

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA

RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE
MUDAS DE *Theobroma cacao* L.

HERON SALAZAR COSTA

Manaus – AM
Abr – 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA

HERON SALAZAR COSTA

RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE
MUDAS DE *Theobroma cacao* L.

Tese apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração Ciências Agrárias.

Orientador: Prof. Dr. José Odair Pereira.

Manaus – AM
Abr – 2007

Ficha Catalográfica
(Catalogação na fonte realizada pela Biblioteca Central - UFAM)

Costa, Heron Salazar

C837p Rizobactérias promotoras do crescimento de mudas de *Theobroma cacao* L. / Heron Salazar Costa. – Manaus: UFAM, 2007.

123 f.; il. color.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2007.

Orientador: Prof. Dr. José Odair Pereira

1. Cacau – Produção agrícola 2. Rizobactérias 3. Cacau - Produção de mudas I.Título

CDU 633.74:631.53.03(043.2)

HERON SALAZAR COSTA

RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE
MUDAS DE *Theobroma cacao* L.

Tese apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração Ciências Agrárias.

Aprovada em 09 de abril de 2007.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. José Odair Pereira (UFAM) – Presidente

Prof. Dr. Carlos Alberto Franco Tucci (UFAM)

Dr. Rudi Emerson de Lima Procópio (CBA)

Dr. Rogério Eiji Hanada (INPA)

Dr. Arlem Nascimento de Oliveira (UFAM)

DEDICO A TODOS QUE, NO
DIA A DIA, TRABALHAM POR UM
MUNDO MELHOR PARA TODOS.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, indefinível, mas sem o qual nada tem sentido para mim. À minha mãe Rogélia Salazar da Silva, que sempre tem me apoiado e orientado no sentido de fazer coisas boas. Sou grato, também a todos os demais familiares, os quais constituem a base de sustentação da minha vida. Em particular, a Antonio Pereira da Silva, o qual já não se encontra mais fisicamente entre nós, mas deixou para mim exemplos e lições de vida que também me ajudaram na busca pelas respostas de algumas das minhas questões existenciais.

A todos que me incentivaram ou que colaboraram direta ou indiretamente com a realização desse trabalho, que alias não são poucos. Dos agricultores que nos receberam em suas propriedades; técnicos que nos apoiaram; todo pessoal do Centro de Pesquisa Almirante Cacau; aos técnicos e servidores da UFAM, aos colegas de turma. E é claro, não posso deixar de registrar minha gratidão ao professor Dr. José Odair Pereira, meu orientador e ao Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho coordenador do PPG-Biotec por ocasião do meu ingresso no programa.

Agradeço também, à SUFRAMA, que patrocinou a bolsa de estudo desde o início do curso em março de 2002 até abril de 2004, ao CPAC, pelo apoio material e de infraestrutura e à FAPEAM, que apoiou financeiramente este projeto.

Não posso deixar de agradecer também ao M.Sc. Raimundo Felipe da Cruz Filho, pelas correções no texto e ao Professor Dr. Carlos A. F. Tucci pela ajuda nas análises estatísticas.

RESUMO

A produção agrícola sofre influência de uma série de fatores, entre os quais a atividade microbiana, muitas vezes depreciando a qualidade dos produtos ou causando perdas. No entanto, microrganismos podem ser usados em proveito da agricultura. Um exemplo de contribuição é o uso de bactérias fixadoras de nitrogênio no cultivo de soja e cana-de-açúcar. Outras bactérias também podem ter uso agrícola, como por exemplo, as Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (RPCP) na produção comercial de mudas. Embora os mecanismos de ação das RPCP ainda precisam de mais esclarecimentos, já é consenso que a produção de reguladores do crescimento vegetal, como AIA (ácido Indol acético), e a inibição da ação de patógenos, seja por competição ou por antagonismo direto devido a secreção de antibióticos, são dois exemplos de possíveis mecanismos envolvidos no processo de promoção do crescimento vegetal. Outro exemplo de mecanismo possivelmente envolvido é o favorecimento da nutrição mineral das plantas. O exemplo mais clássico disso é a solubilização de fosfatos. Considerando o fato de que, em meados de 2002, o governo federal buscava promover a recuperação da lavoura cacaeira, incentivando a adoção de variedades resistentes à vassoura-de-bruxa (*Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer), foi elaborado um projeto pesquisa experimental com o objetivo específico de isolar e caracterizar bactérias promotoras do crescimento de plantas com potencial de uso no processo de produção comercial de mudas de cacaeiro (*Theobroma cacao* L.). Como justificativa, foi argumentado que os resultados poderiam favorecer o desenvolvimento de processos de produção de mudas de cacaeiro com qualidade em menor tempo de viveiro, diminuindo assim os custos de produção. Assim sendo, foram executados ensaios usando-se mudas de cacaeiro como plantas armadilhas para isolamento de rizobactérias. Mudas de cacaeiro foram cultivadas em substratos formados a partir de amostras de solos coletadas em cinco localidades representando três diferentes ecossistemas com históricos de cultivo de

cacau. Com os ensaios de isolamento foram obtidos duzentos e noventa e quatro (294) isolados, dos quais foram identificados dezoito (18) produtores de quitinases, quatro (04) solubilizadores de fosfatos e cinco (05) produtores de AIA. Onze (11) isolados foram usados em dois testes para verificação dos efeitos em mudas de cacauzeiro, no entanto, nenhum deles apresentou efeitos de promoção de crescimento estatisticamente superior a dez por cento (10%) em relação às mudas cultivadas sem inoculação. Tanto os isolados identificados como produtores de quitinases quanto os produtores de AIA que foram usados nos testes com planta não apresentaram resultados significativos a ponto de indicarem um potencial de uso comercial. Contudo, concluiu-se que o uso de rizobactérias no processo de produção comercial de mudas de cacauzeiro ainda pode ser viável, mas a identificação de isolados com esse potencial depende de um trabalho mais detalhado.

ABSTRACT

The agricultural production is influenced by a series of factors, such as microbial activity, devaluing the quality of products or causing losses. However, microorganisms can be used in agricultural production. An example of significant contribution is given by the use of fixative bacteria of nitrogen in soy and sugar-cane, but other bacteria can also contribute to the increase of vegetable production, as by example, the Plant-Growth-Promoting-Rhizobacteria (PGPR) in the commercial production of seedlings. Although the mechanisms of action of the PGPR still are going to be better cleared, already is consensus that the production of regulating of the growth vegetable, as Indol Acetic Acid (IAA), and the inhibition of the action of pathogens, be for competition or by straight antagonism due to secretion of antibiotics, are two examples of possible mechanisms involved in the promotion of the growth vegetable. The nutrition of the plants is another example of possible mechanism of advantage. The most classic example of that is the solubilization of mineral phosphates. Considering the fact then, in 2002, the federal government demonstrated interest in promoting the recuperation of the cacao tilling stimulating the adoption of resistant variety to the witch's broom (*Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer), was prepared a project with objective to isolate PGPR be having potential for application in the process of commercial production of seedlings of cocoa tree. The justification at the time, was it of that the results might favor the development of process of production, of seedlings of cocoa tree with quality in less time in nursery, reducing so the costs of production. The screening tests were executed using seedlings of cocoa tree like plants traps for capture of PGPR. The seedlings of cocoa tree were cultivated in substrates formed from samples of soils collected in five sites representing three different ecosystems with historical of cocoa cultivation. A total of two hundred and ninety four (294) isolated was obtained from capture tests, of which eighteen (18) ones were identified as producers of quitinases, four (4) as producer of phosphatases,

and five (5) as producers of AIA. Eleven (11) isolated were used in two tests to checking their effects on seedlings of cocoa tree. However, none presented effects of promotions of growth statistically add to ten per cent (10%) was observed when compared to seedlings cultivated without inoculation. Though, isolated with pointed characteristics related whit capacity of promotion of growth have also been tested, significant results were not obtained to indicated a potential of commercial use. However, is possible to conclude that the use of PGPR in the process of commercial production of seedlings of cocoa may be viable, but identification of isolated with this potential depends on more detailed works.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Produção mundial de amêndoa de cacao nas safras entre 20001/2002 – 2005/20006 por continente e países. Em mil toneladas.....	22
Tabela 1.2. Elasticidade do preço e renda da demanda do chocolate em alguns países grande consumidores	26
Tabela 1.3. Variáveis do mercado mundial de cacau em amêndoas desde 1969/70 a 2005/06	27
Tabela 1.4 Consumo anual mundial de cacau com base na moagem nos anos de 2001 – 2005. Em mil toneladas.....	28
Tabela 1.5 Estimativa da ICCO sobre o número de pequenos produtores envolvidos com a produção mundial de cacau.....	31
Tabela 2.1. Características dos sítios de coleta e designação das amostras, coletadas no Estado do Amazonas e usadas nos ensaios para isolamento de rizobactérias.....	43
Tabela 2.2. Descrição e número de repetições dos tratamentos testados no ensaio E1/2003.....	51
Tabela 2.3. Relação dos meios usados no ensaio de isolamento de rizobactérias com respectiva diluição das suspensões usadas como fonte de inoculo	55
Tabela 2.4. Relação e descrição sumária dos tratamentos testados no ensaio E2/2003	58
Tabela 2.5. Composição da solução usada para suprir em nutrientes as plantas no ensaio E2/2003	59
Tabela 2.6. Designação e descrição dos tratamentos testados no ensaio E1/2004.....	63
Tabela 2.7 Relação dos isolados escolhidos ao acaso e testados nos dois ensaios com plantas	75

Tabela 3.1. Valores médios das variáveis, altura (Alt1), número de folhas por planta (NFPP) e área foliar média por planta (AFMPP) das mudas de cacauzeiros do ensaio de captura (E1/2003) por ocasião da coleta de amostras de raízes para o isolamento de rizobactérias, aos trinta e três dias após o transplântio (33 DAT).....	79
Tabela 3.2. Número de isolados obtidos no ensaio (E1/2003) realizado em Itajuípe utilizando-se diferentes meios de cultura para isolamento de rizobactérias. (*1).....	80
Tabela 3.3. Valores médios das variáveis de desenvolvimento das mudas de cacauzeiros ao final do ensaio de captura (E1/2003).	82
Tabela 3.4. Número de isolados obtidos no ensaio E2/2003 – primeiro isolamento – a partir da porção superior (Sup) ou inferior (Inf) do sistema radicular de mudas de cacauzeiro.	88
Tabela 3.5. Valores médios das variáveis de desenvolvimento de plantas usadas no ensaio de captura de endofíticos (E1/2003). Plantas com trinta dias após o transplântio (30 DAT).....	89
Tabela 3.6. Quantidade de isolados obtidos a partir de raízes de mudas de cacauzeiro usadas no ensaio para captura de rizobactérias (E1/2004) realizado em Manaus usando diferentes substratos.....	92
Tabela 3.7. Valores médios das variáveis adotadas para acompanhar o desenvolvimento das unidades experimentais no ensaio de captura (E1/2004) realizado em Manaus.	94
Tabela 3.8. Resultado das análises químicas dos substratos usados em cada tratamento do ensaio para captura de rizobactérias realizado em Manaus.....	96
Tabela 3.9. Teores médios de macronutrientes na parte aérea das plantas cultivadas no ensaio E1/2004.	101
Tabela 3.10. Teores médios de micronutrientes na parte aérea das plantas cultivadas no ensaio E1/2004.	102
Tabela 3.11. Relação dos isolados identificados como produtores de AIA e respectivas origens.....	103

