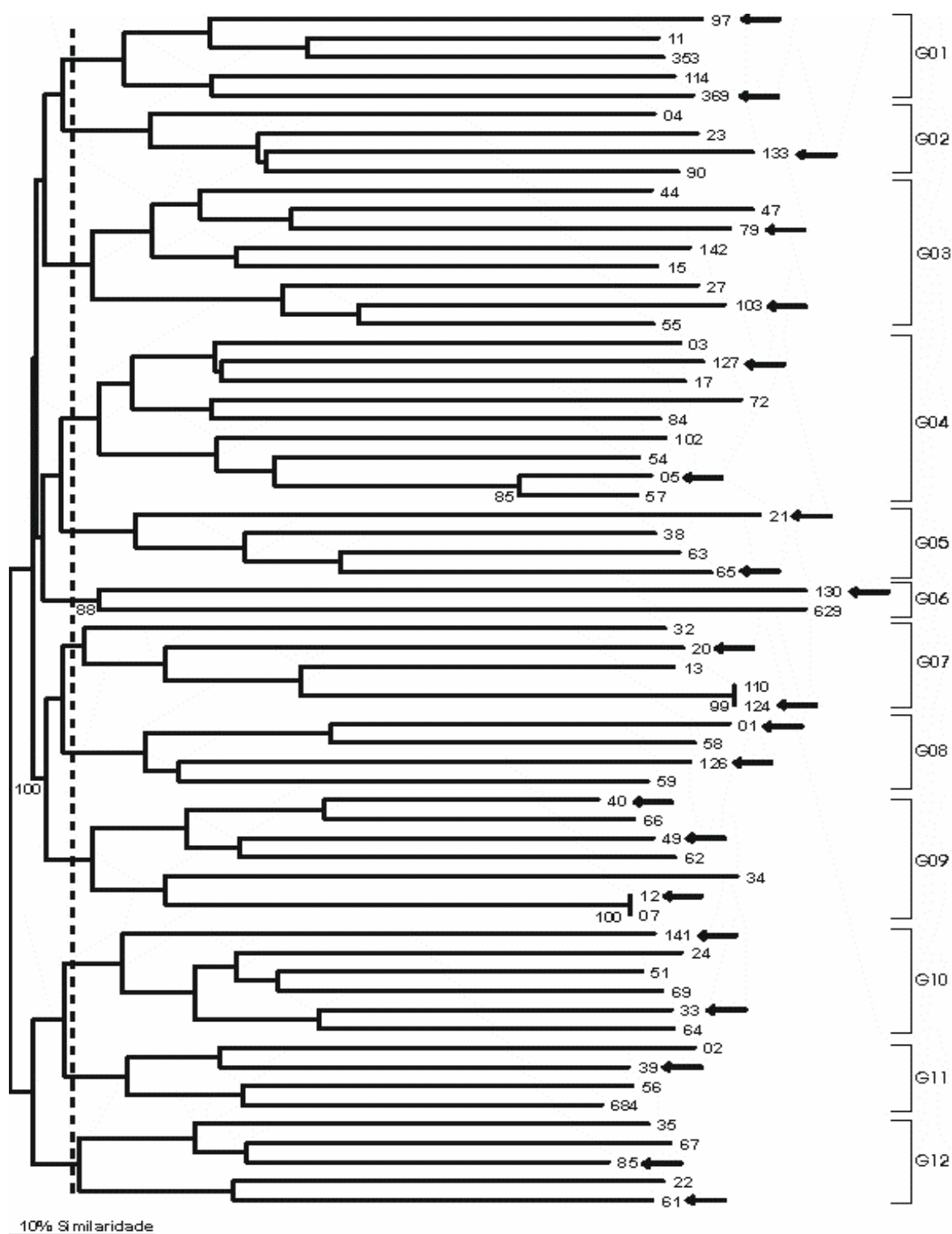
### Diversidade genética

Sessenta e três isolados bacterianos foram obtidos da rizosfera do cacauero e utilizados para o estudo da diversidade genética. A amplificação do DNA desses isolados, pela técnica de PCR-RAPD com três *primers* decâmeros (D7, M12 e M13) gerou um total de 87 bandas polimórficas, algumas delas ilustradas na Figura 1. A análise mostrou que há uma grande diversidade entre os isolados, formando pelo menos doze grupos genéticos, com aproximadamente 51 % de similaridade (Figura 2). Alto grau de similaridade foi verificado apenas entre os isolados 110 e 124 (99 %) e entre os isolados 12 e 07 (100 %).



**Figura 1.** Perfil de RAPD obtido para 20 isolados de rizobactérias de cacauero, utilizando os *primers* D7, M12 e M13. (M) marcador de peso molecular – 100pb.

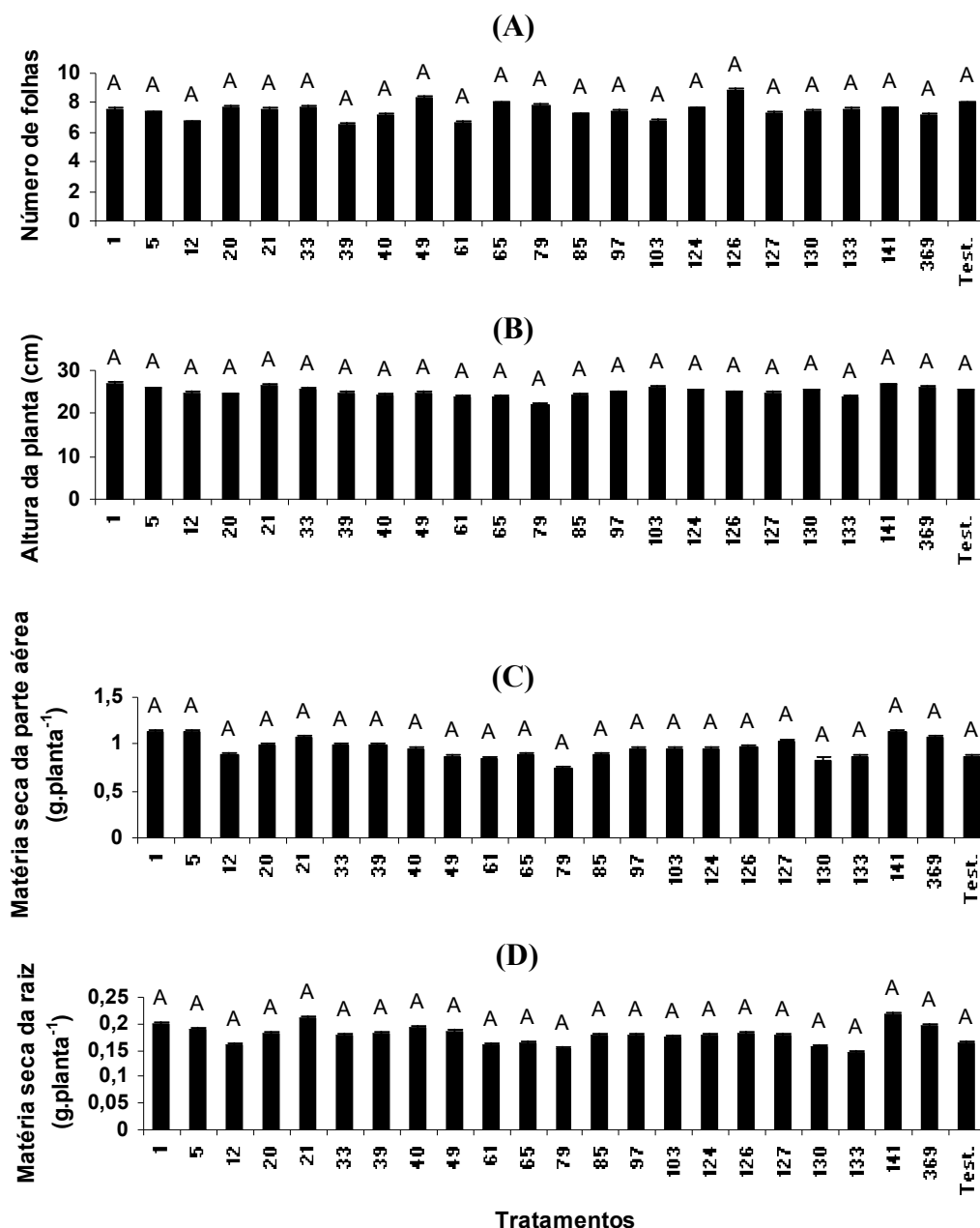




**Figura 2.** Dendrograma de isolados de rizobactérias do cacauero baseado em marcadores RAPD. Os coeficientes de similaridade de Nei-Li foram agrupados através do método Neighbor-Joining. Os grupos finais (isolados individuais) foram definidos com base em 100 % de similaridade. A linha tracejada indica similaridade de 51 % entre os isolados e define 12 grupos bacterianos (G01 a G12). A análise de *bootstrap* foi feita com base em 1000 repetições e valores  $\geq 70$  % são mostrados. As setas indicam os isolados selecionados para o estudo de promoção de crescimento em mudas de cacauero.

### Promoção de crescimento

Não foi constatada diferença significativa ( $P>0,05$ ) para os parâmetros avaliados no estudo de promoção de crescimento, com os isolados escolhidos a partir do dendograma resultante da análise RAPD, mesmo sendo encontrados incrementos de até 10,6 % para número de folhas (isolado 126), 6,1 % para altura da planta (isolado 01), 31,8 % e 31,7 % para matéria seca da parte aérea (isolados 01 e 05) e raiz (isolado 141), respectivamente (Figura 3).



**Figura 3.** Crescimento de mudas seminais de cacauero inoculadas com rizobactérias. (A) - Número de folhas; (B) - Altura das plantas; (C) - Matéria seca da parte aérea e (D) - Matéria seca da raiz. Foi utilizado o substrato Plantmax® não esterilizado e as avaliações foram efetuadas 60 dias após inoculação das sementes com isolados de rizobactérias. Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Skott & Knott ( $P<0,05$ ).

## DISCUSSÃO

Neste trabalho estudaram-se as densidades populacionais, a diversidade genética e o potencial de bactérias associadas à rizosfera do cacauzeiro para promover o crescimento desta cultura. Estudos semelhantes para a cultura do cacauzeiro não foram encontrados na literatura científica.

Em se tratando da quantificação bacteriana, o número de colônias encontradas foi superior nas amostras de raízes de cacauzeiro, em relação ao número de colônias nas amostras de solo, possivelmente devido à presença de exsudatos radiculares que são fontes de nutrientes para os microrganismos. Lamb et al. (1996) e Elvira-Recueno et al. (2000) relatam que as populações bacterianas são maiores nas raízes do que em qualquer outro órgão vegetal ou no solo. As populações na rizosfera podem ser 100 vezes superiores às observadas no solo adjacente (Siqueira & Franco, 1988). Contudo, neste estudo foram verificadas exceções para alguns gêneros de bactérias, a exemplo do gênero *Bacillus* que apresentou maiores populações nas amostras de solo. A população de bactérias totais e de *Pseudomonas* spp. foi, respectivamente, 4,84 e 6,62 vezes maior nas raízes do que no solo, enquanto a de *Bacillus* spp. foi 6,62 vezes mais abundante no solo que na raiz. As flutuações nas comunidades estão relacionadas com características do micro-ambiente, do genótipo da planta e/ou do próprio microrganismo. Os resultados deste trabalho demonstram que existe uma preferência de micro-habitats entre os grupos de bactérias estudadas. Enquanto *Pseudomonas* spp. foi mais abundante nas raízes de cacauzeiro, maior quantidade de *Bacillus* spp. foi encontrada no solo (Tabela 2). Fora da influência das raízes, o solo pode ser considerado menos rico em nutrientes, por não estar sob a influência dos exsudatos radiculares. Portanto, para alguns microrganismos qualquer característica que permita a sua permanência nesse ambiente reflete na sua capacidade competitiva (Grayston & Jones, 1996). A maior abundância de bactérias do gênero *Bacillus* no solo ocorre possivelmente devido à capacidade de produção de endosporos por estas bactérias, enquanto bactérias que não produzem essas estruturas de sobrevivência, como as *Pseudomonas* spp., preferem a região da rizosfera. Tem-se observado que os bacilos esporulantes (*Bacillus* spp.) e os cocos gram-positivos são inibidos na rizosfera das plantas cultivadas, enquanto os bastonetes gram-negativos como *Pseudomonas* spp.,

*Agrobacter* spp., *Beijerinckia* spp., *Rhizobium* spp. e *Azospirillum* spp. são estimulados (Siqueira & Franco, 1988). As bactérias com exigências nutricionais simples e aquelas que exigem a presença de aminoácidos são também estimuladas na rizosfera (Drozdowicz, 1991). Mocali et al. (2003), verificaram diferenças entre as populações de isolados de *Pseudomonas* spp. e de *Curtobacterium* spp. em olmo (*Ulmus* spp.), sendo observado maior população de *Pseudomonas* spp. nas raízes, enquanto que *Curtobacterium* spp. foi mais comumente encontrada em outros órgãos da planta e no solo.