Tabela 3.12. Relação dos isolados identificados como quitinolíticos nos testes de bancada.	105
Tabela 3.13 Relação dos isolados identificados como solubilizadores de fosfato e respectivas origens.....	106

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AFMP: Área Foliar Média por Planta;

Alt1: Altura da planta a partir do colo;

Alt2: Altura da planta a partir do ponto de conexão dos cotilédones;

BDA: Meio de cultura basicamente composto por extrato de Bata Dextrose e Agar;

CADE: Conselho Administrativo de Defesa Econômica;

CEPLAC: Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira;

CPAC: Centro de Pesquisa Almirante Cacau;

Cmol_g/kg: Centimol de carga por quilograma;

DAT: Dias Após o Transplântio

DBC: Delineamento em Blocos Casualizados;

DIC: Delineamento Inteiramente Casualizado;

DO: Densidade Ótica;

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária;

ICCO: Organização Internacional do Cacau – The International Cocoa Organization;

IT1: Sítio de coleta número 1 no município de Itacoatiara-AM , ou designação para amostra de solo referente a esse sítio;

IT2: Sítio de coleta número 2 no município de Itacoatiara-AM , ou designação para amostra de solo referente a esse sítio;

ITA: Designação para amostra de solo composta pela mistura das amostras retiradas nos dois sítios (IT1 E IT2) de Itacoatiara-AM;

MAN: Sítio de coleta no município de Manaus-AM, ou designação para amostra de solo referente a esse sítio;

MFPA: Massa Fresca da Parte Aérea;

MFSR: Massa Fresca do Sistema do Sistema Radicular;

MFT: Massa Fresca Total;

MSPA: Massa Seca da Parte Aérea;

MSSR: Massa Seca do Sistema do Sistema Radicular;

NFPP: Número de Folhas por Planta;

PF1: Sítio de coleta número 1 no município de Presidente Figueiredo-AM, ou designação para amostra de solo referente a esse sítio;

PF2: Sítio de coleta número 2 no município de Presidente Figueiredo-AM, ou designação para amostra de solo referente a esse sítio;

TSA: Meio de cultura basicamente composto por Triptona de Soja e Agar;

UE: Unidade Experimental;

UFAM: Universidade Federal do Amazonas;

UFC: Unidades Formadoras de Colônia;

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	19
1. REVISÃO DE LITERATURA	22
1.1 ASPECTOS GERAIS E DE MERCADO DO CACAU.....	22
1.2 ASPECTOS BOTÂNICOS E AGRONÔMICOS DA CULTURA DO CACAU.	29
1.3 RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL	35
1.3.1 ASPECTOS GERAIS	35
1.3.2 MECANISMOS DE AÇÃO DAS RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL	38
2. MATERIAL E MÉTODOS	43
PARTE 1: ENSAIOS PARA ISOLAMENTO DE RIZOBACTÉRIAS	46
2.1 COLETA DAS AMOSTRAS DE SOLO	46
2.1.1 ÁREA DE VÁRZEA, ZONA RURAL DO MUNICÍPIO DE ITACOATIARA- AM.....	46
2.1.2 ÁREA DE TERRA-FIRME, ZONA RURAL DO MUNICÍPIO DE MANAUS- AM, ESTAÇÃO EXPERIMENTAL DA CEPLAC – MAN.....	47
2.1.3 ÁREA DE TERRA-FIRME, ZONA RURAL DO MUNICÍPIO DE PRESIDENTE FIGUEIREDO-AM.	48
2.2 ENSAIO E1/2003: ISOLAMENTO DE RIZOBACTÉRIAS USANDO-SE MUDAS DE CACAUEIRO EM CASA-DE-VEGETAÇÃO COMO PLANTAS ISCAS, REALIZADO NO CPAC – Itajuípe	50
2.2.1 PREPARAÇÃO DOS SUBSTRATOS.....	50

2.2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E TRATAMENTOS.....	50
2.2.3 UNIDADE EXPERIMENTAL (UE) E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
2.2.4 PREPARAÇÃO DAS SEMENTES E PLANTIO.....	52
2.2.5 CONDIÇÃO DE CULTIVO, MANEJO, AVALIAÇÕES E COLHEITA.....	52
2.2.6 ISOLAMENTO	53
2.3 ENSAIO E2/2003: ISOLAMENTO DE ENDOFÍTICOS USANDO MUDAS DE CACAUEIRO EM CONDIÇÕES DE BANCADA DE LABORATÓRIO	56
2.3.1 PREPARAÇÃO DO SUBSTRATO E FONTE DE INÓCULO.....	56
2.3.2 MATERIAL VEGETAL E UNIDADE EXPERIMENTAL.....	57
2.3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E TRATAMENTOS.....	58
2.3.4 CONDIÇÃO DE CULTIVO E AVALIAÇÕES	58
2.3.5 ISOLAMENTO	59
2.3.6 COLHEITA	61
2.4 ENSAIO E1/2004: ISOLAMENTO DE RIZOBACTÉRIAS USANDO-SE MUDAS DE CACAUEIRO EM CASA-DE-VEGETAÇÃO COMO PLANTAS ISCAS, EM MANAUS.....	61
2.4.1 COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	62
2.4.2 PREPARAÇÃO DOS SUBSTRATOS.....	62
2.4.3 UNIDADE EXPERIMENTAL, MATERIAL VEGETAL, DELINEAMENTO E TRATAMENTOS	62
2.4.4 OBTENÇÃO DAS MUDAS, PLANTIO E CONDIÇÕES DE CULTIVO	64
2.4.5 AVALIAÇÃO, COLHEITA E ISOLAMENTO	64

PARTE 2: ENSAIOS DE BANCADA DE LABORATÓRIO PARA PRÉ-SELEÇÃO DOS ISOLADOS	66
2.1 PRÉ-SELEÇÃO DE ISOLADOS OBTIDOS NO CENTRO DE PESQUISA ALMIRANTE CACAU, EM ITAJUÍPE	67
2.1.1 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS PRODUTORES DA AIA.....	67
2.1.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS PRODUTORES DE QUITINASES	69
2.2 PRÉ-SELEÇÃO DE ISOLADOS OBTIDOS EM MANAUS:	70
PARTE 3: EXPERIMENTOS DE AVALIAÇÃO COM PLANTA.....	71
2.1 EXPERIMENTOS COM ISOLADOS ESCOLHIDOS AO ACASO	72
2.1.1 CONDIÇÕES GERAIS DE EXECUÇÃO DOS EXPERIMENTOS.....	72
2.1.2 PLANTIO E INOCULAÇÃO	73
2.1.3 PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE ISOLADOS.....	74
2.1.4 CONDUÇÃO, AVALIAÇÕES E COLHEITA.....	75
2.2 EXPERIMENTO COM ISOLADOS QUITINOLÍTICOS E PRODUTORES DE AIA	76
2.2.1 PREPARAÇÃO, INSTALAÇÃO E CULTIVO	77
2.2.2 AVALIAÇÃO, COLHEITA E ANÁLISE ESTATÍSTICA	77
3. RESULTADOS, ANÁLISE E DISCUSSÃO	78
3.1 ISOLADOS OBTIDOS COM OS ENSAIOS EM ITAJUÍPE-BA.	78
3.2 ISOLADOS OBTIDOS COM O ENSAIO DE CAPTURA REALIZADO EM MANAUS	92
3.3 ANÁLISE DOS EFEITOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DAS PLANTAS DURANTE OS ENSAIOS DE CAPTURA	98

3.3 ISOLADOS PRÉ-SELECIONADOS NOS ENSAIOS DE BANCADA	103
3.3.1 ISOLADOS PRODUTORES DE AIA	103
3.3.2 ISOLADOS PRODUTORES DE QUITINASES	104
3.3.3 ISOLADOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO	105
3.4 EFEITO DA INOCULAÇÃO DOS ISOLADOS PRÉ-SELECIONADOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE MUDAS DE CACAUEIRO.....	106
4 CONCLUSÃO.....	107
5. BIBLIOGRAFIA	109
ANEXOS	Error! Bookmark not defined.

INTRODUÇÃO

O cacauieiro (*Theobroma cacao* L.) é uma planta mundialmente conhecida por ser a fonte da matéria prima para o chocolate, um importante produto no mercado internacional, obtido a partir da amêndoa do fruto, o cacau. Grande parte da atual produção mundial de amêndoa de cacau é originária de países caracterizados economicamente como em desenvolvimento, enquanto os maiores consumidores são países desenvolvidos. A amêndoa e o chocolate já tiveram participação expressiva na pauta de exportações do Brasil, no entanto, a recuperação da competitividade da capacidade produtiva brasileira dessa *commodity* depende da solução de problemas associados à baixa produtividade e elevados custos de produção.

O processo de industrialização do cacau é caro e complexo, mas o cultivo do cacauieiro é relativamente fácil em regiões de clima tropical úmido com solos medianamente férteis, isentas de doenças tradicionalmente danosas. No Brasil, as plantações de cacau são feitas, na maioria das vezes, sem a necessidade de limpeza mecanizada da área, pelo contrário, normalmente é aproveitado o sombreamento natural, após a derrubada de poucas árvores. De certa forma, tal procedimento tem ajudado preservar parte das matas nativas e caracterizar o cultivo do cacau como atividade tipicamente de agricultura familiar de baixo impacto ambiental.

A “vassoura-de-bruxa” e a “podridão parda” são duas doenças que causam enormes prejuízos à cacauicultura do Brasil e com isso agravam ainda mais a crise iniciada com a baixa cotação do preço internacional no início dos anos 80. Uma crise causada em parte pelo aumento da oferta resultante da participação cada vez maior da produção africana e asiática no mercado internacional. Ao longo da convivência com as doenças do cacauieiro, vem sendo feita a renovação da lavoura com a adoção de cultivares resistentes, principalmente à vassoura-de-bruxa. Tal medida vem sendo

compatibilizada com o controle químico e adoção de boas práticas de manejo. Com tudo, o fato é que a queda da produção da lavoura cacaueteira brasileira foi muito grande e ainda precisa ser recuperada para que sejam amenizados os prejuízos sociais e econômicos decorrentes.

A adoção de cultivares resistentes para controle das doenças tem como desvantagem a substituição das plantas antigas pelas de novas variedades, tendo como consequência o aumento de custos e diminuição do ritmo de produção. Tal efeito negativo pode ser diminuído com uma produção eficiente de mudas com melhor qualidade, o que garante maior índice de sobrevivência e mais rápido crescimento em campo. Por ser um processo no qual é possível maior controle, a produção de mudas vem sendo apontada como uma das grandes possibilidades para aplicação das chamadas “Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas” (RPCP).

A designação RPCP é dada a um grupo de bactérias que tem a rizosfera da planta como ambiente e que de alguma forma favorece o crescimento das plantas. Os mecanismos pelos quais elas promovem o crescimento têm motivado pesquisas visando aplicação na produção agrícola.

O uso de RPCP pode se constituir em um diferencial na diminuição dos custos de produção da cultura do cacau, tendo como benefícios uma muda com melhor qualidade, a diminuição do tempo de formação e o uso de menor quantidade de fertilizantes. No entanto, para que isso seja possível, os fatores condicionadores do crescimento da planta, que são afetados pela atividade das RPCP, precisam ser mais bem estudados, pois só assim serão possíveis intervenções com resultados previsíveis.