Algumas propriedades do solo podem ter influenciado a população bacteriana. As amostras com densidades superiores de bactérias (Velho Ceplac e Novo Ceplac), apresentaram pH mais alto e maior conteúdo de Ca, Mg, K, C, Cu e Mn, além de teores mais baixos de areia e mais altos de silte (Tabela 1).

Smit et al. (2001) demonstraram que em solos com alto teor de nutrientes disponíveis há uma maior densidade bacteriana e uma seleção positiva de bactérias das divisões  $\alpha$  e  $\gamma$ -proteobacteria (*Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp., *Rhizobium* spp.), isto é, predominam bactérias com altas taxas de crescimento. Por sua vez, nos solos com baixo teor de nutrientes disponíveis, ou alto teor de substratos recalcitrantes, a quantidade e diversidade bacteriana são menores e predominam bactérias com baixo potencial de crescimento, mas com alta capacidade de competição por substratos. Sessitsch et al. (2001) observaram que as bactérias estão localizadas em microporos de microagregados (2-20  $\mu$ m). Esses micro-habitats oferecem condições favoráveis para o crescimento bacteriano, devido à disponibilidade de água e substrato e difusão de gases. Esses autores também sugerem que o tamanho das partículas possui grande impacto na diversidade de microrganismos e que a maior diversidade e densidade estão na fração silte e argila do solo enquanto que a menor encontra-se na fração areia. Oliveira et al. (2003) relatam que a sobrevivência de espécies bacterianas na rizosfera possui correlação positiva com parâmetros físicos do solo, como o teor de argila e silte, de matéria orgânica e de nitrogênio, e uma correlação negativa com o teor de areia e carbonato de cálcio. Assim, a maior densidade bacteriana observada nas amostras coletadas na Ceplac, em comparação com as amostras do IBC, pode ter sido fortemente influenciada pelas propriedades físicas do solo (silte e areia). Entretanto, outros estudos com um número maior de amostras devem ser conduzidos para se comprovar estas hipóteses.

A análise RAPD mostrou um grande polimorfismo genético entre os isolados de rizobactérias do cacauero, sendo observados diversos grupos e subgrupos bacterianos. Esse resultado confirma a grande diversidade genética existente entre os microrganismos, que excede, em muito, a diversidade dos organismos eucariontes (Ward, 1998; Hunter-Cevera, 1998).

Rosseló-Mora & Amann (2001) relatam que um grama de solo pode conter até 10 bilhões de microrganismos, representando milhares de espécies. Estudos filogenéticos mostram que a distância filogenética entre dois grupos de bactérias, as halofílicas e espiroquetas, é 2,5 vezes maior que a distância entre os animais e as plantas. Figueiredo et al. (2003) estudando a variabilidade genética e relações filogenéticas de rizobactérias do milho, demonstraram com a técnica de RAPD a existência de polimorfismo, mesmo para isolados que previamente apresentaram padrões morfológicos e bioquímicos similares. Sabe-se que os microrganismos, em especial as bactérias, representam o repertório mais rico em diversidade genética e química na natureza, constituindo a base de processos ecológicos, como os ciclos biogeoquímicos e a cadeia trófica, além de manterem relações vitais entre si e com os organismos superiores (Hunter-Cevera, 1998).

O estudo de promoção de crescimento demonstrou que nas condições experimentais testadas, os isolados de rizobactérias avaliados não foram capazes de estimular o crescimento das mudas de cacauero e nem tiveram efeito deletério ao seu crescimento.

Na literatura científica consultada, não foram encontrados estudos referentes à promoção de crescimento e diversidade genética de rizobactérias na cultura do cacauero, o que evidencia a necessidade de maiores estudos para a seleção de rizobactérias benéficas, frente à ampla diversidade associada ao solo e raiz de cacauero. Seleções preliminares devem envolver um grande número de isolados, principalmente porque aproximadamente 99 % das rizobactérias não apresentam a capacidade de estimular o crescimento vegetal (Chen et al., 1996).

Contudo, as rizobactérias podem promover incrementos significativos no crescimento e produtividade de diversas culturas anuais (Freitas et al., 2003; Gomes et al., 2003; Sousa et al., 2006). Estudos sobre a interação de plantas perenes com RPCPs não são tão abundantes, mas Chanway et al. (2000), demonstraram que isolados de *Pseudomonas* spp. promoveram efeitos significativos na produção de matéria seca e na altura de plantas de abeto (*Picea*

*glauca*). Freitas (1989) detectou aumentos significativos na altura e matéria seca em plântulas de cafeeiro tratadas com isolados de *Pseudomonas* spp. Nesse caso, não foi detectada grande variabilidade dos dados referentes à matéria seca e à altura, mas sim, relativos aos teores de micronutrientes na parte aérea das plântulas. Mafia et al. (2005) obtiveram um aumento médio de 55 % na biomassa radicular de mudas clonais de eucalipto, quando tratadas com rizobactérias.

Neste trabalho, demonstrou-se que na cultura do cacaueteiro, as populações de bactérias totais e de *Pseudomonas* spp., são maiores nas raízes do que no solo, enquanto que as populações de *Bacillus* spp. são maiores no solo. Apesar das análises de RAPD demonstrarem a existência de uma grande diversidade de bactérias associada à rizosfera da cultura, nenhum dos isolados testados foi capaz de promover o crescimento de mudas.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAGOT, N.; NYBROE, O.; NIELSEN, P.; JOHNSEN, K. An altered *Pseudomonas* diversity is recovered from soil by using nutrient-poor *Pseudomonas*-selective soil extract media. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.11, p.5233–5239, 2001.

AIME, M. C.; PHILLIPS-MORA, W. The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae. **Mycologia**, v.97, n.5, p.1012-1022, 2005.

ALBUQUERQUE, P. S. B. **Mapas de ligação e identificação de Locos Controladores de características quantitativas (QTLs) associados à resistência a *Crinipellis pernicios*a em acessos de cacaueteiro (*Theobroma cacao*) originários da Amazônia brasileira**. 2006, 133p., Tese (Doutorado em Agronomia). Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.

AMORIM, E. P. R.; MELO, I. S. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasítica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citrus. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v.24, n.2, p.565-568. 2002.

ARAÚJO, W. L.; MACCHERONI Jr., W.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; BARROSO, P. A. V.; SARIDAKIS, H. O.; AZEVEDO, J. L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, n.3; p.229-236, 2001.

CHANWAY, C. P.; SHISHIDO, M.; NAIRN, J.; JUNGWIRTH, S.; MARKHAM, J.; XIAO, G.; HOLL, F. G. Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. **Forest Ecology and Management**, v.133, p.81-88, 2000.

CHEN, Y.; MEI, R.; LIU, L.; KLOEPPER, J. W. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in Chinese agriculture. In: UTKHEDE, R. S.; GUPTA, V. K. (Eds.) **Management of Soil Born Disease**, Ludhiana: Kalyani Publishers, p.165-184, 1996.

CHEN, C.; BÉLANGER, R. R.; BENHAMOU, N.; PAULITZ, T.C. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. **Physiology Molecular Plant Pathology**, v.56, p.13-23, 2000.

COUTINHO, H. L. C.; OLIVEIRA., V. M. ; MANFIO, G. P.; ROSADO, A. S. Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological innovations. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.71, n.3, p.491-503, 1999.

DROZDOWICZ, A. G. Microbiologia ambiental. In: ROITMAN, I.; TRAVASSOS, I. R.; AZEVEDO, J. L., (Ed.). **Tratado de Microbiologia**. Rio de Janeiro: Manole, v.2. p.1-102, 1991.

ELVIRA-RECUENCO, M.; VAN VUURDE, J. W. L. Natural incidence of endophytic bacteria in peacultivars under field conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, v.46, p.1036-1041, 2000.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria. São Carlos, **Programas e Resumos...** São Carlos: UFSCar. V.45, p.255-258, 2000.

FIGUEIREDO, J. E. F.; QUINTÃO, P. L.; PAOLI, H. C.; COELHO, V. T. S.; BRESSAN, W.; GUIMARÃES, C. T.; GOMES, E. A. **Caracterização molecular de microrganismos isolados do ecossistema agrícola do cerrado: Bactérias endofíticas do milho.** Sete lagoas – MG, Embrapa Milho e sorgo, 10p. (Embrapa Milho e Sorgo, Comunicado Técnico, 66), 2003.

FONSECA, M. C. C.; ZAGO, V. C. P.; FERREIRA, E. P. B., CÂMARA, A. F. S.; RUMJANEK, N. G. **Isolamento e caracterização morfológica de *Pseudomonas* spp. fluorescentes nativas em sistemas de produção agrícola.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 4p. (Embrapa Agrobiologia. Comunicado técnico, 43), 2000.

FREITAS, S. S. Desenvolvimento de plântulas de café pela inoculação de *Pseudomonas* sp. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.13, p.31-34, 1989.

FREITAS, S. S.; MELLO, A. M. T.; DONZELI, V. P. Promoção do crescimento de alface por rizobactérias. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.27, p.61-70, 2003.

FREITAS, S. S.; AGUILAR-VILDOSO, C. I. A. Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.28, p.987-994, 2004.

GOMES, A. M. A.; MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; MESQUITA, J. C. P. Isolamento, seleção de bactérias e efeito da utilização de *Bacillus* spp. na produção de mudas orgânicas de alface. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.21, n.4, p.699-703, 2003.



GRAYSTON, S. J.; JONES, D. V. D. Rhizosphere carbon flow in trees, in comparison with an annual plant: the importance of root exudation and its impact on microbial activity and nutrient availability. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.5, n.1, p.29-56, 1996.

HAMPL, V.; PAVLICEK, A.; FLEGR, J. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: application to trichomonad parasites. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.731-735, 2001.

HUNTER-CEVERA, J. C. The value of microbial diversity. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, v.1, n. 3, p.278-285, 1998.

KEEL, C.; WELLER, D. M.; NATSCH, A.; DÉFAGO, G.; COOK, R. J.; THOMASHOW, L. S. Conservation of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent *Pseudomonas* strains from diverse geographic locations. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.552-563, 1996.

LAMB, T. G.; TONKYN, D. W.; KLUEPFEL, D. A. Movement of *Pseudomonas aureofaciens* from the rhizosphere to aerial plant tissue. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, p.1112-1120, 1996.

LEVINE, M. **An introduction to laboratory technique in bacteriology**. New York: Mac Millan, p.68-79, 1954.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; FERREIRA, E. M.; ZARPELON, T. G.; SIQUEIRA, L. Crescimento de mudas e produtividade de minijardins clonais de eucalipto tratados com rizobactérias selecionadas. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.29, p.843-851. 2005.

MOCALI, S.; BERTELLI, E.; DI CELLO, F.; MENGONI, A.; SFALANGA, A.; VILIANI, F.; CACIOTTI, A.; TEGLI, S.; SURICO, G.; FANI, R. Flutuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. **Research in Microbiology**, v.154, p.105-114, 2003.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA, S.; BALDANI, J. I. **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 40p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 161). 2003.

PAGE, R. D. M. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. **Computer Applications in the Biosciences**, v.12, p.357-358, 1996.

RAMAMOORTHY, V.; VIWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T.; PRAKASAM, V.; SAMIYAPPAN, R. Induction of systems resistance by plant growth promotion rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, v.20, p.1-11, 2001.

ROSSELÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v.25, n.1, p.39-67, 2001.

SESSITSCH, A.; WEILHARTER, A.; GERZABEK, M. H.; KIRCHMANN, H.; KANDELER, E. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.9, p.4215-4224, 2001.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v.30, n.3, p.507-512, 1974.

SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A. A. **Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas**. Brasília: MEC, 236p.1988.

SMIT, E.; LEEFLANG, P.; GOMMANS, S.; VAN DEN BROEK, J.; VAN, M. S.; WERNARS, K. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.67, n.5, p.2284-2291, 2001.

SNEATH, P.H.A. Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. In SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E.; HOLT, J. G. (eds.). **Manual of Systematic Bacteriology**, Baltimore: Williams & Wilkins, v.2, p.1104-1207, 1986.

SOUSA, C. S.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. S.; ALMEIDA, G. M. C. O. Estreptomicetos no controle da meloidoginose em mudas de tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.12, p.1759-1766, 2006.

SOUZA, C. A. S.; DIAS, L. A. S. Melhoramento Ambiental e Socio-econômico. In: DIAS, L. A. S. (Ed.). **Melhoramento Genético do Cacaueiro**. Viçosa:FUNAPE-UFG, p.01-47, 2001.

SOUZA, J. T.; POMELLA, A. W. V.; BOWERS, J. H.; PIROVANI, C. P.; LOGUERCIO, L. L.; HEBBAR, K. P. Genetic and biological diversity of *Trichoderma stromaticum*, a mycoparasite of the cacao witches' broom pathogen. **Phytopathology**, v.96, n.1, p.61-67, 2006.

SPIERS, A. J.; BUCKLING, A.; RAINEY, P. B. The causes of *Pseudomonas* diversity. **Microbiology**, v.146, p.2345-2350, 2000.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potencial role developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.19, p.1-30, 2000.

SUMAM, A.; SHASANY, A. K.; SINGH, M.; SHAHI, H. N.; GAUR, A.; KHANUJA, S. P. S. Molecular assessment of diversity among endophytic diazotrophs isolated from subtropical Indian sugarcane. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v.17, n.1, p.39-45, 2001.

TUKEY, J. W. The future of data analysis. **Annals of Mathematical Statistics**, v.33, p.1-67, 1962.

WARD, D. M. A natural species concept for prokaryotes. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, v.1, n.3, p.271-277, 1998.

ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. C.; NEVES, M. C. P. N. Diversidade microbiana como indicador de qualidade de solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v.20, n.3, p.391-411, 2003.

## **CAPÍTULO 2**

### **DIVERSIDADE GENÉTICA DE RIZOBACTÉRIAS ASSOCIADAS AO CACAUUEIRO E SEU EFEITO NO CRESCIMENTO DE MUDAS SEMINAIS<sup>2</sup>**

---

<sup>2</sup> Artigo a ser submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Applied Soil Ecology

## DIVERSIDADE GENÉTICA DE RIZOBACTÉRIAS ASSOCIADAS AO CACAUUEIRO E SEU EFEITO NO CRESCIMENTO DE MUDAS SEMINAIS

### RESUMO

Neste trabalho estudaram-se a diversidade genética, a produção *in vitro* de enzimas extracelulares, de ácido indolacético, a capacidade de solubilização de fosfato e o potencial de promoção de crescimento de rizobactérias associadas ao cacauueiro. Os testes *in vitro* indicaram que entre as rizobactérias testadas, 17,5 % apresentaram atividade quitinolítica, 6,4 % apresentaram atividade xilanolítica, 88,9 % produziram ácido indolacético e 85,7 % solubilizaram fosfato inorgânico. Nenhum dos isolados testados apresentou atividade celulolítica. O estudo da diversidade genética de rizobactérias, através do sequenciamento do gene *hsp60*, revelou a presença de representantes de bactérias pertencentes às famílias *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas* spp.), *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Pantoea* spp. e *Serratia* spp.), *Flavobacteriaceae* (*Flavobacterium* spp.) e *Bacillaceae* (*Bacillus* spp.), sendo que a maioria dos isolados (54 %) pertence à família *Enterobacteriaceae*. O estudo do efeito das rizobactérias na promoção de crescimento de mudas seminais de cacauueiro mostrou efeitos benéficos ou deletérios, de acordo com o isolado testado. Houve aumento significativo na matéria seca da raiz para 17 isolados bacterianos, obtendo-se até 91,8 % de incremento. Estes isolados apresentam potencial para promoção de crescimento de mudas de cacauueiro.

**Palavras-chave:** gene *hsp60*, variabilidade genética, PCR-RAPD, *Theobroma cacao*

## GENETIC DIVERSITY OF RIZOBACTERIA ASSOCIATED TO CACAO PLANTS AND THEIR EFFECT ON SEEDLING GROWTH PROMOTION

### ABSTRACT

In this work, the genetic diversity, in vitro production of extracellular enzymes and indolacetic acid, the capacity for phosphate solubilization and the potential for plant growth promotion of rhizobacteria associated with cacao plants were studied. The tests in vitro indicated that among the rhizobacteria tested, 17.5 % presented chitinolytic activity, 6.4 % presented xylanolytic activity, 88.9 % produced indol acetic acid and 85.7 % solubilized inorganic phosphate. These bacteria did not present cellulolytic activity. The rhizobacteria genetic diversity study, through hsp60 gene sequencing, indicated the presence of bacteria belonging to the following families: *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas* spp.), *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Pantoea* sp., and *Serratia* spp.), *Flavobacteriaceae* (*Flavobacterium* spp.), and *Bacillaceae* (*Bacillus* spp.), with the majority of these isolates (54 %) belonging to the family Enterobacteriaceae. The study of the effect of rhizobacteria in seedling growth promotion showed that beneficial and deleterious effects occurred, depending on the bacterial isolate. There was a significant increase in root dry weight with 17 bacterial isolates, with increments in root dry weight matter reaching 91.8 %. These isolates present a potential for cacao seedling growth promotion.

**Key-words:** *hsp60* gene, genetic variability, PCR-RAPD, *Theobroma cacao*

## INTRODUÇÃO

O cacauieiro (*Theobroma cacao*) representa uma cultura de importância mundial, pois sua amêndoa é matéria prima para fabricação de chocolate. Esta cultura tem um grande valor comercial, social e ecológico para o Brasil, por empregar mão-de-obra local e por ser uma planta cultivada em sub-bosque, preservando a floresta (Cuenca & Nazário, 2004). Contudo, a ação do patógeno *Moniliophthora perniciosa*, causador da doença vassoura-de-bruxa, aliada à queda dos preços internacionais contribuiu para o declínio da produção cacauieira brasileira (Souza & Dias, 2001). Para tentar recuperar a cacauicultura nacional, diversas medidas estão sendo adotadas e as atividades que permitem preservar o sistema de produção de cacau e elevar o rendimento da cultura assumem primordial importância, principalmente as alternativas de cunho ecológico.

Nesse sentido, o uso de microorganismos associados ao sistema radicular das plantas, com potencial de promoção do crescimento, por exemplo, vem sendo bastante estudado nos últimos anos e tem apresentado bons resultados para várias culturas, destacando-se as associações com rizobactérias (Araújo et al., 2000; Amorim & Melo, 2002; Mafia et al., 2005; Sousa et al., 2006).

Algumas bactérias são conhecidas como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs), ou seja, são bactérias colonizadoras das raízes ou rizosfera, que apresentam efeitos benéficos às plantas, promovendo seu crescimento, refletido na altura, vigor e produtividade maior do que nas plantas não associadas às RPCPs (Romeiro & Batista, 2002). A promoção de crescimento ocorre por diversos mecanismos, a exemplo da produção de substâncias reguladoras de crescimento, antibióticos e sideróforos, mineralização e solubilização de nutrientes e fixação de nitrogênio (Sturz et al., 2000; Silveira, 2001; Koenig et al., 2002; Pidello, 2003).

Bactérias que apresentam mais de uma característica para a promoção de crescimento vegetal, como por exemplo, a capacidade de mineralização de nutrientes e produção de sideróforos ou solubilização de fosfato e produção de auxinas, entre outras, são desejáveis para uma possível aplicação no campo, objetivando o aumento da produção agrícola (Verma et al., 2001). Como na cultura do cacauieiro o período de formação de mudas em viveiro representa uma



fase onerosa no processo de produção, a utilização de RPCPs pode gerar benefícios significativos.

A detecção de metabólitos produzidos pelas rizobactérias, bem como a identificação e a utilização desses microorganismos é de fundamental importância para o conhecimento da interação bactéria-planta.

Com o advento da biologia molecular, as respostas às perguntas sobre diversidade microbiana, taxonomia de microrganismos, mecanismos de ação e o destino dos microrganismos introduzidos no ambiente podem ser respondidas (Rosado et al., 1997; Schloter et al., 2003). Nos estudos filogenéticos, vários trabalhos com bactérias foram realizados utilizando o gene 16S rDNA. Contudo, pesquisas mostram que para alguns gêneros, esse gene apresenta algumas limitações (Reva et al., 2004), fato este devido à evolução diferenciada das múltiplas cópias deste gene encontradas em uma única célula bacteriana. Por esse motivo, outros genes estão sendo adotados na identificação e em estudos taxonômicos de microrganismos (Dahllof et al., 2000; Souza et al., 2003). Genes mais específicos, como o *hsp60* (*Heat Shock Proteins*) que codifica uma proteína de choque térmico apresenta inúmeras vantagens em relação ao 16S, entre elas a presença de uma única cópia por célula e evolução mais acelerada que o 16S, permitindo a identificação de espécies filogeneticamente próximas (Fox et al., 1992; Goh et al., 1996; Karlin, 2000).

Embora haja diversos trabalhos enfatizando a associação benéfica das RPCPs com diversas espécies de plantas, bem como o conhecimento genético desses microrganismos, não há informações na literatura científica sobre estes estudos na cultura do cacauero. Assim, o presente trabalho teve como objetivos caracterizar os isolados de rizobactéria quanto à produção de enzimas extracelulares, ácido indolacético e solubilização de fosfato inorgânico, avaliar o potencial desses isolados na promoção de crescimento em mudas de cacauero e fazer a análise filogenética desses isolados por meio da análise de sequências do gene *hsp60*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Nesses estudos, foram utilizados 59 isolados bacterianos provenientes da rizosfera de cacaueros dos jardins clonais da Ceplac - Comissão Executiva do

Plano da Lavoura Cacaueira e do IBC - Instituto Biofábrica de Cacau, ambos localizados no município de Ilhéus – BA. Foram incluídos mais quatro isolados (353, 369, 629 e 684), obtidos do interior de cacaueiros sadios e gentilmente cedidos pelo Centro de Estudos do Cacau Almirante Cacau – Agrícola, Comércio e Exportação LTDA para servirem como padrões de comparação.

Os isolados bacterianos foram obtidos transferindo-se 10 g de raízes para um frasco de Erlenmeyer contendo 90 mL de solução salina (NaCl a 0,85 %) estéril, sendo este agitado em agitador orbital por 30 minutos, a temperatura ambiente ( $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Após esse período, fez-se a diluição seriada ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) em tubos de ensaio com 9 mL da solução salina estéril e o plaqueamento em meio ágar nutriente - NA (Levine, 1954), contendo ciclohexamida (10 mg/L). O inóculo foi espalhado com o auxílio de uma alça de Drigalsky estéril. As colônias obtidas foram repicadas para meio NA para obtenção de culturas puras e transferidas para frascos de vidro contendo água estéril, os quais foram vedados com tampa de borracha e filme PVC, para preservação dos isolados bacterianos. Todos os isolados foram codificados e os frascos com as culturas foram mantidos a temperatura ambiente.

### **Caracterização fisiológica dos isolados de rizobactérias**

Os testes *in vitro* para a produção de quitinase, celulase, xilanase e ácido indolacético e solubilização de fosfato foram realizadas com quatro repetições.

### **Produção de enzimas extracelulares**

Para a determinação da produção de quitinase *in vitro*, foi utilizada a metodologia descrita por (Renwick et al., 1991). Os isolados de rizobactérias foram cultivados em placas de Petri contendo meio mínimo de sais (Tuite, 1969), suplementado com quitina coloidal como única fonte de carbono. As culturas foram incubadas em câmara B.O.D. ( $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ) durante 72 horas. Após este período, a atividade quitinolítica dos isolados foi detectada pela visualização de um halo hialino em torno das colônias crescidas.

A produção de celulase e xilanase *in vitro* foram determinadas conforme a metodologia descrita por Lewis (1988). Os isolados foram multiplicados em placas de Petri contendo meio mínimo de sais (Tuite, 1969), suplementado com xilana ou celulose como única fonte de carbono e incubadas em câmara B.O.D. ( $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ),

durante 48 horas. Após este período foram adicionados 10 mL da solução vermelho congo a 0,5 % em cada placa, seguido de incubação a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, foi removido o excesso da solução de vermelho congo e adicionados 10 mL da solução salina (NaCl 1 M) em cada placa, sendo estas mantidas a temperatura ambiente por 30 minutos. Decorrido o tempo, a solução foi removida e a formação de um halo de coloração alaranjada em torno das colônias foi observada, indicando à atividade xilanolítica ou celulolítica dos isolados de rizobactérias.

### **Produção de ácido indolacético – AIA**

A capacidade de produção de ácido indolacético (auxina) foi avaliada utilizando a técnica qualitativa de Brici et al., (1991). Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio triptocaseína de soja ágar (10 %), suplementado com 5 mM de L-triptofano ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), cobertos por uma membrana de nitrocelulose (Sartorius AG37070) e incubados em câmara B.O.D. a  $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  por 48 horas. Após incubação, as membranas foram removidas e saturadas com solução de Salkowski (Gordon & Welber, 1951). Os isolados que formaram um halo avermelhado na membrana, no período de 30 minutos, foram considerados produtores de ácido indolacético.

### **Solubilização de fosfato inorgânico**

A capacidade de solubilização de fosfato foi determinada segundo o método proposto por Katznelson & Bose (1959). Os isolados foram cultivados em meio de cultura triptocaseína de soja ágar (10 %) acrescido de  $\text{CaHPO}_4$  e incubados em câmara B.O.D. a  $28 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  por sete dias. Após esse período, a solubilização do fosfato foi detectada pela formação de halo claro em torno das colônias crescidas dos isolados.