Considerando o fato de que em 2003 estavam sendo desprendidos esforços no sentido de recuperar a produção nacional de cacau, foi montada uma proposta de trabalho com o objetivo específico de isolar bactérias promotoras do crescimento de

plantas com potencial de uso no processo de produção comercial de mudas de cacaueteiro. Como meta, esperava-se obter pelo menos um isolado ou uma combinação capaz de promover o crescimento de mudas de cacaueteiro com um diferencial superior a dez por cento (10%) em relação ao observado em mudas normalmente produzidas no processo comercial. Tal projeto foi justificado levando-se em conta a oportunidade que ele proporcionaria para ampliar a base de conhecimento sobre a diversidade genética microbiana da região amazônica e por buscar aplicação desses recursos no processo produtivo. Além disso, se justificou também pela importância que a produção de cacauete já teve e pode voltar a ter para economia brasileira.

Esse trabalho foi idealizado em consonância a um dos objetivos principais do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – (PPG-Biotec), o de dinamizar as atividades de pesquisa em biotecnologia com aproveitamento da biodiversidade da região. Além disso, seu desenvolvimento se constituiu em oportunidade para o aprimoramento e capacitação de recursos humanos em técnicas de microbiologia, uma área considerada estratégica para o aproveitamento dos recursos biológicos da Amazônia. Outro ponto favorável foi o fato da proposta estar em consonância com a tendência de se investir em produtos biológicos que possam substituir produtos químicos sintéticos nas lavouras, e assim incrementar a base de conhecimento sobre a pesquisa agropecuária.

Pouco se conhece sobre a diversidade de microorganismos presentes nos solos amazônicos. As possibilidades de interações entre plantas e microorganismos com potencial de uso comercial são mais desconhecidas ainda. Portanto, isolar bactérias e testá-las quanto a capacidade de promover o crescimento de plantas de interesse agrícola é uma forma de se tentar aproveitar o potencial da diversidade biológica oferecida por essa região.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 ASPECTOS GERAIS E DE MERCADO DO CACAU

Conforme dados da International Cocoa Organization – ICCO (2007A) apresentados na tabela 1.1, a produção mundial de amêndoa de cacau dos últimos cinco anos ficou concentrada em nove países, todos caracterizados economicamente como em desenvolvimento.

	2001/02		2002/03		2003/04		2004/05		2005/06	
África	1952	68,1%	2231	70,4%	2550	72,1%	2379	70,3%	2577	71,8%
Camarões	131	4,57%	160	5,0%	162	4,58%	184	5,44%	168	4,68%
Costa do Marfim	1265	44,12%	1352	42,6%	1407	39,78%	1286	38,02%	1387	38,61%
Gana	341	11,89%	497	15,7%	737	20,84%	599	17,71%	741	20,63%
Nigéria	185	6,45%	173	5,5%	180	5,09%	200	5,91%	170	4,73%
Outros	31	1,08%	50	1,6%	64	1,81%	110	3,25%	112	3,12%
América	377	13,1%	428	13,5%	462	13,1%	443	13,1%	447	12,4%
Brasil	124	4,32%	163	5,14%	163	4,61%	171	5,06%	162	4,51%
Equador	81	2,82%	86	2,71%	117	3,31%	116	3,43%	115	3,20%
Outros	173	6,00%	179	5,65%	182	5,14%	157	4,64%	170	4,73%
Ásia & Oceania	538	18,7%	510	16,1%	525	14,8%	560	16,6%	568	15,8%
Indonésia	455	15,87%	410	12,94%	430	12,16%	460	13,60%	470	13,08%
Malásia	25	0,87%	36	1,14%	34	0,96%	29	0,86%	30	0,83%
Papua Nova Guiné	38	1,32%	43	1,36%	39	1,10%	48	1,42%	48	1,34%
Outros	19	0,66%	21	0,66%	22	0,62%	23	0,68%	20	0,56%
Total	2867		3169		3537		3382		3592	

Tabela 1.1. Produção mundial de amêndoa de cacau nas safras entre 20001/2002 – 2005/20006 por continente e países. Em mil toneladas

Obs. Os valores totais podem diferir das somas devido ao arredondamento. Adaptado de: ICCO (2007A) – Quarterly Bulletin Cocoa Statistics. Volume XXXII, 2005/06.

Dentre os países produtores de amêndoa, merecem destaque Costa do Marfim e Gana, responsáveis por quase sessenta por cento (60%) da produção mundial na safra 2005/2006. O Brasil figura com uma participação que variou entre 4,32 – 5,14% do total mundial nas últimas cinco safras.

Segundo dados de 2005 da Associação Brasileira da Indústria de Chocolate, Cacau, Balas e Derivados – ABICAB (2007), em sua página na Internet (www.abicab.org.br), o faturamento do setor foi de oito bilhões e meio de reais (R\$ 8,5 bi), sendo cinco vírgula seis bilhões (R\$ 5,6 bi) em Chocolates, dois e meio bilhões (R\$ 2,5 bi) em balas, confeitos e gomas de mascar e quatrocentos e sessenta e seis milhões (R\$ 466 mi) em amendoins. As exportações geraram trezentos e vinte e três milhões de dólares (US\$ 323 mi), com uma venda total de duzentos e cinco (205) mil toneladas, para cento e cinqüenta e dois (152) países de todo o mundo, sendo Estados Unidos, África do Sul, Argentina, Paraguai, Bolívia, Chile, Canadá, México, Uruguai e Angola, os dez (10) maiores compradores. Tais valores dão uma idéia da importância da indústria de chocolates na economia brasileira e chamam a atenção para cultura de cacau.

O mercado internacional de chocolate como um todo é caracterizado como fortemente fiscalizado, regularizado, instável e susceptível à operações especulativas por parte da indústria chocolateira (ICCO, 1993). Não obstante, os países produtores de amêndoa se constituem no elo mais fraco da cadeia produtiva, pois as grandes companhias que controlam a comercialização e industrialização de cacau encontram-se em posição altamente vantajosa em relação aos produtores dos países em desenvolvimento, uma vez que a agregação de valor depende de processos industriais complexos não disponíveis nos países em desenvolvimento. Como acontece com outras commodities agrícolas, também a taxa de remuneração dos produtores de cacau é muito baixa. Cerca de setenta por cento (70%) do preço final ao consumidor remunera as empresas transformadoras e

distribuidoras, enquanto que os produtores não recebem mais de cinco por cento (5%) desse preço. Isso ocorre em parte devido ao fato de que o processo de manufatura normalmente adotado necessita de equipes técnicas caras e de alto nível de formação, dificilmente suportável pelos países em desenvolvimento. Além disso, existem enormes barreiras, tais como cotas, impostos, licenças, etc., impostas pelos países desenvolvidos aos produtos manufaturados em países em desenvolvimento (ICCO, 1993; PINAZZA; ALIMANDRO, 2001). Como agravante se observa um aumento na concentração do poder de mercado de algumas multinacionais que vão absorvendo gradualmente as pequenas e médias empresas. Quanto a isso, destacam-se as políticas expansionistas e a publicidade agressiva de grupos como Nestlé, Jacobs Suchard (comprada pelo grupo Philip Morris dos EUA em 1990), Mars, Cadbury e Ferrero que impõem suas condições em grande parte do mercado internacional. No Brasil, merece destaque a compra da Garoto pela Nestlé em fevereiro de 2002. Operação que foi julgada pelo Conselho Administrativo de Defesa Econômica – CADE (2004), como prejudicial ao mercado, uma vez que isso levaria à formação de um duopólio no mercado de chocolates. Com a aquisição da Garoto, a Nestlé ficou, na época, com cinquenta e oito por cento (58%) do mercado brasileiro de chocolates, nas contas do CADE, ou com quarenta e sete por cento (47%), segundo a empresa. Com trinta e três por cento (33%) do mercado, a Kraft, dona da marca Lacta, seria a única rival efetiva da Nestlé (O GLOBO, 2007).

Um fato que também mostra a tendência de concentração de poder de mercado nas mãos das grandes indústrias é a diminuição da moagem nos países produtores acompanhada de aumento da quantidade moída nos países desenvolvidos, o que vem sendo observado nos últimos anos. Segundo consta na revisão da situação de mercado de cacau de setembro de 2006 (ICCO, 2006), no ano cacau 2005/2006, a moagem nos países importadores cresceu um pouco mais de cinco por cento (5%), e em torno de dois por

cento (2%) nos países produtores, em relação ao ano anterior, no entanto, a participação mundial dos países produtores decaiu de trinta e oito (38) para trinta e sete por cento (37%).

O principal país moageiro de cacau é a Holanda com 445 mil toneladas, participando com quatorze por cento (14%) das moagens mundiais. Em seguida vem os Estados Unidos com quatrocentos e dez mil toneladas (410 mil t), Costa do Marfim com 305 mil t, Malásia e Indonésia juntas com 300 mil t, Alemanha com 224 mil t e Brasil com 202 mil t, ocupando a segunda, terceira, quarta, quinta e sexta (2^a, 3^a, 4^a, 5^a e 6^a) posição, respectivamente. A Comunidade Européia como um todo já participa com trinta e nove por cento (39%) das moagens, seguida pelos Estados Unidos com treze por cento (13%) e Costa do Marfim com dez por cento (10%). O Brasil, ocupando a sexta classificação participa com somente seis por cento (6%). No ano de 2003, as principais empresas moageiras situadas no Brasil tiveram a seguinte participação na moagem nacional: Cargil (33 %), Adm Cocoa – Joanes (23 %), Barry Callebaut (22 %), Nestlé (13%), e Indeca (9%).

Segundo estudo apresentado pela ICCO (1993), o chocolate se caracteriza como um produto de preço e renda inelásticos no curto tempo, nesse estudo comparou-se a elasticidade da renda e preço da demanda em um mesmo país grande consumidor no curto e no longo prazo (tabela 1.2). O resultado mostra que mudanças de renda têm mais efeito sobre o consumo do que mudanças no preço. Por exemplo, um decréscimo de dez por cento (10%) no preço do cacau nos EUA, no curto tempo, irá resultar em um vírgula noventa e nove por cento (1,99%) de aumento no consumo, enquanto que dez por cento (10%) no aumento da renda tem o dobro do efeito, chegando a aumentar em quatro vírgula vinte e seis por cento (4,26%) o consumo.

	Preço		Renda	
	Curto prazo	Longo Prazo	Curto prazo	Longo Prazo
França	-0,093	-0,168	0,504	0,908
Alemanha	-0,120	-0,292	0,231	0,561
Reino Unido	-0,302	-0,436	0,205	0,296
Países do leste Europeu	-0,151	-0,252	0,261	0,437
USA	-0,199	-0,295	0,426	0,632
Canadá	-0,183	-0,279	0,210	0,321
Japão	-0,257	-0,413	0,329	0,529
Global	-0,091	-	0,647	-

Tabela 1.2. Elasticidade do preço e renda da demanda do chocolate em alguns países grande consumidores

FONTE: ICCO (1993) – The world cocoa market: An analysis of recent trends and of prospects to the year 2000. London: ICCO, 1993, 29p.

O preço do cacau em amêndoas no mercado internacional vem sendo objeto de especulações desde os anos setenta quando atingiram suas mais altas cotações até hoje registradas. Conforme pode se observar a seguir, na tabela 1.3, nos anos 80, os preços do cacau desceram rapidamente, em parte, como consequência de uma maior disponibilidade do produto no mercado mundial. No início dos anos 90, manteve-se artificialmente estável devido à existência de estoques. Em 1994, o financiamento do preço em um patamar artificial revelou-se danoso, originando uma “crise do cacau” em alguns países produtores. Os pequenos produtores de cacau africanos e latino-americanos defrontam-se desde então com quebras dos rendimentos e a mercê de movimentos especulativos (PINAZZA; ALIMANDRO 2001; 2002).