### **Seqüenciamento e análise filogenética**

Para a extração do DNA genômico, os 63 isolados de rizobactérias foram crescidos em meio Triptocaseína de soja ágar e após 24 horas, colônias de cada isolado foram transferidas para tubos de microcentrifuga de 1 mL contendo  $100 \mu\text{l}$  de solução tampão de lise celular (NaOH 0,05 M, SDS a 0,25 %) e incubados em banho-maria por 15 minutos a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$ . Em seguida, os tubos contendo as

amostras foram centrifugados a 10.000 rpm por 1 minuto em microcentrífuga (Eppendorf 5417R) e o DNA no sobrenadante foi coletado e diluído 20 vezes em água MilliQ.

A amplificação do fragmento do gene *hsp60* para a identificação molecular e análises filogenéticas, foi realizada com os *primers* HSP60F e HSP60R (Roggenkamp et al., 2004). As amplificações de PCR foram obtidas em um volume total de 50  $\mu$ l contendo 50 mM de KCl, 1,5 mM  $MgCl_2$ , 200 mM de cada dNTP (Promega, Madison, WI, USA), 20 pmol de cada *primer*, 6  $\mu$ l de DNA genômico (10 ng.  $\mu$ l<sup>-1</sup>), e 2 U de Taq DNA polimerase (Promega). As amplificações de PCR foram feitas em um termociclador PTC-100 (MJ Research Inc., Watertown, MA) e consistiram de uma desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, 10 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 segundos, anelamento de *primer* a 58 °C por 45 segundos, diminuindo 1 °C a cada ciclo sucessivo, alongamento a 72 °C por 1 minuto, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 segundos, anelamento a 48 °C por 45 segundos, alongamento a 72 °C por 1 minuto e uma extensão final de 72 °C por 5 minutos.

Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose de baixo ponto de fusão (NuSieve) com uma concentração de 1,5 %. Em seguida, as bandas foram cortadas do gel, congeladas a -80 °C por 1 hora e centrifugadas por 15 minutos a 1400 rpm em microcentrífuga (Eppendorf, modelo 5417R). O sobrenadante foi usado diretamente para o sequenciamento com os *primers* anteriormente utilizados para a amplificação. O sequenciamento foi feito com o *BigDye Deoxy terminator sequencing kit* (Applied Biosystems) de acordo com as recomendações do fabricante, em um volume total de 5  $\mu$ l, contendo 0,5  $\mu$ l de BigDye, 1  $\mu$ l de tampão de sequenciamento (5X), 2 pmol de *primer* e 30 ng de DNA. As reações de sequenciamento foram feitas em um termociclador PTC-100 e consistiram de desnaturação inicial de 95 °C por 2 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos, anelamento a 58 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 4 minutos.

Após a reação de sequenciamento, as amostras foram precipitadas com 20  $\mu$ l de isopropanol 65 % e a seguir permaneceram no escuro em temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, as placas de 96 poços contendo as reações foram centrifugadas por 40 minutos a 4000 rpm em microcentrífuga (Eppendorf 5417R). O sobrenadante foi descartado e a placa invertida sobre

papel toalha. Acrescentou-se 100 µl de etanol 60 % e centrifugou-se à mesma velocidade por 8 minutos. O etanol foi descartado e a placa foi centrifugada sobre o papel toalha a 700 rpm por 10 segundos para remover o excesso de etanol. Após secagem a temperatura ambiente por 15 minutos, foram adicionados 10 µl de formamida a cada amostra e a placa colocada no termociclador para a desnaturação a 94 °C por 3 minutos. Após essa etapa, a placa foi encaminhada ao Seqüenciador Automático de DNA, modelo ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer.

Para a análise das seqüências provenientes dos dois *primers* (*forward* e *reverse*), foi utilizado o programa BioEdit versão 5.0.9 (Hall, 1999) para unir as seqüências. Os alinhamentos foram feitos com o programa MEGA versão 3.1 (Kumar et al., 2004). O programa BLAST (Altschul et al., 1997) foi usado para comparar as seqüências de cada isolado com aquelas encontradas nos bancos de dados públicos. Para fins de comparação, foram obtidas as seguintes seqüências do banco de dados públicos: AE016877 (*Bacillus cereus* ATCC), CP000001 (*B. cereus* E33L), AE017334 (*B. anthracis*), AJ417141 (*Enterobacter asburiae*), AJ417125 (*E. cloacae*), AY579184 (*E. sakazakii*), AF30652 (*E. aerogenes*), AAPM01000013 (*Flavobacterium johnsoniae*), AB008147 (*Klebsiella oxytoca*), AB008146 (*K. pneumoniae*), AANC01000007 (*Leeuwenhoekiella blandensis*), AY579182 (*Pantoea* sp.), AAOG01000001 (*Polaribacter irgensii*), CP000076 (*Pseudomonas fluorescens* – PF5), AE015451 (*P. putida*), AE004091 (*P. aeruginosa* – PO1), AB008145 (*Serratia marcescens*) e *Serratia* Dd11 (Sanger Institute – não terminado).

As análises filogenéticas foram feitas com o programa MEGA 3.1, utilizando o método de Máxima Parcimônia com os parâmetros de Jukes-Cantor e análise de *bootstrap* com 1000 repetições.

### **Promoção de crescimento em mudas de cacauero**

Para avaliar o potencial de 63 isolados de rizobactérias, na promoção de crescimento em mudas seminais de cacauero em solo não estéril, foi conduzido em casa-de-vegetação da Ceplac, um experimento em delineamento inteiramente casualizado, com 64 tratamentos (63 isolados bacterianos + 1 controle) e cinco repetições.

Para tanto, os isolados foram cultivados em meio triptocaseína de soja ágar (TSA) a  $28 \pm 2$  °C por um período de 48 horas. Em seguida, as colônias foram

ressuspendidas em água destilada autoclavada e a concentração de cada suspensão foi ajustada para aproximadamente  $10^8$  ufc/mL. Antes da bacterização, retirou-se o tegumento das sementes de cacauero e, em seguida fez-se a desinfestação das sementes através de imersão por 10 minutos em hipoclorito de sódio a 2,5 % de cloro ativo, seguida de três lavagens com água destilada esterilizada.

As sementes então foram submersas em cada suspensão bacteriana por 30 minutos e semeadas logo em seguida em vasos plásticos com capacidade para 500 mL, contendo solo de barranco não esterilizado. O tratamento controle consistiu na imersão das sementes em água destilada esterilizada, por 30 minutos. As mudas foram mantidas em casa de vegetação e coletadas 60 dias após a semeadura, avaliando-se número de folhas, altura da planta, massa seca da parte aérea e massa seca da raiz. A biomassa seca foi determinada após lavagem das raízes em água corrente e separação da parte aérea, sendo então levadas à estufa, com ventilação forçada a 70 °C até atingir massa constante. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000), sendo realizada a análise de variância (ANOVA) e em seguida, a comparação das médias pelo teste de Scott & Knott a 5 % de probabilidade.

## RESULTADOS

### Caracterização fisiológica

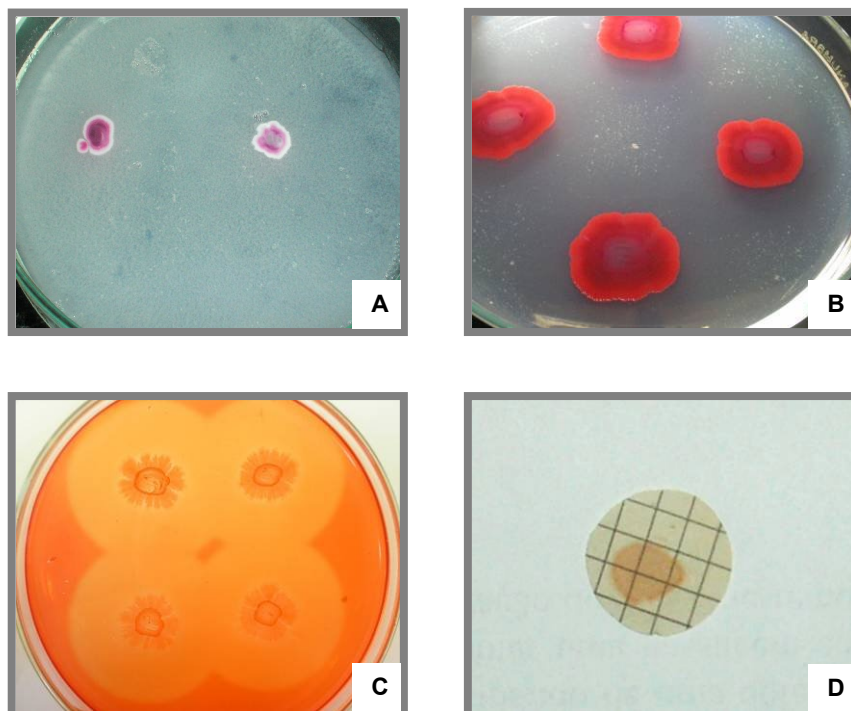
Os testes fisiológicos mostraram que os 63 isolados bacterianos apresentaram *in vitro* pelo menos uma das atividades testadas: solubilização de fosfato inorgânico, produção de quitinase, xilanase e ácido indolacético (AIA) (Tabela 1), cuja constatação foi visualizada, respectivamente, pela formação de um halo claro, halo hialino e halo alaranjado ao redor das colônias e um halo avermelhado nas membranas de nitrocelulose (Figura 1). A atividade celulolítica não foi detectada em nenhum dos isolados testados. Entre os isolados, 17,5 % apresentaram atividade quitinolítica, 6,4 % xilanolítica, 88,9 % produziram AIA e 85,7 % solubilizaram fosfato de cálcio. Nove isolados (02, 23, 44, 62, 84, 102, 369, 629 e 684) apresentam até três atividades fisiológicas apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Produção de enzimas, ácido indolacético e solubilização de fosfato inorgânico *in vitro* por isolados de bactérias do cacauero.

Isolados	Atividade enzimática		AIA*	SF**	Isolados	Atividade enzimática		AIA*	SF**
	Quitinase	Xilanase				Quitinase	Xilanase		
01	-	-	+	+	58	-	-	+	+
02	+	-	+	+	59	-	-	+	+
03	-	-	-	+	61	+	-	+	+
04	-	-	+	+	62	-	+	+	+
05	-	-	+	+	63	-	-	+	+
07	-	-	+	+	64	-	-	+	+
11	-	-	+	+	65	-	-	+	-
12	-	-	+	+	66	-	-	+	+
13	-	-	+	+	67	-	-	+	-
15	-	-	+	+	69	-	-	+	+
17	-	-	+	+	72	-	-	+	+
20	-	-	+	+	79	-	-	+	-
21	-	-	+	-	84	+	-	+	+
22	-	-	+	-	85	-	-	+	+
23	+	+	+	-	90	-	-	+	+
24	-	-	+	+	97	-	-	+	+
27	-	-	+	+	102	+	-	+	+
32	-	-	+	-	103	-	-	+	-
33	-	-	+	+	110	-	-	+	+
34	-	-	+	+	114	-	-	+	+
35	-	-	+	+	124	-	-	+	+
38	-	-	+	+	126	-	-	+	+
39	-	-	-	+	127	-	-	+	+
40	-	-	+	+	130	-	-	+	+
44	+	-	+	+	133	-	-	+	+
47	+	-	-	+	141	-	-	+	+
49	-	-	+	+	142	-	-	-	+
51	+	-	-	-	353	-	-	+	+
54	-	-	+	+	369	+	-	+	+
55	-	-	+	+	629	+	+	-	+
56	-	-	+	+	684	+	+	-	+
57	-	-	+	+					

\* Produção de ácido indolacético; \*\* Solubilização de fosfato de cálcio.

Os sinais (+) e (-) indicam, respectivamente, resposta positiva ou negativa em relação à produção de enzimas, AIA e solubilização de fosfato.