A previsão confirmada de déficit da produção em relação a moagem para o ano de 2001 associada a uma crise política no maior produtor mundial, Costa do Marfim, fez a cotação oscilar bastante no ano de 2000. A partir de 2001, conforme pode se observar na tabela 1.4, o consumo mundial para moagem tem aumentado nos últimos cinco anos. Esse aumento está em parte associado ao crescimento econômico mundial e ao aumento de renda nos países consumidores, no entanto, o preço ainda tem sofrido várias oscilações especulativas associadas à instabilidade política dos países produtores africanos.

Períodos	Produção	Estoque			Preço Diário da ICCO		
		Moagens (A)	Saldo	Acumulado (B)	Razão (B/A)	Media Annual	
		MIL TONELADAS			PERCENTUAL	US\$/t	DES/t*
1969/70	1417	1356	47	377	27,8	730	730
1970/71	1554	1418	120	497	35,1	586	586
1971/72	1580	1527	37	534	35	583	545
1972/73	1409	1544	-149	385	25	1014	865
1973/74	1452	1497	-60	325	21,7	1455	1209
1974/75	1538	1477	46	371	25,1	1331	1091
1975/76	1499	1495	-11	360	24,1	1655	1429
1976/77	1343	1429	-99	263	18,4	3632	3130
1977/78	1504	1379	110	373	27	3283	2683
1978/79	1509	1478	16	389	26,3	3504	2714
1979/80	1671	1485	169	558	37,6	2825	2166
1980/81	1695	1558	120	678	43,5	2098	1735
1981/82	1732	1601	114	792	49,5	1868	1656
1982/83	1525	1628	-118	674	41,4	1949	1815
1983/84	1512	1704	-207	467	27,4	2412	2320
1984/85	1956	1864	72	539	28,9	2222	2234
1985/86	1975	1849	106	645	34,9	2149	1890
1986/87	2011	1910	81	726	38	2023	1607
1987/88	2197	1986	189	915	46,1	1707	1269
1988/89	2464	2133	306	1.221	57,3	1344	1035
1989/90	2406	2202	180	1.401	63,6	1193	902
1990/91	2506	2334	147	1.548	66,3	1193	863
1991/92	2266	2327	-84	1.465	62,9	1166	831
1992/93	2485	2409	51	1.525	63,3	1051	751
1993/94	2486	2500	-39	1.486	59,4	1370	968
1994/95	2486	2511	-50	1.214	48,3	1440	954
1995/96	2486	2678	-217	997	37,2	1438	983
1996/97	2712	2710	-25	972	35,9	1556	1117
1997/98	2690	2768	-105	867	31,3	1711	1269
1998/99	2808	2756	+24	891	32,3	1298	944
1999/2000	3077	2958	+88	1398	47,3	919	685
2000/2001	2854	3058	-233	1165	38,1	990	775
2001/2002	2861	2875	-43	1122	39,0	1580	1231
2002/2003	3143	3052	+60	1182	38,7	1873	1369
2003/2004	3537	3238	+277	1682	51,9	-	1047
2004/2005	3382	3343	+5	1687	50,5	-	1049
2005/2006	3592	3476	+80	1767	50,8	-	1068

Tabela 1.3. Variáveis do mercado mundial de cacau em amêndoas desde 1969/70 a 2005/06

FONTE (adaptado): Quarterly Bulletin of COCOA STATISTICS - ICCO – v. 29, n.2 - 2000/01 (2004); v.30, n.4 – 2003/04 (2005) e v.32, n.1 - 2005/06 (2007). OBS: * (DES/t) - Direitos Especiais de Saque por toneladas.

Se o processo de industrialização do chocolate é complexo, limitando a entrada de novos concorrentes, por sua vez, o cultivo e a produção de cacau é relativamente fácil em regiões de clima tropical úmido isentas das principais doenças.

	2001/02		2002/03		2003/04		2004/05		2005/06	
Europa	1.282	44,4%	1.320	42,9%	1.346	41,6%	1.375	41,1%	1.462	42,1%
Alemanha	195		193		225		235		302	
Países Baixos	418		450		445		460		470	
Outros	669		677		676		680		690	
África	421	14,6%	447	14,5%	446	14,4%	493	14,8%	507	14,6%
Costa do Marfim	290		315		335		364		360	
Outros	131		131		131		130		147	
América	767	26,6%	814	26,4%	852	26,3%	853	25,5%	856	24,6%
Brasil	173		196		207		209		223	
EUA	403		410		410		419		426	
Outros	192		208		235		225		207	
Ásia e Oceania	416	14,4%	499	16,2%	575	17,7%	622	18,6%	651	18,7%
Indonésia	105		115		120		115		120	
Malásia	105		150		203		250		250	
Outros	206		234		252		257		281	
Total mundo	2.885		3.079		3.238		3.343		3.476	

Tabela 1.4 Consumo anual mundial de cacau com base na moagem nos anos de 2001 – 2005. Em mil toneladas

FONTE: ICCO Quarterly Bulletin Cocoa Statistics. Volume XXXII, n.1, ano cacau 2005/06 (2007). Obs.: Os totais podem ser diferentes devido ao arredondamento.

O Brasil já ocupou o primeiro (1º) lugar na lista de produção mundial de cacau. No entanto, no ano de 2006 ficou em sexto lugar na classificação mundial da ICCO dos países produtores (tabela 1.1), contribuindo com aproximadamente quatro e meio por cento (4,5%) na produção mundial, perdendo em participação para Costa do marfim (38,61%), Gana (20,63%) e até mesmo para Indonésia (13,08%) e Nigéria (4,73%). Um fato que marcou drasticamente a história da cacauicultura no Brasil foi a chegada da doença “vassoura-de-bruxa” aos cacauais da Bahia em 1989, fugindo do controle e causando enormes prejuízos a partir de 1994. Tal fato apenas agravou uma crise que na verdade já havia se iniciado com a baixa cotação do preço internacional causada em parte pelo aumento da oferta devido à participação cada vez maior da produção africana no mercado.

Para se ter uma idéia da decadência sofrida pela cacauicultura basta salientar que no período de 1986-87 foram produzidas duzentos e trinta mil e novecentos e quarenta e oito toneladas (230.948t), já na safra de 1995/96, que ficou marcada como a expressão máxima do efeito da conjunção de dois fatores negativos, baixa cotação do preço e o ataque da vassoura de bruxa, a produção baiana foi de apenas cento e sessenta mil trezentos e noventa toneladas (160.390t), correspondendo a setenta e quatro vírgula doze por cento (74,12%) da produção total registrada no Brasil. O que é pior, a produção de 2001 foi insuficiente até para abastecer a demanda interna, obrigando a muitas das empresas processadoras, senão fecharem suas portas, como muitas já o fizeram, importar cacau da África, configurando um quadro completamente contrário ao anterior (BUENO, 2001; PINAZZA, ALIMANDRO 2001; 2002).

1.2 ASPECTOS BOTÂNICOS E AGRONÔMICOS DA CULTURA DO CACAU

O cacauieiro (*Theobroma cacao* L.) é originário de regiões de floresta pluviais da América Tropical, muito provavelmente da região Amazônica, sendo encontrado até hoje em estado silvestre, no Peru, Equador Colômbia, Venezuela e Oeste da região amazônica brasileira. Pertence ao gênero *Theobroma*, da família *Sterculiaceae* ordem *Malvales* e tem o genoma (2n) composto de vinte (20) cromossomos. Em condições naturais chega atingir mais de doze metros (12m) de altura, mas quando cultivado alcança até seis metros (6m). Foi citado pela primeira vez na literatura botânica por Charles de L'Ecluse, que o descreveu sob o nome de *Cacao fructus*. Em 1937, foi descrito como *Theobroma fructus* por Linneu, que em 1753 propôs o nome *Theobroma cacao*, permanecendo até hoje (GUATRECASAS, 1964; CORAL, 1987; CAVALCANTE, 1991; SILVA NETO *et al.* 2001).

A família *Sterculiaceae* possui cerca de 50 gêneros e 750 espécies, sendo 22 de ocorrência na América tropical. Além do *T. cacao*, outras espécies servem para fornecer chocolate, tais como *T. grandiflorum*, *T. angustifolium*, *T. glaucum*, *T. gileri*, e *T. speciosum*. Com base em aspectos morfológicos da flor, fruto e semente, as variedades são diferenciadas em três grupos: Criollo, Forasteiro e Trinitários. No entanto, segundo Figueira *et al.* (1994), essa classificação não possui similaridade com o fenograma construído com base em marcadores com RAPD e rDNA.

O fruto do cacauero, ligado a planta por um pedúnculo lenhoso é uma baga indeiscente, pentalocular, de formato variado; quando imaturo é de coloração verde e amarelo-pálida e amarelo-avermelhada quando maduro, pode ainda ser roxo, dependendo da variedade; apresenta pericarpo carnoso composto por epicarpo, mesocarpo e endocarpo bem distintos. O conteúdo do fruto é aromático e a mucilagem que envolve as sementes é doce de sabor agradável. O fruto contém, em média, de trinta a quarenta (30 – 40) sementes podendo chegar a cinquenta (50). A semente é vulgarmente chamada de amêndoa ou grão. Tecnicamente denomina-se amêndoa a que já sofreu fermentação e secagem, e de grão ou semente para as no mesmo estado em que foram retiradas do fruto e que podem ser usadas para propagação. O tempo levado desde a fecundação até a maturidade varia sensivelmente de fruto para fruto e de árvore para árvore. Em média, se tem de cento e sessenta e sete (167) dias para as variedades originadas na região leste da Amazônia, cento e oitenta e dois (182) para os plantados na África, e duzentos (200) dias para os do grupo trinitário (GUATRECASAS, 1964; CAVALCANTE, 1991).

A cacauicultura é caracterizada como uma atividade agrícola tipicamente de pequenos produtores e com baixo impacto ambiental. De acordo com ICCO (2007B), aproximadamente noventa por cento (90%) da produção mundial de cacao se origina de

pequenos produtores (Tabela 1.5). Sendo que, na África e Ásia as áreas de exploração variam entre dois a cinco hectares (2 – 5 ha).

O modo de cultivo tradicionalmente adotado se caracteriza como de baixo impacto ambiental, uma vez que as plantações de cacau são feitas na maioria das vezes sem a necessidade de limpeza mecanizada da área, se aproveitando o sombreamento da mata natural após uma derrubada de poucas árvores, preservando parte das matas nativas.

Países por continente	Total de trabalhadores (milhões)
África	10.50
Camarões	1.60
Costa do Marfim	3.60
Gana	3.20
Nigéria	1.20
Serra Leoa	0.38
Togo	0.40
Outros	0.12
Américas	1.39
Brasil	0.21
Colômbia	0.28
Republica Dominicana	0.20
Equador	0.28
Venezuela	0.18
Outros	0.25
Ásia & Oceania	2.11
Indonésia	1.60
Malásia	0.31
Papua Nova Guiné	0.10
Outros	0.10
Mundo	14.00

Tabela 1.5 Estimativa da ICCO sobre o número de pequenos produtores envolvidos com a produção mundial de cacau

FONTE: ICCO (2007B). Obs.: Propriedades com menos de 3 hectares de cultivo de cacau (na definição usual, as pequenas propriedades são caracterizados como fazendas com menos de 10 hectares, variando de 2 a 5); Estima-se em 2,5 milhões de pequenos produtores, podendo chegar a 3 milhões se forem incluídos os que não têm o cacau como atividade principal. A produtividade média é de 350 kg/ha (variando de 200 kg no Equador a 1500 kg para os pequenos produtores na Indonésia).