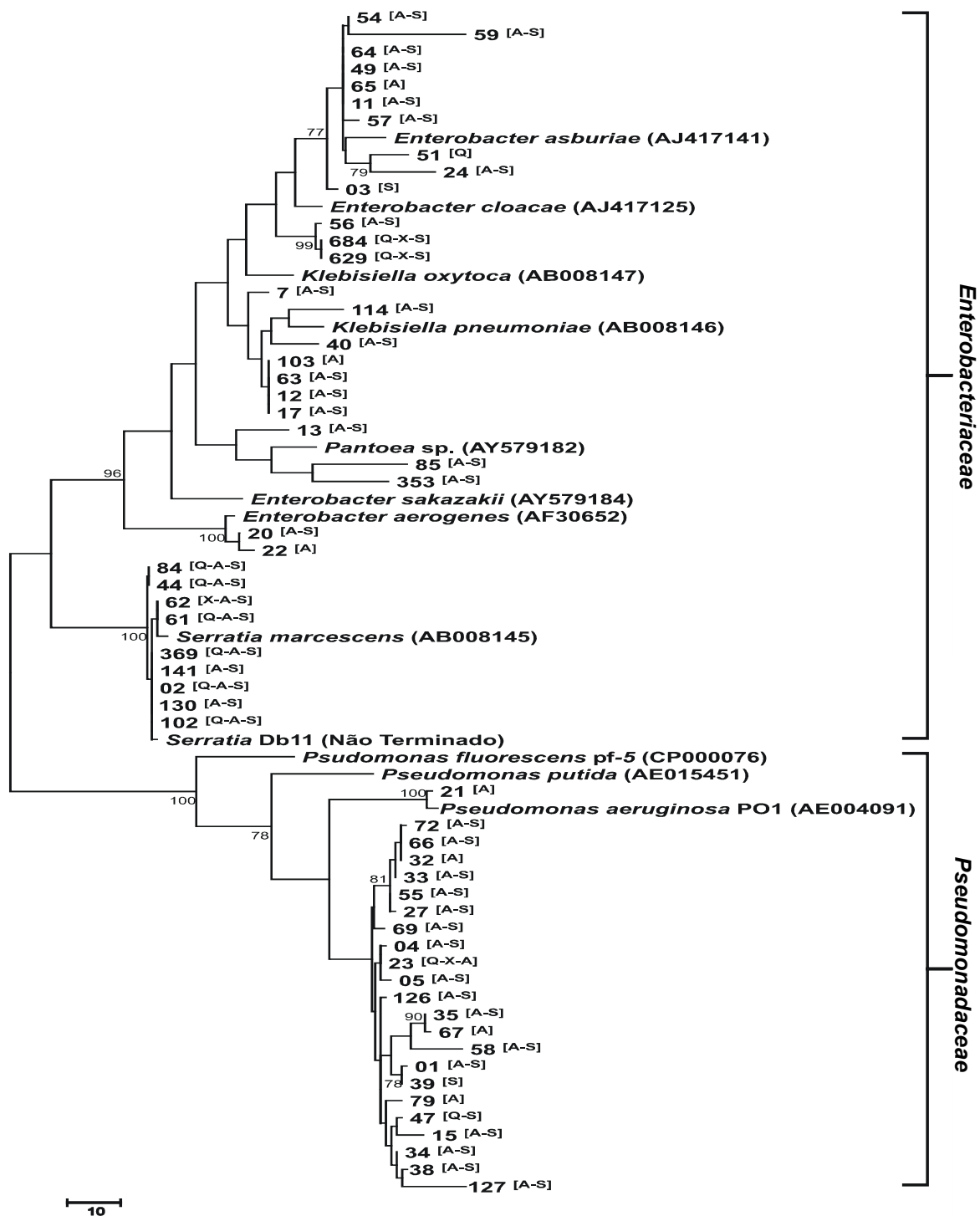
**Figura 1.** Caracterização fisiológica dos isolados de rizobactérias do cacau. A - solubilização de fosfato (isolado 02); B - atividade quitinolítica (isolado 44); C - atividade xilanolítica (isolado 62) e D - produção de ácido indolacético (isolado 02).

### Diversidade genética e identificação molecular

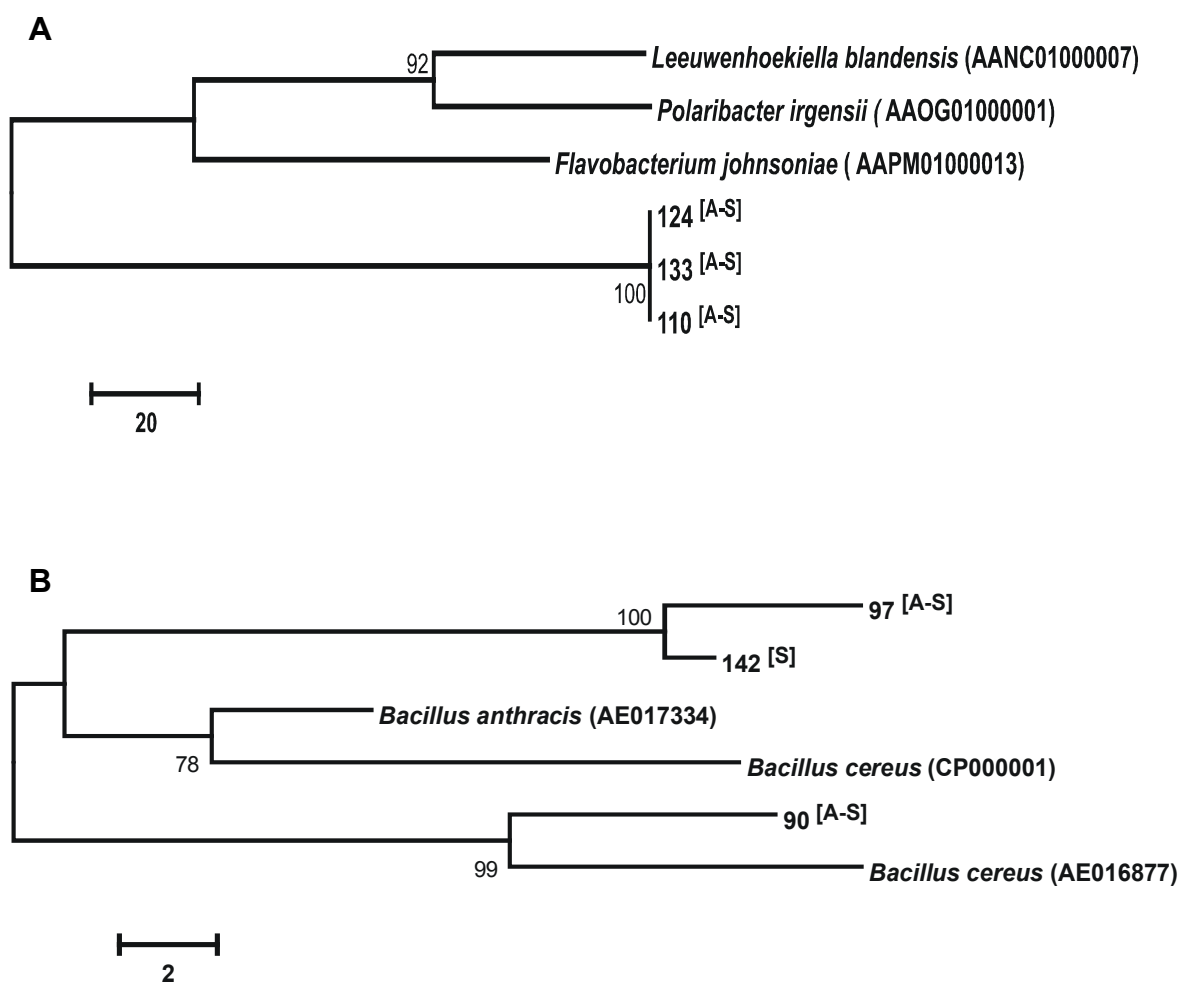
O sequenciamento do gene *hsp60* permitiu a obtenção de seqüências de 310-pb alinhadas, as quais mostraram que os isolados bacterianos são pertencentes às famílias *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae*. A maior diversidade genética (34 isolados) foi observada na família *Enterobacteriaceae*, que através dos acessos obtidos dos bancos de dados públicos, pode-se averiguar que compreendem os gêneros *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea* e *Serratia* (Figura 2). O gênero *Pseudomonas* foi o único encontrado entre as *Pseudomonadaceae*, representando 23 isolados (Figura 2).

A identificação dos isolados pertencentes às famílias *Bacillaceae* (isolados 90, 97 e 142) e *Flavobacteriaceae* (isolados 110, 124 e 133) foi efetuada através da análise de seqüências de outros genes, porém, com a amplificação feita através dos *primers* para o gene *hsp60* (Figura 3). Desta forma pode-se dizer que estes fragmentos obtidos são ampliações inespecíficas. Apesar de serem inespecíficas, as ampliações se mostraram bastante úteis na identificação dos isolados mencionados. A comparação destas seqüências com outras depositadas





**Figura 2.** Filograma genético dos isolados de rizobactérias baseado em 310-pb de nucleotídeos alinhados do gene *hsp60*. O filograma foi construído utilizando-se o método de Máxima Parcimônia. Os valores apresentados nas ramificações do filograma correspondem ao bootstrap  $\geq 70$ , e foram calculados com base em 1000 repetições. A escala indica o número de substituições de nucleotídeos por sítio. As letras entre parênteses indicam produção de enzima quitinase (Q), xilanase (X), ácido indolacético (A) e solubilização de fosfato (S) pelos isolados.



**Figura 3.** Identificação de isolados de bactérias da rizosfera de cacauero através da análise das ampliações inespecíficas com *primers* para o gene *hsp60*. (A) Filograma genético baseado em 375-pb de nucleotídeos alinhados de um gene que codifica uma proteína hipotética, amplificada para os isolados de rizobactérias do cacauero e seqüências dos bancos de dados públicos pertencentes a bactérias da família *Flavobacteriaceae*. (B) Filograma genético baseado em 590-pb de nucleotídeos alinhados de um gene que codifica o componente E1 da 2-glutarato desidrogenase, amplificada para os isolados de rizobactérias do cacauero e seqüências dos bancos de dados públicos pertencentes a bactérias da família *Bacillaceae*. Os filogramas foram construídos utilizando-se o método de Máxima Parcimônia. Os valores apresentados nas ramificações do filograma correspondem ao *bootstrap* calculados com base em 1000 repetições. A escala indica o número de substituições de nucleotídeos por sítio. As letras entre parênteses indicam produção de ácido indolacético (A) e solubilização de fosfato (S) pelos isolados.

nos bancos de dados públicos mostrou que estas apresentam 95 % de identidade quando comparadas a uma proteína hipotética de bactérias da família *Flavobacteriaceae*. Para os isolados 90, 97 e 142, as seqüências obtidas apresentaram até 96 % de identidade quando comparadas com seqüências do gene que codifica o componente E1 da 2-glutarato desidrogenase de bactérias pertencentes à Família *Bacillaceae*. Estas comparações permitiram a identificação dos isolados 110, 124 133 como pertencentes à Família *Flavobacteriaceae*, provavelmente ao gênero *Flavobacterium* e os isolados 90, 97 e 142 como pertencentes à família *Bacillaceae* e ao gênero *Bacillus*.

A análise filogenética mostrou identidade de 100 % entre as seqüências de alguns isolados de *Enterobacteriaceae* (54, 64, 49, 65 e 11; 684 e 629; 103, 63, 12 e 17; 84 e 44; 62 e 61; 369, 141, 02, 130 e 102) e *Pseudomonadaceae* (72, 66, 32 e 33; 04 e 23; 35 e 67; 01 e 39). De acordo com a proximidade e identidade entre as seqüências obtidas do banco de dados e seqüências obtidas com o sequenciamento, os dois gêneros mais comuns encontrados na rizosfera do cacauero são *Enterobacter* e *Pseudomonas* (Tabela 2).

**Tabela 2.** Identidade entre seqüências dos isolados de rizobactérias.

Acessos*	Identidade (%)		Isolados bacterianos
	Mín.	Máx.	
<b><i>Enterobacter</i> spp.</b>	89	96	03, 11, 20, 22, 24, 49, 51, 54, 56, 57, 59, 64, 65, 629, 684
<b><i>Klebsiella</i> spp.</b>	94	97	07, 12, 17, 40, 63, 103, 114
<b><i>Pantoea</i> spp.</b>	87	91	13, 85, 353
<b><i>Serratia</i> spp.</b>	99	100	02, 44, 61, 62, 84, 102, 130, 141, 369
<b><i>Pseudomonas</i> spp.</b>	89	99	01, 04, 05, 15, 21, 23, 27, 32, 33, 34, 35, 38, 39, 47, 55, 58, 66, 67, 69, 72, 79, 126, 127
<b><i>Bacillus</i> spp.</b>	93	96	** 90, 97, 142
<b><i>Flavobacterium</i> spp.</b>	95	95	** 110, 124, 133

\* Seqüências obtidas nos bancos de dados públicos.

\*\* Amplificações inespecíficas com os *primers* para o gene *hsp60*.

Estes resultados permitem aferir que os isolados com atividade quitinolítica e xilanolítica *in vitro* são representantes dos gêneros *Serratia*, *Enterobacter* e *Pseudomonas*. A produção de AIA e solubilização de fosfato foi observada por todos os gêneros obtidos.

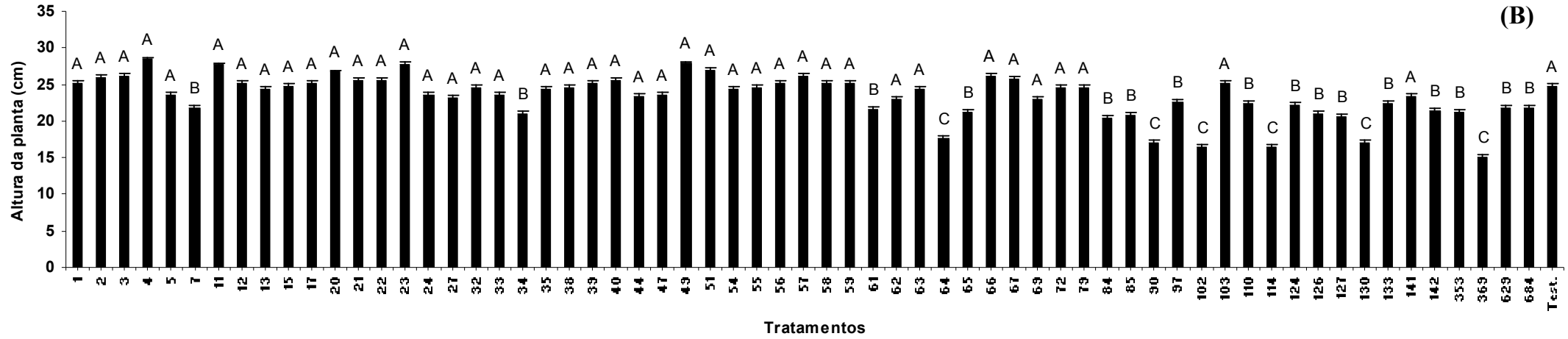
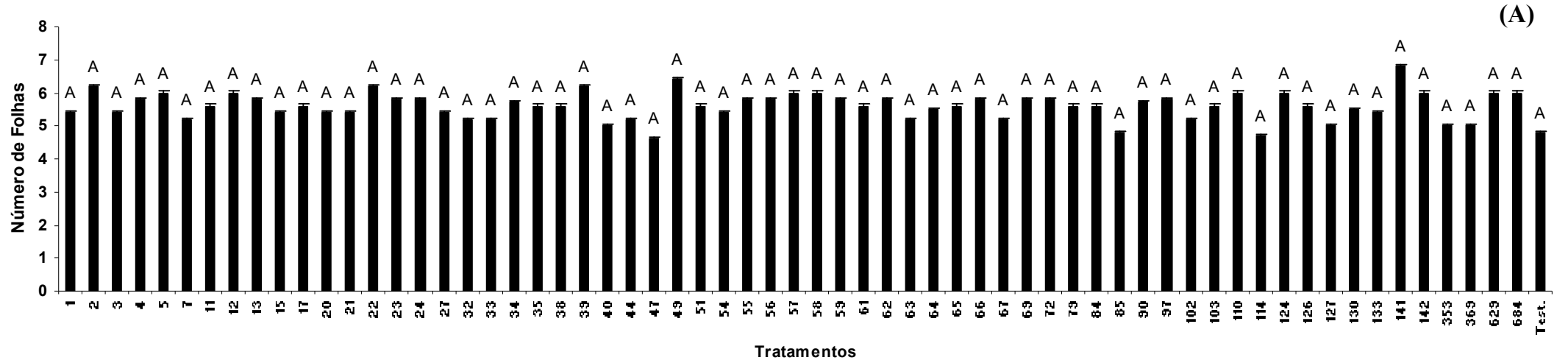
### Promoção de crescimento

O estudo de promoção de crescimento com os 63 isolados, mostrou que houve diferença estatística na altura da planta, matéria seca da parte aérea e matéria seca da raiz (Figura 4B, C e D). Não foi verificada diferença significativa ( $P>0,05$ ) no número de folhas, mesmo sendo observados incrementos de até 41,6 % em relação à testemunha (Figura 4A), para o isolado 141 (*Serratia* spp.), o qual apresenta a capacidade de solubilização de fosfato e produção de AIA.

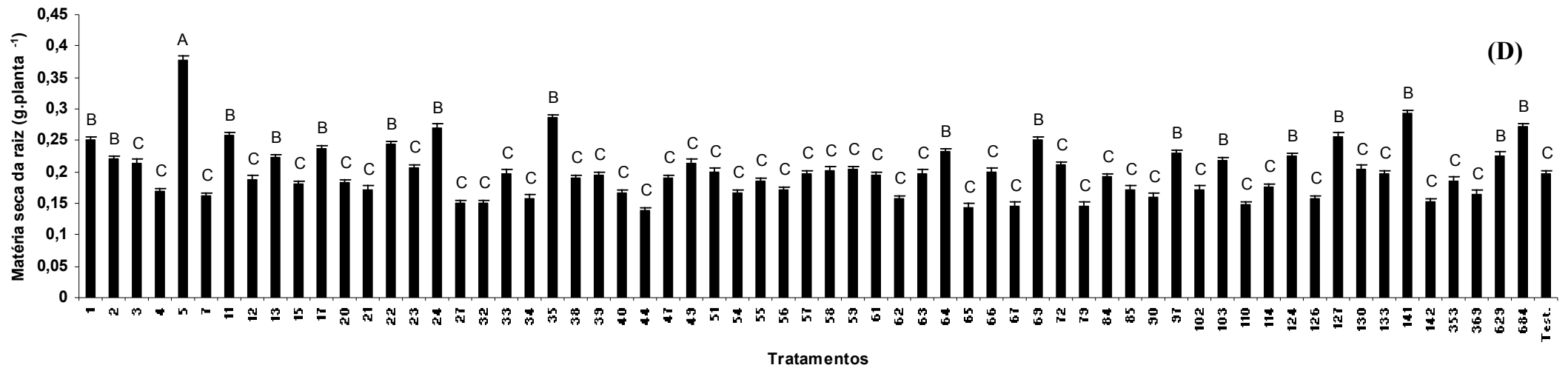
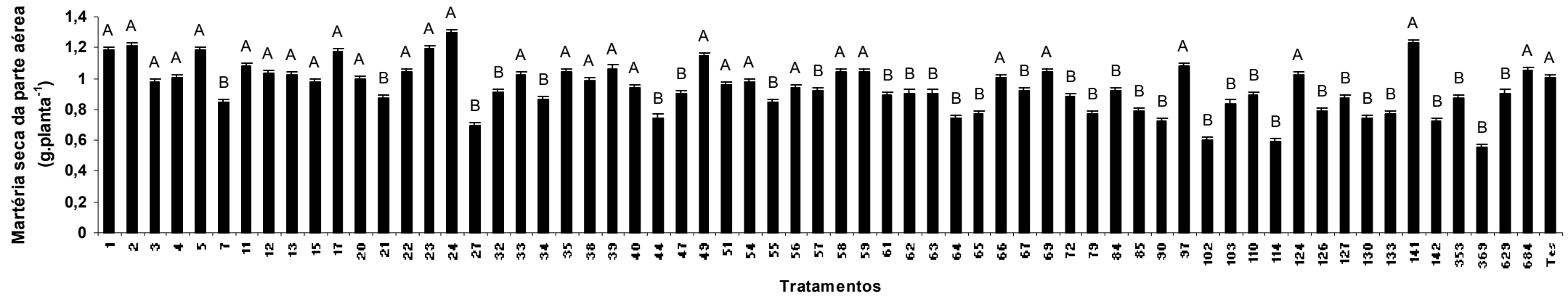
Em relação à altura das plantas, 41 isolados não diferiram da testemunha ( $P>0,05$ ), apesar do aumento de até 15,2 % observado com o isolado 04 (*Pseudomonas* spp. produtora de AIA e solubilizadora de fosfato). No entanto, foi verificado efeito deletério significativo de alguns isolados, sendo mais acentuado para os isolados 64, 90, 102, 114, 130 e 369 (Figura 4B).

Quanto à biomassa seca da parte aérea, não foram constatadas diferenças significativamente superiores à testemunha para os isolados avaliados, embora tenha sido observado até 29,1 % de aumento na sua produção para o isolado 24 (*Enterobacter* spp., produtora de AIA e solubilizadora de fosfato). Efeito deletério também foi verificado na produção de biomassa seca da parte aérea, sendo conferido a 33 isolados, que também afetaram negativamente a altura das plantas (Figura 4C).

Houve incremento significativo na matéria seca da raiz ( $P<0,05$ ) para os isolados 97 (um dos três isolados classificados como *Bacillus* spp.); 124 (um dos três isolados classificados como *Flavobacterium* spp.); 13 (um dos três isolados de *Pantoea* spp.); 02 e 141 (22,2 % dos isolados de *Serratia* spp.); 17 e 103 (28,6 % dos isolados de *Klebsiella* spp.); 01, 05, 35, 69 e 127 (21,7 % dos isolados de *Pseudomonas* spp.); 22, 24, 64, 629 e 684 (33,3 % dos isolados de *Enterobacter* spp.) (Tabela 2). O efeito benéfico do isolado 5, *Pseudomonas* spp. produtor de AIA e solubilizador de fosfato, foi significativamente superior aos demais, conferindo incremento de 91,8 % na biomassa seca da raiz, em relação à testemunha (Figura 4D).



(C)



**Figura 4.** Número de folhas (A), altura de planta (B), matéria seca da parte aérea (C) e matéria seca da raiz (D) de mudas seminais de cacauero em solo não estéril, colhidas 60 dias após inoculação das sementes com isolados de rizobactérias. Médias com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Skottt & Knott ( $P < 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

Com base nos estudos realizados, bactérias associadas à rizosfera do cacauero pertencem às principais famílias citadas na literatura como RPCPs e alguns isolados são capazes de produzir enzimas extracelulares, AIA e solubilizar fosfato inorgânico. Apesar da produção *in vitro*, esses testes fisiológicos foram utilizados apenas como indicadores de promoção de crescimento, já que não se comprovou a produção de nenhum desses metabólitos *in vivo*. Os resultados indicam também que há uma distinção quanto ao efeito (benéfico ou deletério) conseqüente da ação dessas bactérias em mudas de cacauero.

A produção *in vitro* de quitinase foi observada por 17,5 % dos isolados bacterianos testados. A quitina é um polímero (N-acetilglicosamina) constituinte da parede celular na maioria dos fungos fitopatogênicos, tornando-os susceptíveis a ação antagônica das bactérias produtoras de quitinase. Essa atividade metabólica pode constituir-se num dos mecanismos de biocontrole desses patógenos (Gomes et al., 2000; Majeti & Kumar, 2000). Nesse estudo, a atividade quitinolítica foi observada nos isolados de *Serratia* spp. e *Enterobacter* spp., cuja literatura cita como principais gêneros de bactérias produtores de quitinases, juntamente com *Streptomyces* spp. (Matsuo et al., 1999, Patil et al., 2000).

Os testes para a produção de xilanase *in vitro* mostraram que apenas quatro isolados (23, 62, 629, 684) apresentaram atividade xilanolítica. Rizobactérias capazes de produzir xilanase têm papel importante na mineralização e liberação de nutrientes, pois são capazes de degradar moléculas orgânicas complexas presentes no solo, como xilana (principal polímero constituinte do complexo hemicelulolítico), auxiliando na decomposição da matéria orgânica, e conseqüentemente, favorecendo o estado nutricional e o crescimento das plantas (Oliveira et al., 2003). Entretanto, o experimento em casa-de-vegetação com mudas de cacauero mostrou que esses isolados não promoveram significativos aumentos de biomassa vegetal, sugerindo que, nas condições avaliadas, a atividade xilanolítica é uma característica que talvez não seja determinante para a promoção de crescimento.

A alta porcentagem de isolados solubilizadores de fosfato (85,7 %), atestada neste estudo, é comumente encontrada na rizosfera de diversas plantas (Vazquez et al., 2000). Esta capacidade de solubilizar compostos fosfatados é

uma característica importante dessas bactérias, já que o fósforo (P), apesar de ser abundante nos solos na forma orgânica e inorgânica, é o nutriente mais limitante do crescimento vegetal tendo um papel estrutural, funcional, e na transferência de energia na planta. Muitos tipos de solos são deficientes em fósforo porque a concentração P livre (forma disponível para as plantas), mesmo em solos férteis, é geralmente baixa (Barroti & Nahas, 2000). Isso se deve pela alta reatividade com cálcio, ferro e alumínio, tornando-o indisponível (Richardson, 2001). A solubilização de fosfato na rizosfera representa o mecanismo mais comum de ação em RPCPs que aumentam a disponibilidade de nutrientes às plantas. As RPCPs dissolvem o fosfato insolúvel pela produção de ácidos orgânicos e inorgânicos e/ou pela diminuição do pH, e conseqüentemente, ocorre a liberação de fosfato disponível que pode ser adsorvido pelas plantas (Vassilev & Vassileva, 2003). Vários estudos abordam a relação de bactérias solubilizadoras de fosfato com a promoção de crescimento vegetal em diversas culturas, citando o *Rhizobium leguminosarum* em milho (Chabot et al., 1998), *Azotobacter chroococum* em trigo (Kumar & Narula, 1999) e *Pseudomonas fluorescens* em feijão (Katiyar & Goel, 2003), sendo que os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Rhizobium* estão entre as bactérias mais eficientes (Verma et al., 2001; Rodriguez & Fraga, 1999).