O cultivo de cacau ocorre em regiões de clima tropical úmido de altitudes inferiores a 1.250m, com temperaturas médias anuais levadas com pequenas flutuações. É uma cultura considerada como exigente em termos de fertilidade do solo, mas pode se adaptar a

vários tipos de solos. Pode se desenvolver em solos muito ácidos, com pH inferior a cinco (5,0) e solos alcalinos, com pH superior a oito (8,0), sendo que o ideal é entre seis a sete (6,0 – 7,0). Na Amazônia brasileira, é encontrado nas margens dos rios, principalmente nas várzeas altas, sujeitas a inundações anuais que encobrem parte do tronco das árvores por um período de três a quatro (3 – 4) meses entre maio e agosto. Nessas áreas, os solos são aluviais, de origem recente, formados pela sedimentação resultante das enchentes, e são classificados como Aluviais Gleis Pouco Húmicos distróficos ou Eutróficos, segundo a classificação do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística e o Centro Nacional de Pesquisa em Solos da Embrapa – IBGE CNPS/Embrapa (2002). Nos cacauais típicos de solos de várzea, as plantas crescem normalmente em grupos de até cinco plantas densamente sombreados por árvores típicas das várzeas. Devido ao elevado sombreamento e ao regime de enchentes, o cacauero de várzea tem crescimento lento e baixa produtividade, em torno de sessenta quilogramas por hectare (60kg/ha). Pesquisas conduzidas na Bahia demonstraram que a redução da sombra pode aumentar os rendimentos das plantações (SILVA NETO *et al.*, 2001). O efeito do sombreamento sobre o crescimento de cacaueros já foi avaliado e já se sabe que os cultivados em exposição ao sol declinam a produção mais rapidamente que aqueles mantidos sob sombreamento adequado (DAYMOND e HADLEY, 2004). No Brasil em plantações feitas em áreas limpas, adotam-se dois tipos de sombreamento: o provisório na fase de implantação e o definitivo que acompanha a vida da lavoura. Para o sombreamento temporário são utilizadas tradicionalmente plantas de bananeira (*Musa* spp.) altas. E para o sombreamento definitivo, principalmente, espécies de *Erythrina* (*E. glauca*, *E. poeppigiana* e *E. velutina*). Na Bahia, a CEPLAC e os agricultores preocupados com a preservação da mata, vêm discutindo a utilização de cultivos em sistemas agro-florestais, o que reduzirá futuros problemas ambientais. A própria característica de clima e relevo da região, impõe a

utilização das terras com cultivos adaptados à mesma, tornando-se por natureza uma região agro-florestal, haja vista a utilização do sistema cacau/cabruca (plantio de cacauzeiros sob mata raleada ou sub-bosque de forma descontínua e circundada por vegetação natural) há muitos anos, sendo considerado um sistema eficiente e correto (SILVA NETO *et al.*, 2001).

Um grande problema enfrentado pelos países produtores próximos à região de origem, como Brasil, Colômbia, Venezuela e Equador são as perdas devido ao ataque de doenças tradicionalmente danosas, como a “vassoura-de-bruxa”, causada pelo fungo *Crinipellis pernicioso* (Stahel) Singer, e as “podridões”, causadas por algumas espécies de fungos do gênero *Phytophthora*. Em alguns casos, tais perdas comprometem a produtividade mínima que garante a viabilidade econômica da lavoura. A “Vassoura-de-bruxa” é um problema crônico que acompanha a cultura de cacau desde a sua região de origem e de seus primeiros cultivos em grande escala. Um problema que os métodos tradicionais de controle ainda não conseguiram solucionar a contento. A outra doença de grande importância, a “podridão parda do fruto”, destaca-se em termos mundiais como a principal doença do cacauzeiro, pois ocorre em todos os países produtores de cacau (LUZ *et al.*, 2001). Segundo Luz *et al.* (2001) as perdas provocadas por *Phytophthora* spp oscilam entre vinte a trinta por cento (20 – 30%) da produção de frutos, no Brasil. Enquanto que na África, principalmente em Gana, Nigéria e Camarões, as perdas variam entre cinquenta a oitenta por cento (50 – 80%). Vale salientar que a podridão parda perdeu importância econômica na Bahia nos últimos 10 anos em comparação com as perdas por “Vassoura-de-bruxa”, no entanto, por ser de ocorrência ampla, dependendo das condições climáticas, os danos variam muito de ano para ano nos diferentes estados do Brasil.

A expansão da cacauicultura na África foi facilitada por vários fatores, dentre os quais: regime de propriedade de terras, grande contingente de mão de obra barata e

perfeitamente integrada ao meio rural, além da ausência do fungo causador da “vassoura-de-bruxa” até a presente data. A Costa do Marfim é atualmente o maior produtor, respondendo por quase um terço da produção mundial graças às condições de clima, solo e fitossanidade que garantiram altos índices de produtividade. Segundo a Organização para Agricultura e Alimentos das Nações Unidas – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO (2002), a produtividade média na Costa do Marfim foi de quinhentos e noventa e quatro quilos por hectare (594,0 kg/ha) em 2000, enquanto a produtividade média brasileira foi de duzentos e setenta e sete quilogramas por hectare (277,0 kg/ha), que é inferior também à produtividade de Gana (303,7 kg/ha). Vale observar que a produtividade dos países africanos naquela época se devia muito mais às boas condições naturais de cultivo do que a um investimento pesado na incorporação de tecnologias modernas. No Brasil, boa parte das perdas é devido ao ataque de doenças, portanto, esse é um problema que deve ser enfrentado com maior empenho a fim de melhorar a competitividade do cacau brasileiro no mercado internacional. Investir na prevenção e combate aos patógenos do cacau é uma estratégia de competitividade de longo prazo, pois o ataque de doenças também pode ocorrer naqueles locais em que a cultura foi introduzida, como é o caso dos países africanos.

Uma alternativa para o aumento da produtividade consiste na melhoria do desempenho produtivo da planta. O que pode ser conseguido pelo melhoramento genético e por meio do aproveitamento das interações positivas entre plantas e microrganismos. O uso de interações positivas entre microorganismo e plantas no processo de produção agrícola tem seu melhor exemplo na produção de soja baseada na fixação simbiótica de nitrogênio. No entanto, o potencial de aplicação de microrganismos em processos produtivos agrícolas é enorme (LYNCH, 1983; SIQUEIRA; FRANCO, 1988; SIQUEIRA *et al.* 1994; MELO, AZEVEDO, 1998). O uso de microrganismos associados ao sistema

radicular das plantas para promoção do crescimento e combate à doenças vem sendo bastante estudado nos últimos anos e tem apresentado bons resultados para diversas culturas (BASHAN, LEVANONY, 1990; LUGTENBERG *et al.*, 1991; OKON, ITZIGSOHN, 1995). Embora a maioria dos trabalhos se refiram à culturas de ciclo curto, existe a possibilidade de aplicação também em culturas perenes como o cacau.

A produção de mudas é uma fase onerosa do processo de produção das culturas perenes. Nessa fase, o uso de microorganismos promotores de crescimento pode ser muito bem aplicado. Para cacauicultura Brasileira, isso pode se constituir em um diferencial na busca pelo aumento da produtividade e para diminuição dos custos de produção. De maneira generalizada, pode-se dizer que o uso de rizobactérias na produção de mudas pode contribuir com a redução do tempo de formação e aumento da qualidade final das mudas, e dessa forma contribuir no esforço para recuperar a importância econômica dessa cultura agrícola.

1.3 RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL

1.3.1 ASPECTOS GERAIS

O potencial de uso de interações positivas entre microorganismos saprófitas e raízes de plantas nos processos de produção agrícola vem sendo estudado e buscado ao longo do século passado (CHEN *et al.*, 1996). Dentre os microorganismos que colonizam a superfície das raízes e a porção do solo que sofre influência do sistema radicular da planta, destaca-se aqui as chamadas rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (RPCV) ou Rizobactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (RPCP). Um fato importante é que ao longo dos últimos anos, desde que foi realizado o segundo Workshop sobre RPCP, na Suíça, em 1990, o número de publicações e pesquisadores que tratam sobre esse tema

aumentou consideravelmente (MELO, AZEVEDO, 1998). E talvez, pelo que relata Chen *et al.*, (1996), um dos programas mais avançado do mundo visando o aproveitamento desse potencial seja desenvolvido pelos Chineses. No Brasil, merece destaque os trabalhos realizados por Cattelan (199), Mello *et al.* (2002) e Romeiro *et al.* (1999).

As bactérias do solo podem conviver com as plantas hospedeiras de diferentes modos. Tal convivência pode não ter efeito algum sobre a planta, ou seja, o efeito é neutro. De outro modo, o efeito pode ser deletério ou benéfico. No caso de efeito benéfico, as bactérias são ditas promotoras de crescimento vegetal (MELO, 1998). O efeito positivo dessas bactérias pode se manifestar como promoção do crescimento ou por controle biológico de doenças, conforme relatado por diversos autores (CHEN *et al.*, 1996; LUGTENBERG *et al.*, 2001; WELLER, 1988; VAN PEER *et al.*, 1991).

O termo rizobactérias foi cunhado para designar o grupo total de bactérias que colonizam as raízes após serem inoculadas em plantas cultivadas ou que já ocorrem naturalmente no sistema radicular das plantas. Podendo também ser um termo restrito para designar aquelas que causam crescimento e aumento da produção nas plantas (SCHROTH, WEINHOLD, 1986). Bashan e Holguin (1998) propuseram a divisão em duas classificações em função dos efeitos sobre as plantas: Biocontrole e Promoção de crescimento.

São várias as culturas que já foram avaliadas quanto a viabilidade da aplicação das chamadas rizobactérias promotoras de crescimento. A maioria dos trabalhos observados trata sobre plantas de ciclo curto como hortaliças e cereais. Trabalhos já foram desenvolvidos com batata (KLOEPPER *et al.*, 1980), tomate (GAGNE *et al.*, 1993), milho (PANDEY *et al.*, 1998), soja (PAN *et al.*, 2002), e muitas outras. A aplicação no processo de produção de mudas também é tida como de grande potencial econômico. Mello *et al.* (2002) por exemplo testaram vários isolados afim de verificarem os efeitos sobre mudas

micropropagadas de abacaxi. Tal tipo de aplicação pode ser muito útil na preparação de mudas antes de serem levadas ao campo. Enebak *et al.* (1997) estudaram o efeito de várias rizobactérias para verificar o efeito sobre o crescimento de mudas de *Pinus elliottii* (Engelm.) e *P. taeda*. Segundo eles, a inoculação de cada uma das doze (12) rizobactérias teve efeito diferenciado, independente e específico sobre a germinação das sementes e sobre a promoção do crescimento das mudas das duas espécies estudadas. No entanto, esse estudo não foi aprofundado ao ponto de apontar os mecanismos específicos envolvidos, tão pouco identifica os isolados. O aumento da biomassa de mudas de *Pinus contorta*, resultante da aplicação de *Bacillus polymyxa*, relatado por Holl e Chanway (1992) é um outro bom exemplo de estudo e com resultados positivos em espécie florestal. Shishido *et al.* (1996), após terem testado isolados de *Pseudomonas* spp em combinação com micorrizas em um híbrido (*Picea glauca x engelmannii*) e em *Pinus contorta* var. *latifolia* (Engelm.) também obtiveram resultados que apontaram ganhos significativos no crescimento, mas nesse caso, é importante salientar que o ganho em crescimento de *Pinus contorta* foi associado à presença de micorrizas.