O teste qualitativo de produção de ácido indolacético – AIA (principal auxina de ocorrência natural) *in vitro* mostrou que 88,9 % dos isolados bacterianos testados são capazes de produzi-lo. Este resultado corrobora com a literatura, na qual tem sugerido que mais de 80 % das bactérias isoladas da rizosfera são capazes de produzir esse regulador de crescimento (Leinhos & Vacek, 1994; Barazani & Friedman, 1999; Khalid et al., 2004). A produção de substâncias reguladoras de crescimento como AIA, tem explicado o efeito benéfico das rizobactérias observado em várias culturas (Mafia et al., 2005) e tem sido detectada em meio de cultura após o crescimento de isolados de rizobactérias como o *Azospirillum* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Bacillus* spp., *Azotobacter* spp., *Pseudomonas* spp. e *Rhizobium* spp. (Mello, 1998; Verma et al., 2001; Halda-alija, 2004). A produção de reguladores de crescimento ativos faz parte do metabolismo de diversas espécies de bactérias associadas aos vegetais, causando modificações na morfologia das raízes, influenciando na absorção de nutrientes e água (Patten & Glick, 2002). Através da produção



substâncias reguladoras de crescimento vegetal, os microrganismos podem promover um estímulo ao crescimento vegetal, além de aumentar a produção de metabólitos pelas plantas que podem ser utilizados para seu próprio crescimento (Oliveira et al., 2003). A resposta das plantas ao AIA liberado por bactérias, pode variar de efeitos benéficos a deletérios dependendo de sua concentração. Quando em baixas concentrações, pode estimular e quando em altas concentrações, pode inibir o desenvolvimento da raiz. Os níveis de AIA produzidos pelas bactérias dependem do crescimento bacteriano, da atividade metabólica e da expressão de genes que codificam enzimas para a biossíntese de AIA (Lambrecht et al., 2000). Patten & Glick (2002) verificaram que *Pseudomonas putida* aumentou de 35 % a 50 % o crescimento primário das raízes de canola (*Brassica campestris*), devido à produção de AIA. Eles demonstraram diretamente que o fitoregulador bacteriano tem um papel importante na elongação da raiz, quando a bactéria produtora está associada à planta hospedeira. Efeito semelhante foi obtido por Cattelan (1999) com diferentes isolados de *Pseudomonas* spp. em soja. Barazani & Friedman (1999) estudaram a promoção de crescimento de plantas de alface por substâncias secretadas por rizobactérias e verificaram que o crescimento das plantas foi mediado pela produção de auxinas.

A análise filogenética mostrou que entre os isolados identificados associados à cultura do cacaueteiro, a maioria pertence à Família *Enterobacteriaceae* (54 %) (Figura 2) e que há uma predominância de gêneros bacterianos dentro do Filo *Proteobacteria*, sendo a maioria pertencente à subdivisão gama ( $\gamma$ ) (*Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Pantoea* spp., *Pseudomonas* spp. e *Serratia* spp.). O mesmo tem sido observado em algumas culturas, como milho (Cerigioli, 2005), mandioca (Teixeira et al., 2005) e soja (Sobral, 2003). As Proteobactérias são o maior e mais diverso grupo de bactérias, alocadas em cinco subdivisões: alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gama ( $\gamma$ ), delta ( $\delta$ ) e epsilon ( $\epsilon$ ). Os organismos alocados nesses grupos são Gram-negativos e apresentam uma enorme diversidade de morfologia e metabolismo, mesmo dentro de uma mesma radiação filogenética (Canhos et al., 1999; McCaig et al., 1999; Pereira, 2003). Estes autores sugerem que o Filo *Proteobacteria* está favorecido em solos cultivados.

No estudo de promoção de crescimento em mudas de cacaueteiro pode-se observar que, embora não diferindo significativamente da testemunha para o número de folhas, altura da planta e matéria seca da parte aérea, os efeitos positivos mais acentuados foram obtidos, respectivamente, com isolados 141, 04 e 24, os quais possuem a capacidade de produção de AIA e solubilização de fósforo. Tais características também são observadas no isolado 05, que promoveu aumentos significativos na matéria seca da raiz (Tabela 1; Figura 2). Entretanto, não é possível afirmar que esses isolados apresentaram a mesma atividade metabólica nas raízes das mudas, pois testes *in vitro* apenas indicam possíveis mecanismos de promoção de crescimento (Vessey, 2003), sendo, portanto, necessários mais testes para averiguar essas atividades *in vivo*.

O fato dos tratamentos não causarem aumentos significativos no número de folhas, altura de plantas e matéria seca da parte aérea, pode ser atribuído a diversos fatores. Estudos com número superior de isolados são necessários para obtenção de isolados promissores, principalmente porque menos de 1 % das rizobactérias são capazes de promover crescimento em plantas (Chen et al., 1996). Silveira et al. (2004) testaram em três bioensaios, o potencial de 103 isolados bacterianos para a promoção de crescimento em plantas de pepino. Destes, apenas cinco isolados foram selecionados por aumentarem significativamente a biomassa vegetal das plântulas.

É possível observar também que os isolados apresentaram diferentes respostas em relação às variáveis analisadas, mostrando influência positiva e negativa na altura da planta e matéria seca da parte aérea (Figura 4B e C). Esse é um fato comum no ambiente da rizosfera de qualquer planta, onde, em geral, ocorre um equilíbrio entre microrganismos benéficos e deletérios (Whipps, 2001). Uma pequena mudança neste equilíbrio pode desencadear uma doença ou, por outro lado, resultar no controle biológico de patógenos ou promoção do crescimento da planta. A maioria dos trabalhos com RPCPs discutem apenas o efeito benéfico dessas bactérias, não comentando sua ação deletéria. Contudo, a ocorrência de efeitos positivos ou deletérios é relatada por alguns autores (Probanza 1996, Khalid et al., 2004) e parece estar correlacionada com a espécie de microrganismo testada e seu hospedeiro. Probanza (1996) observou a redução de comprimento da parte aérea e raízes, bem como da biomassa de plântulas de pinus (*Pinus taeda*) tratadas com os isolados *B. subtilis* (BS1 e BS2), enquanto

que outros isolados aumentaram significativamente a biomassa do sistema radicular da mesma espécie. O mesmo autor detectou o efeito prejudicial de sete isolados de *Pseudomonas fluorescens*, obtidos de rizosfera de amieiro (*Alnus glutinosa*), sobre o crescimento desse hospedeiro. Além da redução do crescimento, algumas bactérias são capazes de aumentar a incidência ou severidade de doenças conforme relatado por Noronha et al., (1995), com *Bacillus* spp. em relação ao “damping-off” do caupi (*Vigna unguiculata*) causado por *Rhizoctonia solani*.

Entretanto, efeitos benéficos como o observado com o isolado 05 (91,8 % de incremento na matéria seca das raízes), são comumente relatados na literatura em diversas culturas. Em eucalipto, as rizobactérias proporcionaram maior produção e predisposição das estacas ao enraizamento e, quando incorporadas ao substrato, promoveram incrementos na biomassa e qualidade das raízes e da parte aérea, com ganhos superiores a 100 % nos índices de enraizamento (Alfenas et al., 2004). De acordo com Silveira et al., (1995) *Pseudomonas* spp. fluorescentes aplicadas a plântulas de feijão promoveram aumentos de matéria seca do caule e nódulos, conteúdo de fósforo e nitrogênio da parte aérea. Em um experimento com citros, Freitas & Aguilar-Vildoso (2004) verificaram o aumento da matéria seca das raízes e da parte aérea de plantas, promovido por nove isolados de RPCPs, sendo que sete deles eram do gênero *Pseudomonas* spp. e um de *Bacillus* spp.

Maiores esforços para ampliar o conhecimento sobre a diversidade microbiana e filogenia de bactérias são fundamentais para a exploração de novos isolados de interesse ambiental, bem como industrial (Istock et al., 1996; Ranjard et al., 2000). Neste trabalho evidenciou-se através da análise de seqüências do gene *hsp60* que as bactérias colonizadoras da rizosfera do cacauero pertencem predominantemente às famílias *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae*, sendo este o primeiro trabalho desta natureza para a cultura do cacauero. Alguns dos isolados testados foram capazes de produzir enzimas extracelulares, AIA, solubilizar fosfato inorgânico e promover o crescimento de mudas seminais de cacauero. Estes isolados podem representar potenciais candidatos para aplicações na produção de mudas tanto do cacauero como de outras culturas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. Rizobactérias e rizobacterização do substrato In: ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. (Eds.). **Clonagem e Doenças do Eucalipto**. Viçosa-MG, Editora UFV. v.18, p.108-111, 2004.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.3389–3402, 1997.

AMORIM, E. P. R.; MELO, I. S. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasítica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citrus. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal-SP, v.24, n.2, p.565-568. 2002.

ARAÚJO, J. M.; SILVA, A. C.; AZEVEDO, J. L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.) **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.43, p.447-451. 2000.

BARAZANI, O.; FRIEDMAN, J. Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? **Journal of Chemical Ecology**, v.25, n.10, p.2397-2406, 1999.

BARROTI, G.; NAHAS, E. População microbiana total e solubilizadora de fosfato em solo submetido a diferentes sistemas de cultivo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p.2043-2050, 2000.

BRICI, J. M.; BOSTOCK, R. M.; SILVERSTONE, S. E. Rapid in so assay for indole-acetic acid production by bacteria immobility on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environment Microbiology**, Washington, v.57, p. 535-538, 1991.

CANHOS, V. P.; MANFIO, G. P.; VAZOLLER, R. F.; PELLIZARI, V. H. Diversidade do Domínio Bacteria. In: JOLY, C. A.; BICUDO, C. E. M. (Org.). **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX**. 1ª ed. São Paulo: FAPESP, v.1, p.1-14, 1999.

CHEN, Y.; MEI, R.; LIU, L.; KLOEPPER, J. W. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in Chinese agriculture. In: UTKHEDE, R. S.; GUPTA, V. K. (Eds.) **Management of soil born disease**. Ludhiana: Kalyani Publishers, p.165-184, 1996.

CATTELAN, A. J.; HARTEL, P. G.; FUHRMANN, J. J. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. **Soil Science Society of America Journal**, v.63, p.1670–1680, 1999.

CERIGIOLI, M. M. **Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zea mays* L.) e potencial para promoção de crescimento**. 2005, 132p., Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2005.

CHABOT, R.; BEAUCHAMP, C. J.; KLOEPPER, J. W.; ANTOUN, H. Effect of phosphorous on root colonization and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Soil Biology and Biochemistry**, v.30, p.1615-1618, 1998.

CUENCA, M. A. G.; NAZÁRIO, C. C. **Importância Econômica e Evolução da Cultura do Cacau no Brasil e na Região dos Tabuleiros Costeiros da Bahia entre 1990 e 2002**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 25p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros – Documentos, 72), 2004.

DAHLLOF, I.; BAILLIE, H.; KJELLEBERG, S. rpoB-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. **Applied Environmental Microbiology**, v.66, p.3376-3380, 2000.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria. São Carlos, **Programas e Resumos...** São Carlos: UFSCar. V.45, p.255-258, 2000.

FOX, G. E.; WISOTZKEY, J. D.; JURTSCHUK, P. J. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.42, p.166–170, 1992.

FREITAS, S. S.; AGUILAR-VILDOSO, C. I. Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v.28, p.987-994, 2004.

GOH, S. H.; POTTER, S.; WOOD, J. O.; HEMMINGSEN, S. M.; REYNOLDS, R. T. P.; CHOW, A. W. HSP60 Gene Sequences as Universal Targets for Microbial Species Identification: Studies with Coagulase-Negative Staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, N.4, p.818–823, 1996.

GOMES, R. C.; SEMEDO, L. T. A. S.; SOARES, R. M. A.; ALVIANO, C. S.; LINHARES, L. F.; COELHO, R. R. R. Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potencial in biocontrol. **Applied Microbiology**, v.30, p.146-450, 2000.

GORDON, S. A.; WEBER, R. P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, Bethesda, v.26, p.192-195, 1951.

HALDA-ALIJA, L. Identification of indole-3-acetic acid producing freshwater wetland rhizosphere bacteria associated with *Juncus effuses* L. **Canadian Journal of Microbiology**, v.49, p.1-7, 2004.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, p.95–98, 1999.

ISTOCK, C. A.; BELL, J. A.; FERGUSON, N.; ISTOCK, N. L. Bacterial species and evolution: theoretical and practical perspectives. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.17, p.137-150, 1996.

KHALID, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z. A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria improving growth and yield of wheat. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, p.473-480, 2004.

KARLIN, S.; BROCCIERI, L. Heat shock protein 60 sequence comparisons: Duplications, lateral transfer, and mitochondrial evolution. **PNAS**, v.97, n.21, p.11348–11353, 2000.

KATZNELSON, H.; BOSE, B. Metabolic activity and phosphate-dissolving capability of bacterial isolates from wheat root, rhizosphere and non-rhizosphere soil. **Canadian Journal of Microbiology**, v.5, p.79-85, 1959.