Os exemplos de resultados positivos obtidos em condições controladas são inúmeros, mas a falta de um entendimento sobre os mecanismos que controlam o processo de indução de crescimento tem limitado a aplicação comercial desses microrganismos. De modo bem geral, a indução do crescimento pode ser diferenciada nas seguintes formas: pela produção de substâncias com efeito direto sobre a fisiologia das plantas; pelo aumento da disponibilidade de nutrientes, ou; pela eliminação de microrganismos deletérios das raízes que prejudicam o desenvolvimento das plantas.

1.3.2 MECANISMOS DE AÇÃO DAS RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL

Nos últimos anos vem sendo buscadas explicações para o modo pelo qual as chamadas bactérias promotoras de crescimento atuam. Aparentemente não ocorre apenas um mecanismo, mas sim fatores que atuam, isoladamente ou em conjunto favorecendo o desenvolvimento vegetal. Esses fatores podem estar mais diretamente relacionados ao metabolismo vegetal ou com as condições do ambiente, incluindo aspectos de sanidade e disponibilidade de nutrientes. Segundo Weller (1988), mais de um mecanismo pode operar no crescimento da planta e na supressão de efeitos deletérios, contudo, a importância relativa de um mecanismo particular pode variar com as condições físicas e químicas da rizosfera. Para Schippers *et al.* (1987) o efeito no de crescimento de plantas por RPCP pode ser induzido de forma direta, pela produção de hormônios, ou de forma indireta, pela eliminação de microorganismos deletérios da rizosfera. Vale observar que o efeito sobre a microbiota da rizosfera pode ocorrer por diversos modos de interação ecológica. Do que diz Melo (1998), ao abordar os aspectos ecológicos das RPCP, podemos considerar os seguintes mecanismos de ação pelos quais as rizobactérias atuam e têm efeito sobre o desenvolvimento das plantas: Antibiose; Competição pela produção de sideróforos; Produção de reguladores de crescimento de plantas; Aumento na absorção de fósforo, e; Simbiose entre RPCP e bactérias fixadoras de nitrogênio. Segundo o referido autor, a antibiose é um importante mecanismo de ação que provavelmente favorece o crescimento das plantas por supressão de patógenos. É oportuno salientar que a supressão de patógenos da rizosfera, por atuação de outro microrganismo, pode decorrer devido a excreção de substâncias antibióticas, o que caracteriza perfeitamente uma antibiose. Outra maneira seria por uma vantagem competitiva, a qual pode decorrer de uma maior capacidade de

colonizar os sítios de sobrevivência, ou por uma maior capacidade de obter nutrientes, por exemplo.

Dentre as bactérias produtoras de antibióticos, destaca-se aqui o grupo *Pseudomonas putida-fluorescens*. Esse grupo de bactérias também produz sideróforos, um grupo de substâncias com capacidade de complexar o ferro (Fe) em determinadas condições de baixa concentração desse elemento. Essa capacidade em produzir tais substâncias e aproveitar-se do Fe lhes confere uma vantagem competitiva. Tal vantagem é apontada como um fator de promoção de crescimento em plantas, pois isso garante a eliminação de outras bactérias ou mesmo fungos prejudiciais ao desenvolvimento da planta (KLOEPPER *et al.*, 1980; MELO, 1998; SOUZA, 2002).

Sobre o gênero *Pseudomonas* foi feito, por Souza (2002), uma revisão detalhada abordando a distribuição e a diversidade das substâncias antibióticas produzidas. O referido autor descreve a biosíntese, a regulação e a atividade dos seguintes antibióticos: 2,4-Diacetilfloroglucinol (2,4-DAPG), phenazina (PHZ), pyrrolnitrina (PRN), pyoluteorina (PLT) e biosurfactante. Além disso descreve o papel de *Pseudomonas* spp. produtoras de 2,4-diacetilfloroglucinol (2,4-DAPG) na supressividade do mal-do-pé do trigo em amostras de solos Holandeses e do Estado de Washington (Estados Unidos da America).

A promoção do crescimento pela atuação das rizobactérias promotoras do crescimento envolvendo alguma alteração no metabolismo vegetal está relacionada como a produção de fitohormônios ou reguladores do crescimento. Giberelinas, Auxinas e Citocininas são exemplos de substâncias relatadas como envolvidas na indução do crescimento por RPCP (COSTACURTA; VANDERLEYDEN, 1995; FETT *et al.*, 1987; GLICKMAN, *et al.*, 1998; MELO e AZEVEDO, 1998; PATTEN; GLICK, 1996). Melo (1998), com base em vários trabalhos, listou a seguinte série de rizobactérias apontadas

como produtoras de reguladores de crescimento de plantas: 1) Produtoras de giberelinas: *Arthrobacter globiformis*, *Azospirillum brasilense*, *A. lipoferum*, *Azotobacter beijerinckii*, *A. paspali*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium phaseoli*. 2) Produtoras de auxinas: *Azospirillum lipoferum*, *Azotobacter chroococcum*, *A. paspali*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *Rhizobium leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. phaseoli*. 3) Produtoras de citocininas: *Azospirillum brasilense*, *A. lipoferum*, *Azotobacter beijerinckii*, *A. paspali*, *A. venelandii*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *Rhizobium japonicum*, *R. leguminosarum*, *R. phaseoli*. Embora o referido autor tenha citado todos esses exemplos, para ele, a falta de evidências sobre os efeitos indutores por tais substâncias devido a produção exógena às raízes levava a crer que o estímulo ao crescimento fosse devido a outros mecanismos. No entanto, Beyler *et al.* (1999) mostraram que a produção de ácido indol acético por *Pseudomonas fluorescens*, modificada geneticamente para produzir maior quantidade dessa auxina do que sua linhagem parental, estimulou o crescimento das raízes de *Cucumis sativus* cv. Chinesisch Sclange, mas não suprimiu a ação patogênica de *Pythium*. É interessante notar que no solo autoclavado, usado no experimento dos referidos autores, houve efeito negativo da linhagem transformada sobre o desenvolvimento da planta, o qual foi atribuído ao excesso de AIA no tratamento com a bactéria transformada e ao fato de que a linhagem não transformada tenha tido a capacidade de neutralizar substâncias tóxicas que surgem com a autoclavagem do solo, enquanto a transformada tenha perdido tal capacidade. Wang *et al.* (2000) também obtiveram alongamento de raízes como resultado de vários experimentos usando linhagens originais e transformadas de *P. fluorescens*. Um dos experimentos consistiu na inserção do gene codificador da enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) deaminase, uma enzima presente em algumas bactérias que degradam o ACC em amônia e α -cetobutirato. Em plantas, o AAC é o precursor intermediário da síntese do etileno (GLICK

et al., 1998). No experimento relatado, o uso do ACC como fonte de nitrogênio pela bactéria transformada deve ter suprimido o efeito do etileno nas plantas colonizadas. Não ficou claro se o efeito de alongamento foi devido a isso ou devido a ação de outras compostos produzidos por essa bactéria, como por exemplo, AIA. Em outro experimento usando as bactérias transformadas foi observado a supressão de tombamento causado por *Pythium* em plantas do mesmo cultivar de *Cucumis sativus* usado no trabalho anteriormente citado, nesse caso, o efeito, segundo os autores, ocorreu por diminuição do efeito do etileno, o qual está relacionado com a reação da planta a uma condição de estresse. A diminuição do efeito do etileno teria ocorrido pela sua conversão em amônia, a qual serviu como fonte de nitrogênio para bactéria transformada.

É importante ressaltar que os efeitos das RPCP sobre as plantas está condicionado pelas espécies envolvidas e com as condições físicas e químicas da rizosfera (BEYLER *et al.*, 1999; KUREK; JAROSUK-SCISEF, 2002; WANG *et al.*, 2000), portanto, deve ser observado que as respostas das plantas aos efeitos de promoção de crescimento devido a atividade da RPCP estão condicionados também pelo fator solo. Em exemplo de trabalho que avalia essa interação foi feito por Kurek e Jaroszuk-Scisef (2002).

De um modo bastante simplificado, os mecanismos de promoção do crescimento mais citados podem ser divididos em três grupos. Os de promoção direta de crescimento, por alteração fisiológica da planta devido a produção de substâncias que atuam como hormônios de plantas. Os de promoção indireta, que pode ser devida ao controle de doenças, pela indução de resistência, ou pela ação antagonica contra patógenos. A ação contra patógenos está relacionada com a produção de antibióticos, ou com a produção de sideróforos. Por fim, se inclui como o terceiro mecanismo de promoção a disponibilização de nutrientes e a detoxificação do solo. A disponibilização de fosfato por ação de

fosfatases ou ácidos orgânicos é apontada como um exemplo desse mecanismo de promoção de crescimento.

Segundo Rodríguez e Fraga (1999), já foram identificados diversos isolados com a capacidade de produzir fosfatases, merecendo destaque os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Rhizobium*. Os autores salientam que alguns genes codificando fosfatases já foram clonados, mas pouco se tem trabalhado sobre a solubilização do fosfato mineral.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos para obtenção dos isolados de bactérias e a seleção das promotoras de crescimento de mudas de cacauzeiro foram executados duas vezes. Na primeira, com o apoio do Centro de Pesquisa Almirante Cacau (CPAC) em Itajuípe, interior do Estado da Bahia, no período de abril a outubro de 2003. Na segunda vez, foram executados com apoio de vários laboratórios da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), no período de novembro de 2003 a abril de 2004. Na tabela 2.1 estão relacionados os locais de coleta e algumas características das amostras de solos usadas nos dois conjuntos de ensaios de isolamento.

Município Solo	Sítios das coletas	Datas *1	Datas *2	Planta	Coordenadas Geográficas	Designação da mostra *3
Manaus LA3 ^{*5}	Est. Exp. CEPLAC*4	27/03/03	18/11/03	Cacau	2° 05' 32''S 60° 10' 40''W	MAN
Presidente Figueiredo +PV ^{*5}	Comunidade Rio Pardo	28/03/03	25/11/03	Cupuaçu	0° 44' 35''S 60° 14' 46''W	PF1
	Comunidade Terra- preta	28/03/03	25/11/03	Cupuaçu	0° 46' 32''S 60° 17' 42''W	PF2
Itacoatiara GX22 ^{*5}	Sítio São Luiz – Ilha do Risco	24/03/03	20/11/03	Cacau	(-)	IT1
	Propriedade do Sr. Zacarias - Igarapé do Carão	24/03/03	20/11/03	Cacau	(-)	IT2

Tabela 2.1. Características dos sítios de coleta e designação das amostras, coletadas no Estado do Amazonas e usadas nos ensaios para isolamento de rizobactérias

OBS. *1: Datas das coletas para o primeiro conjunto de ensaios de isolamento; *2: Datas das coletas para o ensaio de isolamento executado em Manaus; *3: Abreviatura para referenciar o local de coleta; *4: Estação experimental da CEPLAC localizada no km 45 da BR174; *5: Designação dos tipos de solos dos locais de coletas, segundo o mapa de solos do Brasil (IBGE CNPS/Embrapa, 2001), LA3: Latossolo Amarelo distrófico; +PV4: Argissolo vermelho amarelo distrófico textura média; GX22 Gleysolo háplico eutrófico com alta atividade de argila (Ta); (-): ausência de dados.

As duas amostragens dos solos foram repetidas praticamente nos mesmos sítios e foram executados os mesmos procedimentos básicos em ambas vezes em que se teve de repeti-las.