KATIYAR, V.; GOEL, R. Solubilization of inorganic phosphate and plant growth promotion by cold tolerant mutants of *Pseudomonas fluorescens*. **Microbiology research**, v.158, p.163-168, 2003.

KOENING, R. L.; MORRIS, R. O.; POLACCO, J. C. tRNA is the source of low-level trans-zeatin production in *Methylobacterium* spp. **Applied Environmental Microbiology**, v.184, p.1832-1842, 2002.

KUMAR, V.; NARULA, N. Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococum* mutants. **Biology and Fertility of soils**, v.28, p.301-305, 1999.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA 3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v.5, p.150-163, 2004.

LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; BROEK, A. V.; VANDERLEYDEN, J. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signaling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, v.8, p.298-300, 2000.

LENHOS, V.; VACEK, O. Biosynthesis os auxins by phosphate-solubilizing rhizobacteria from wheat and rye. **Microbiology Research**, v.149, p.31-35, 1994.

LEVINE, M. **An introduction to laboratory technique in bacteriology**. New York: Mac Millan, p.68-79, 1954.

LEWIS, K.J. **Biological control mechanism of the mycoparasite *Phytium oligandum* Dreschler**. PhD Thesis. Sheffield. University of Sheffield. 1988.

McCAIG, A. E.; GLOVER, L. A.; PROSSER, J. I. Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.1721-1730, 1999.

MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; FERREIRA, E. M.; ZARPELON, T. G.; SIQUEIRA, L. Crescimento de mudas e produtividade de minijardins clonais de eucalipto tratados com rizobactérias selecionadas. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.29, p.843-851. 2005.

MAJETI, N.; KUMAR, R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v.46, p.1-27, 2000.

MATSUO, Y.; KURITA, M.; PARK, J. K.; TANAKA, K.; NAKAGAWA, T.; KAWAMUKAI, M.; MATSUDA, H. Purification, characterization and gene analysis of N-acetylglucosaminidase from *Enterobacter* sp. G-1. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 63, n.7, p. 1261-1268, 1999.

MELLO, I. S. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas: descrição e potencial de uso na agricultura. In: MELLO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (ed.) **Ecologia microbiana**. Brochura: Embrapa Meio Ambiente, p.88-112, 1998.



NORONHA, M. A.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R. Efeito do tratamento de sementes de caupi com *Bacillus subtilis* no controle de *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, v.20, p.174-178, 1995.

PATIL, R. S.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: an exploration. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, p.473-483, 2000.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.3795-3801, 2002.

PEREIRA, R. M. **Diversidade bacteriana de um Latossolo sob cultivo intensivo e floresta através da análise metagenômica**. 2003. 75p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.

PIDELLO, A. The effect of *Pseudomonas fluorescens* strains varying in pyoverdine production of the soil redox status. **Plant and Soil**, v.253, p.373-379, 2003.

PROBANZA, A. The influence of native rhizobacteria on european alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) growth. **Plant and Soil**, v.182, p.59-66, 1996.

OLIVEIRA, A. L. M.; URQUIAGA S.; BALDANI, J. I. **Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 40p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 161), 2003.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, v.151, p.167-177, 2000.

RENWICK, H.; CAMBELL, R.; COE, S. Assessment *in vivo* screening systems for potencial biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. **Plant Pathology**, London, v.40, p. 524-532, 1991.

REVA, O. N.; DIXELIUS, C.; MEIJER, J.; PRIEST, F. G. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. **FEMS Microbiology Ecology**, v.48, p.249–259, 2004.

RICHARDSON, A. E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28, p.897–906, 2001.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnonology Advances**, v.17, p.319-339, 1999.

ROMEIRO, R. S.; BATISTA, U. G. (2002) Preliminary results on PGPR research at the Universidade Federal de Viçosa, Brasil. <http://www.ufv.br/dfp/bac/Cordoba.html>. Acessado em Dezembro de 2006.

ROGGENKAMP, A.; HOFFMAN, H.; HORNEF, M. W. Growth control of small-colony variants by genetic regulation of the hemin uptake system. **Infection and Immunity**, v.72, p.2254-2262, 2004.

ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J. D. Molecular Microbial Ecology: a minireview. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.28, p.135-147, 1997.

SCHLOTTER, M.; DILLY, O.; MUNCH, J. C. Indicators for evaluating soil quality. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v.98, p.255-262, 2003.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v.30, n.3, p.507-512, 1974.

SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S.; SILVA, L. R. C.; LOMBARDI, M. L. C. O.; CARDOSO, E. J. B. N. Interações de micorrizas arbusculares e rizobactérias promotoras do crescimento em plantas de feijão. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.19, p.205-211. 1995.

SILVEIRA, E. B. Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontrole de doenças. In: MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. (Eds.). **Proteção de Plantas na Agricultura Sustentável**. Recife, UFRPE, 2001.

SILVEIRA, E. B.; GOMES, A. M. A.; MARIANO, R. L. R.; SILVA NETO, E. B. Bacterização de sementes e desenvolvimento de mudas de pepino. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.2, p.217-221, 2004.

SOBRAL, J. K. **A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endófitos-plantas**. 2003, 174p., Tese (Doutorado em Agronomia). Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2003.

SOUSA, C. S.; SOARES, A. C. F.; GARRIDO, M. S.; ALMEIDA, G. M. C. O. Estreptomicetos no controle da meloidoginose em mudas de tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.12, p.1759-1766, 2006.

SOUZA, C. A. S.; DIAS, L. A. S. Melhoramento Ambiental e Socio-econômico. In: DIAS, L. A. S. (Ed.). **Melhoramento Genético do Cacaueiro**. Viçosa:FUNAPE-UFG, p.01-47, 2001.

SOUZA, J. T.; MAZZOLA, M.; RAAIJMAKERS, J. M. Conservation of the response regulator gene *gacA* in *Pseudomonas* species. **Environmental Microbiology**, v.5, p.1328-1340, 2003.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; NOWAK, J. Bacterial endophytes: potencial role developing sustainable systems of crop production. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.19, p.1-30, 2000.

TEIXEIRA, M. A.; MELO, I. S.; VIEIRA, R. F. **Diversidade de Bactérias Endofíticas na Cultura da Mandioca**. Jaguariúna-SP: Embrapa Meio Ambiente, 22p. (Embrapa Meio Ambiente, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 33), 2005.

TUITE, J. Plant Pathological Methods: Fungi and Bacteria. Minneapolis. **Burgess Publishing Company**, 1969.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M. Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.61, p.435-440, 2003.

VAZQUEZ, P.; HOLGUIN, G.; PUENTE, M. E.; LOPEZ-CORTEZ, A.; BASHAN, Y. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. **Biology and Fertility of Soils**, v.30, p.460–468, 2000.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v.91, p.127-141, 2001.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v.255, p.571-586, 2003.

WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of Experimental Botany**, v.52, p.487-511, 2001.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho teve como objetivo geral o estudo da comunidade bacteriana associada às raízes de cacaueteiro, englobando a densidade populacional, a diversidade genética e o potencial destas bactérias na promoção de crescimento de mudas.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que as bactérias do gênero *Pseudomonas* são mais competentes na rizosfera do que as bactérias do gênero *Bacillus*. Este fato é evidenciado pelas maiores densidades populacionais de *Pseudomonas* spp. na rizosfera que no solo, sendo a relação inversa observada para *Bacillus* spp. (Capítulo 1). Estes resultados foram também confirmados no Capítulo 2, onde bactérias do gênero *Pseudomonas* foram identificadas através da análise de seqüências do gene *hsp60* como um dos grupos mais numerosos na rizosfera do cacaueteiro. Bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* são também numerosas na rizosfera do cacaueteiro (Capítulo 2). De fato, na literatura científica, muitos autores relatam que bactérias das famílias *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae* são as mais numerosas na rizosfera de diversas espécies vegetais (Sobral, 2003; Teixeira et al., 2005; Ceriglioli, 2005).

No Capítulo 1, as análises com a técnica PCR-RAPD mostraram a grande diversidade genética dos isolados de rizobactérias associadas ao cacaueteiro. Entretanto, as informações obtidas por meio desta técnica não permitem a classificação taxonômica dos isolados. No Capítulo 2, as rizobactérias foram identificadas como pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Pantoea*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Flavobacterium*, e *Enterobacter*.

A produção *in vitro* de enzimas extracelulares, ácido indolacético e solubilização de fosfato em diversos isolados de rizobactérias (Capítulo 2) não é garantia de que estas atividades fisiológicas ocorram *in vivo*. O comportamento inverso também pode ocorrer (Vessey, 2003). Neste trabalho, as atividades fisiológicas *in vitro* foram utilizadas apenas como indicadores do mecanismo de ação das rizobactérias.

Os isolados de rizobactérias avaliados quanto à promoção de crescimento de mudas de cacaueteiro em substrato Plantmax® não foram capazes de estimular incrementos significativos no crescimento das mudas (Capítulo 1). Contudo, em solo não estéril, foram observados aumentos significativos no incremento da

matéria seca das raízes (Capítulo 2). Esta diferença nos resultados de promoção de crescimento se deve, possivelmente, às condições diferenciadas de condução dos experimentos. As características químicas e físicas do substrato Plantmax® são mais favoráveis ao desenvolvimento das mudas (Capítulo 1), do que o solo (Capítulo 2). Isso pode ter influenciado a resposta das mudas às rizobactérias, uma vez que o nível de estresse das mudas no solo é maior do que no Plantmax®. A ação das rizobactérias pode ter diminuído o estresse da planta, refletindo em um incremento do crescimento das mudas apenas no solo. Entretanto, a maioria dos isolados avaliados não promoveram incrementos na biomassa das mudas no solo (Capítulo 2). Isso pode ter ocorrido devido a não colonização ou colonização ineficiente das raízes pelos isolados, fator essencial para a promoção de crescimento (Ranjard et al., 2000; Lugtenberg et al., 2001).

O fato do cacaueteiro ser uma cultura perene contrasta com as avaliações realizadas apenas em mudas neste trabalho. Entretanto, tecnologias microbianas para a melhoria do crescimento e vigor das mudas de culturas perenes são altamente desejáveis para a diminuição do tempo de permanência das mudas em viveiro, levando a uma produção mais precoce (Alfenas et al., 2004; Freitas & Aguilar-vildoso, 2004).

Este trabalho é o primeiro a analisar as densidades populacionais, a diversidade genética e o potencial de rizobactérias para a promoção de crescimento de mudas de cacaueteiro. Portanto, é esperado que um número maior de estudos complementares seja realizado. O pequeno número de isolados avaliados neste trabalho, face à grande diversidade de rizobactérias associadas ao cacaueteiro, indica a necessidade da inclusão de um número maior de isolados em futuros estudos, pois sabe-se que a maioria das bactérias presentes no solo não são capazes de promover o crescimento vegetal (Chen et al., 1996). Ênfase também deve ser dada à análise da colonização destas bactérias nas raízes do cacaueteiro, uma vez que a colonização é fundamental para uma série de processos benéficos mediados por esses microrganismos.

## REFERÊNCIAS COMPLEMENTARES

ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. Rizobactérias e rizobacterização do substrato In: ALFENAS, A. C.; ZAUZA, E. A. V.; MAFIA, R. G.; ASSIS, T. F. (Eds.). **Clonagem e Doenças do Eucalipto**. Viçosa-MG, Editora UFV. v.18, p.108-111, 2004.

CERIGIOLI, M. M. **Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zea mays* L.) e potencial para promoção de crescimento**. 2005, 132p., Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2005.

CHEN, Y.; MEI, R.; LIU, L.; KLOEPPER, J. W. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in Chinese agriculture. In: UTKHEDE, R. S.; GUPTA, V. K. (Eds.) **Management of soil born disease**. Ludhiana: Kalyani Publishers, p.165-184, 1996.

FREITAS, S. S.; AGUILAR-VILDOSO, C. I. Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v.28, p.987-994, 2004.

FREITAS, L. G. **Rizobactérias versus nematóides**. Artigo da Universidade Federal de Viçosa: [www.ufv.br/dfp/lab/nematologia/rizo.pdf](http://www.ufv.br/dfp/lab/nematologia/rizo.pdf). Acessado em Dezembro de 2006.

LUGTENBERG, B. J. J.; DEKKERS, L.; BLOEMBERG, G. V. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.39, p. 461-490, 2001.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environmental. **Research in Microbiology**, v.151, p.167-177, 2000.

SOBRAL, J. K. **A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endófitos-planta**. 2003, 174p., Tese (Doutorado em Agronomia). Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2003.

TEIXEIRA, M. A.; MELO, I. S.; VIEIRA, R. F. **Diversidade de Bactérias Endofíticas na Cultura da Mandioca**. Jaguariúna-SP: Embrapa Meio Ambiente, 22p. (Embrapa Meio Ambiente, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 33), 2005.