Nas três variações de ensaios de isolamento realizados em Itajuípe foram usadas mudas de cacau TSH1188 como plantas iscas, no entanto, o processo de isolamento propriamente dito foi executado apenas nas plantas iscas dos dois primeiros. No primeiro ensaio, aqui designado de E1/2003, as mudas foram cultivadas em condição semicontrolada de casa-de-vegetação em diferentes substratos formados pela mistura das amostras de solo (tabela 2.1) com cem por cento (100% volume/volume) de areia lavada autoclavada. Nos dois outros ensaios, as plantas foram cultivadas em condições de bancada de laboratório em tubos de ensaio contendo casca de arroz carbonizada lavada autoclavada. No primeiro ensaio de bancada, aqui designado de E2/2003, foram usados como fontes de inóculo, macerados das raízes catadas das diferentes amostras de solo (Tabela 2.1). No terceiro experimento dessa etapa, aqui designado de E3/2003, o inóculo usado foi constituído por uma porção de aproximadamente dez gramas (10g) da mesma mistura usada como substrato no ensaio E1/2003. Em todos os ensaios para isolamento, as fontes de inóculo foram adotadas como tratamentos, e como controles foram usadas plantas cultivadas em condições semelhantes, mas sem uma fonte de inóculo. Adotou-se, no ensaio E1/2003, um tratamento com o substrato normalmente usado no processo de produção de mudas com a intenção de se ter uma amostra da população microbiana do ambiente onde o experimento foi executado, o que poderia servir para um posterior estudo sobre diversidade. A esse tratamento representado pelo solo local foi dada a designação controle.

Visando restringir o número de isolados a serem testados com plantas, foi feita uma pré-seleção entre todos os obtidos nos ensaios de isolamento, tanto em Itajuípe, quanto em Manaus. Para os isolados obtidos com os ensaios em Itajuípe usou-se como critério de

seleção a capacidade de degradar quitina e/ou excretar Ácido Indolacético (AIA). Os isolados obtidos em Manaus foram selecionados quanto a capacidade de solubilizar fosfato e/ou excretar AIA.

Ainda na fase executada em Itajuípe, foi possível realizar ensaios para avaliação dos efeitos de onze (11) isolados sobre o desenvolvimento de mudas de cacau. Dos isolados testados, oito (08) foram obtidos a partir das plantas que apresentaram melhor desempenho vegetativo no ensaio E1/2003 e os outros três (03) já faziam parte da coleção do CPAC. Também foi possível realizar avaliações com plantas de cinco (5) isolados identificados como produtores de AIA e mais cinco (5) identificados como produtores de quitinases.

Em Manaus, foi feita basicamente uma repetição do ensaio E1/2003. Essa repetição se fez necessária pelos seguintes motivos: primeiro, recompor a coleção de isolados, uma vez que os isolados obtidos na primeira fase ficaram no laboratório de Biocontrole do CPAC; segundo, para se confirmar um possível efeito relacionado com a autoclavagem do solo sobre o desenvolvimento das mudas. Nesse experimento de isolamento, aqui designado E1/2004, foram usadas mudas de cacau variedade scavina. Os isolados obtidos nessa etapa foram preservados e depois testados quanto a capacidade de solubilizar fosfato e produção de AIA. Os que apresentaram resultado positivo foram separados para futuros ensaios de caracterização e verificação dos efeitos sobre plantas.

Para uma melhor exposição dos procedimentos experimentais o texto foi dividido em três (03) partes. A primeira trata dos ensaios para isolamento de rizobactérias usando mudas de cacau como plantas armadilhas. Na segunda parte estão descritos os procedimentos dos ensaios para pré-seleção dos isolados de rizobactérias com base nos ensaios de bancada de laboratório. A terceira parte trata sobre os testes dos isolados com plantas.

PARTE 1: ENSAIOS PARA ISOLAMENTO DE RIZOBACTÉRIAS

2.1 COLETA DAS AMOSTRAS DE SOLO

As amostragens de solos ocorreram em três (3) diferentes ecossistemas. Foram coletadas quatro (4) amostras diametralmente opostas e eqüidistantes, no limite externo da área de projeção da copa de cada árvore de cupuaçueiro ou cacaueiro. As árvores foram escolhidas ao acaso nas plantações das diversas áreas relacionadas na tabela 2.1. De cada um dos quatro pontos foi retirada uma amostra simples da camada de 0 – 20 cm com o auxílio de uma enxada ou de um trado. As quatro (04) amostras simples foram misturadas para constituírem a amostra representativa de cada sítio. Esse procedimento foi seguido em todos cinco (05) sítios ou áreas amostradas. As áreas foram escolhidas levando-se em conta suas diferenças ambientais, acessibilidade e histórico de cultivo. A seguir estão descritas algumas características de cada área e os procedimentos realizados.

2.1.1 ÁREA DE VÁRZEA, ZONA RURAL DO MUNICÍPIO DE ITACOATIARA-AM

Primeiro sítio – IT1: Propriedade do senhor JOÃO BATISTA GRANA, denominada sítio São Luiz, no igarapé do Carão, tributário direito do rio Amazonas. Desse sítio foram coletadas amostras de duas árvores de uma plantação de cacau nativo (rústico) com aproximadamente vinte (20) anos de cultivo. A primeira árvore se encontrava na parte mais interna da propriedade, próxima à vegetação nativa, a uma distância aproximada de oitenta metros (80m) da margem do igarapé seguindo-se na direção nordeste a partir dos fundos da casa do proprietário; a segunda estava a aproximadamente dez metros (10m) da margem e a trinta metros (30m) do lado esquerdo casa já referenciada.

Segundo sítio – IT2: Propriedade do senhor ZACARIAS DE ARAÚJO ROLIM, localizada na ilha do risco, no rio Amazonas. Nesse sítio, foi feita a amostragem de solo na base de uma única planta selecionada ao acaso entre as que se encontravam aproximadamente a vinte metros (20m) da margem do rio Amazonase a trinta metros (30m) do lado esquerdo da casa do proprietário.

Ao final das coletas, cada um dos dois sítos foi representado por uma única amostra obtida da mistura das amostras simples retiradas conforme o procedimento anteriormente descrito, sendo que a do primeiro sítio resultou de oito (08) subamostras e a do segundo de quatro (04). Segundo o mapa de solos do Brasil (IBGE CNPS/Embrapa, 2001) o solo de várzea da região amostrada é classificado como Gleyssolo háplico eutrófico com alta atividade de argila (GX22 -Ta).

2.1.2 ÁREA DE TERRA-FIRME, ZONA RURAL DO MUNICÍPIO DE MANAUS-AM, ESTAÇÃO EXPERIMENTAL DA CEPLAC – MAN

Na estação experimental da CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira), no km 48 de BR174, zona rural do município de Manaus, escolheu-se inicialmente, ao acaso, duas (02) árvores de cacaueiro em uma plantação de aproximadamente quinze (15) anos de cultivo para primeira amostragem. Outra amostragem foi feita a partir de uma árvore de aproximadamente três (03) anos de plantada localizada em uma área onde já tinha sido cultivado cacau por aproximadamente dez (10) anos, mas que tinha permanecido abandonada por aproximadamente dois (02) anos depois das plantas terem sido atacadas pela doença “vassoura-de-bruxa” (*Crinipellis perniciosa* (Stahel) Singer). Segundo o gerente da estação, o solo local foi classificado como Latossolo Amarelo distrófico variação Suframa (LA3). No final da coleta, a amostra representativa desse sítio foi obtida da mistura doze (12) subamostras.

2.1.3 ÁREA DE TERRA-FIRME, ZONA RURAL DO MUNICÍPIO DE PRESIDENTE FIGUEIREDO-AM.

Primeiro sítio – PF1: Localizado na comunidade do rio Pardo. Ali, a amostragem foi feita seguindo-se o procedimento adotado como padrão. Foi escolhida uma árvore de cupuaçueiro de aproximadamente cinco (05) anos de plantada. Lá, o solo é denominado pelos moradores como terra preta morena. Essa área foi desmatada a quase dez (10) anos, ainda restando algumas árvores nativas entre a cultura de cupuaçueiro, que no momento dividia espaço com plantas de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) e abóbora (*Cucurbita* sp).

Segundo sítio – PF2: Propriedade do senhor PARANÁ da comunidade terra-preta. O solo não possui classificação oficial definida e foi considerado como terra preta de origem indefinida. Seguindo-se o procedimento padronizado, foi coletada uma amostra a partir de uma árvore de cupuaçueiro com aproximadamente quatro (04) anos de plantada. Essa área também deveria ter, na época, aproximadamente, de oito a dez (8 – 10) anos de desmatada para implantação do cultivo de cupuaçu e mandioca (*Manihot esculenta*, L.) entre as linhas.

De acordo com o mapa de solos do Brasil (IBGE CNPS/Embrapa, 2001), na região de Presidente Figueiredo predomina o solo do tipo argissolo vermelho amarelo distrófico textura média (PVA). Ao final da amostragem, foi feita a mistura das amostras de um mesmo sítio para compor a amostra composta representante de cada sítio.

Conforme já foi dito anteriormente, procurou-se seguir os mesmos procedimentos de amostragem de solo na execução dos dois conjuntos de ensaios de isolamento. Como diferença deve ser observado o tempo decorrido entre as coletas das amostras de solo até a montagem dos experimentos de isolamento propriamente ditos. No primeiro conjunto, foram decorridos doze (12), nove (09) e oito (08) dias desde as coletas em Itacoatiara,

Manaus e Presidente Figueiredo, respectivamente, até a implantação do experimento em Itajuípe, interior da Bahia. Por ocasião da realização do ensaio em Manaus, ou seja, na segunda tentativa de isolamento, decorreram dez (10), doze (12) e cinco (05) dias desde as coletas em Itacoatiara, Manaus e Presidente Figueiredo, respectivamente, até o plantio.

Por ocasião das amostragens, as amostras sempre foram acondicionadas em sacos de plástico, identificadas e transportadas em caixa de isopor.

Na primeira vez de execução das amostragens, o laboratório de patologia da madeira do INPA em Manaus serviu como local de armazenamento. Ali, as amostras permaneceram, por três (03) dias após a última coleta, armazenadas em geladeira, a oito graus Celsius com variação de mais ou menos dois ($8^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), até serem transportadas novamente em caixa de isopor para o laboratório de Biocontrole do CPAC, em Itajuípe-BA. Esse trajeto foi feito por via terrestre e aérea, com duração total aproximada de dezenove horas (19:00h) até o destino final. Com a chegada, as amostras foram acondicionadas novamente em geladeira até serem processadas e usadas na montagem dos experimentos descritos mais adiante. Segundo Parkinson *et al.* (1971) *apud* Pereira *et al.* (1996) o prolongamento do tempo entre a coleta e a avaliação microbiológica pode ser feito através de refrigeração das amostras, argumentando-se que a multiplicação das células microbianas poderá ser inibida em temperaturas baixas.

Por ocasião do conjunto de amostragens feitas para o experimento de isolamento realizado em Manaus, as amostras foram acondicionadas da mesma forma, no mesmo local e nas mesmas condições que da vez anterior, diferindo na ausência da fase de transporte de longa distância após o fim das coletas e nos tempos que permaneceram armazenadas, conforme já foi mencionado anteriormente.

2.2 ENSAIO E1/2003: ISOLAMENTO DE RIZOBACTÉRIAS USANDO-SE MUDAS DE CACAUEIRO EM CASA-DE-VEGETAÇÃO COMO PLANTAS ISCAS, REALIZADO NO CPAC – Itajuípe

2.2.1 PREPARAÇÃO DOS SUBSTRATOS

As amostras de solo coletadas em Manaus-AM (MAN), Presidente Figueiredo-AM (PF1 e PF2) e Itacoatiara-AM (IT1 e IT2) foram passadas em peneira de dois milímetros (2mm) separando-se as raízes. Em seguida, cada uma delas foi misturada com igual volume de areia lavada autoclavada (duas vezes a 120°C, 1atm por 1:00h com intervalos de aproximadamente 24:00h). Devido a pequena quantidade de amostra de solo coletada no segundo sítio de Itacoatiara (IT2) foi necessário misturar as amostras de solo dos dois sítios (IT1 e IT2), e então essa amostra passou a ser designada apenas como ITA.

Das amostras de solo de cada sítio foram formadas nove (09) porções de quinhentos mililitros (500mL), sendo que quatro (04) foram autoclavadas a 120°C, 1 atm, por 40min e passaram ter a letra “a” de autoclavada no final da designação. As outras cinco (05) foram preservadas em geladeira até o dia seguinte. No dia seguinte, todas as porções foram colocadas em sacos de polietileno de dois litros (2,0L) dobrados até a metade de sua altura. Para compor o tratamento controle foram preparadas cinco (05) porções de quinhentos mililitros (500mL) do terriço usado normalmente na produção de mudas, sem mistura com areia e nem autoclavagem.

2.2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E TRATAMENTOS

O ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) tendo os diferentes substratos como tratamento: Solos autoclavados e não autoclavados, mais uma parcela padrão para comparação (terriço normalmente usado na produção de mudas), aqui

designada como controle. Foram adotadas cinco (05) repetições para os tratamentos com substratos não autoclavados e quatro (4) para os autoclavados. As plantas cultivadas no terriço foram incluídas com a intenção de se obter isolados locais que poderiam servir para uma eventual comparação da diversidade genética, além disso, serviriam como referência para comparação do crescimento das mudas em condições normais de cultivo.

Na tabela 2.2 estão sumariamente descritos os tratamentos e as respectivas repetições adotadas no ensaio E1/2003.

Tratamentos	Descrição	Repetições
Cont.	Terriço normalmente usado na produção de mudas	5
01: MAN	Mistura com solo da Estação experimental da CEPLAC em Manaus-AM.	5
02: PF1	Mistura com solo da comunidade Rio Pardo em Presidente Figueiredo-AM.	5
03: PF2	Mistura com solo da comunidade Terra Preta em Presidente Figueiredo-AM.	5
04: ITA	Mistura com solo coletado nos dois Sítios em Itacoatiara-AM.	5
05: MANa	Mesma mistura usada no tratamento 1, autoclavada	4
06: PF1a	Mesma mistura usada no tratamento 2, autoclavada	4
07: PF2a	Mesma mistura usada no tratamento 3, autoclavada	4
08: ITAa	Mesma mistura usada no tratamento 4, autoclavada	4
TOTAL DE UNIDADES		41

Tabela 2.2. Descrição e número de repetições dos tratamentos testados no ensaio E1/2003.

Obs. Cont.: Controle. Para saber detalhes sobre a designação de cada tratamento ver o item 2.2.1.

2.2.3 UNIDADE EXPERIMENTAL (UE) E ANÁLISE ESTATÍSTICA

As unidades experimentais (UE's) consistiram de uma planta de cacaueteiro cultivada em saco de polietileno contendo quinhentos mililitros (500mL) de um dos substratos já descritos no item 2.2.1. Os dados obtidos foram tabulados em planilhas do EXCEL© e analisados por meio do programa de análise estatística SAEG©. Após a análise de

variância (ANOVA), as médias foram comparadas pelo teste DMS a 5% de probabilidade. Os resultados das ANOVA's estão apresentados no anexo um (01).

2.2.4 PREPARAÇÃO DAS SEMENTES E PLANTIO

Sementes frescas de cacau TSH 1188 foram lavadas em água corrente e areia para retirada da mucilagem. Em seguida, enxugadas e pesadas. As que apresentaram peso entre dois vírgula dois e dois vírgula nove gramas (2,2 – 2,9g) foram descascadas e sanitizadas pela imersão em solução de hipoclorito comercial (2,5% peso/volume) por dez minutos (10min), seguida por três (3) lavagens em água destilada autoclavada. Todo procedimento de sanitização foi realizado em câmara de fluxo laminar. Depois disso, as sementes foram colocadas para germinarem em estufa sem iluminação a 28°C, permanecendo assim por aproximadamente quarenta horas (40:00h). Foram distribuídas aproximadamente trinta (30) sementes por conjuntos de placas de Petri forradas com papel de filtro e algodão umedecido, tudo esterilizado por duas autoclavagens a 120°C, 1atm por uma hora (1:00h) com intervalos de aproximadamente vinte e quatro horas (24:00h). Após a germinação, transplantou-se uma semente pré-germinada em cada saco contendo o substrato correspondente a um dos tratamentos (tabela 2.2).

2.2.5 CONDIÇÃO DE CULTIVO, MANEJO, AVALIAÇÕES E COLHEITA

As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação sem controle de temperatura, luminosidade, ou umidade do ar, por um período de cento e dezessete (117) dias. Durante o cultivo foram feitas regas diárias com água destilada autoclavada para manter-se o solo sempre levemente úmido. Para identificar os efeitos sobre o desenvolvimento vegetal, foram feitas avaliações das seguintes variáveis: número de plantas emergidas, durante a

primeira semana após o plantio; altura da planta entre o colo e o ápice (ALT1); número de folhas por planta (NFPP), largura e comprimento de cada folha, e; área foliar média por planta (AFMPP). A AFMPP foi obtida pela média da área foliar de todas as folhas contadas em cada planta, enquanto os valores de área foliar foram estimados aplicando-se os mesmos cálculos (Log_{10} da área foliar = $-0,138293 + (1,015070 \times \text{Log}_{10}$ do comprimento + $0,964304 \times \text{Log}_{10}$ da largura)) usados por Machado *et al.* (1989). Deve ser observado que para esse cálculo, e para todas as avaliações foliares, só foram consideradas as folhas com comprimentos maiores que dois centímetros (2,0cm). Aos trinta dias após o transplântio (30 DAT), os cotilédones de todas as plantas cultivadas em solos não autoclavados foram cortados. Devido ao pequeno desenvolvimento, as quatro (04) repetições dos tratamentos MANa e PF1a tiveram os cotilédones cortados somente 55 dias depois do plantio. Durante o cultivo, o combate de pragas foi feito manualmente, e em momento algum foi aplicado qualquer produto químico em qualquer uma das plantas. A limpeza das ervas invasoras também foi feita manualmente sempre que necessário. As avaliações deixaram de ser feitas semanalmente a partir da coleta de raízes para o isolamento. Aos 117 DAT, as plantas foram avaliadas pela última vez e colhidas, só então, foi possível, também se determinar massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca do sistema radicular (MSSR).

2.2.6 ISOLAMENTO

Amostras do substrato contendo fragmentos de raízes das plantas dos tratamentos MAN, PF1, PF2, ITA, ITAa e cont. (Tabela 2.2) foram retiradas aos 33 DAT. Na coleta foi usado um furador de rolha com um centímetro e meio (1,5cm) de diâmetro para perfurar o substrato, distanciando dois centímetros (2,0cm) do caule de cada planta, desde a superfície até aproximadamente nove centímetros (9,0cm) de profundidade. Não foram retiradas

amostras dos tratamentos MANa, PF1a e PF2a uma vez que as plantas apresentavam baixo desenvolvimento. De cada porção coletada foram retirados os fragmentos de raízes, que em seguida foram lavados em água destilada e autoclavada (H₂Oda). Com as amostras de raízes recolhidas de cada repetição formou-se uma amostra composta para cada um dos tratamentos. Cada amostra composta foi então colocada em um tubo contendo nove mililitros (9,0mL) de solução salina (NaCl a 0,85% p/v) esterilizada. O solo de onde foram retiradas as raízes foi colocado de volta a sua origem. Estima-se que tenha sido recuperado aproximadamente de um a um grama e meio (1 – 1,5g) de raízes por amostra composta. Os tubos foram fechados e depois levados para câmara de fluxo laminar. Com o auxílio de um bastão de vidro, os fragmentos de raízes foram esmagados por pressão contra a parede dos tubos. De cada amostra macerada foram feitas cinco diluições sucessivas, transferindo-se sucessivamente cem microlitros (100µL) para tubos contendo novecentos microlitros (900µL) de solução salina (NaCl a 0,85% p/v). Por limitação de tempo, só foi possível se fazer no mesmo dia da coleta, o plaqueamento em meio Thornton, um dos oito (08) meios usados (Tabela 2.3). Os tubos com as amostras originais (macerado de raízes) foram então fechados e guardados em geladeira a 4°C ± 2°C. No dia seguinte, após agitar os tubos, repetiu-se o procedimento de diluições sucessivas e fez-se o plaqueamento adicionando-se cem microlitros (100µL) de uma das diluições em cada uma das placas de Petri com um dos meios de cultura relacionados na tabela 2.3, onde constam também as diluições e o número de placas usadas para o isolamento das rizobactérias nesse ensaio.

Usou-se a diluição 10⁻⁵ para o meio Thornton tomando-se por base as diluições citadas por Chen *et al.* (1996) e nas observações feitas por Pereira *et al.* (1996). Para o meio extrato de solo (ES) usou-se a segunda diluição, por esse ser um meio muito pobre. E para os demais meios usou-se uma diluição 10⁻⁴ e não a 10⁻⁵ devido ao fato das amostras terem permanecido na geladeira, o que poderia ter causado uma redução da população

microbiana. Ao meio BDA foi adicionado 100mg/L de cicloheximida, por isso passou ser designado como BDA+. No isolamento usando-se o meio Agar Nutritivo com tratamento térmico (AN+tt) foram usadas placas contendo meio AN acrescido de antibiótico contra fungos (100mg.L⁻¹ de cicloheximida), inoculadas com amostras de suspensões que sofreram tratamento térmico. Cada suspensão tratada termicamente foi preparada com oito mililitros (8,0mL) do meio nutritivo no estado líquido, acrescidos de uma alíquota de dois mililitros (2,0mL) da suspensão original de um dos tratamentos. O tratamento térmico consistiu na permanência das novas suspensões em banho-Maria a uma temperatura de cinquenta graus Celsius (50°C), durante uma noite (aproximadamente dez horas).

Meio de cultura	Referência	Diluição *1	No. de placas *2
BDA+	Beever & Bollard (1970)	10 ⁻⁴	5x2+1=11
Thornton	Thornton (1922) apud Pereira <i>et al.</i> (1996)	10 ⁻⁵	5x1+1=06
TSA	Hawkey <i>et al.</i> (1986)	10 ⁻⁴	5x2+1=11
K 523	Kado & Heskett (1970)	10 ⁻⁴	5x2+1=11
King	Araújo <i>et al.</i> (2002)	10 ⁻⁴	5x1+1=06
AN	Sagardoy & Salerno (1983)	10 ⁻⁴	5x2+1=11
AN+tt		10 ⁻⁴	5x1+0=5
ES		10 ⁻²	5x1+0=5

Tabela 2.3. Relação dos meios usados no ensaio de isolamento de rizobactérias com respectiva diluição das suspensões usadas como fonte de inóculo

Obs: BDA+: Batata dextrose e agar mais cicloheximida; TSA: Triptona de soja e ágar; AN: Agar nutritivo; AN+tt : Agar nutritivo com tratamento térmico mais cicloheximida; ES: extrato de solo *1: Diluição em relação a suspensão inicial; *2: total de placas inoculadas do respectivo meio, sendo cinco tratamentos vezes a quantidade de placa repetidas mais o número de placa do mesmo meio inoculada com suspensão obtida a partir do Controle (Cont.) Para saber detalhes do procedimento sobre o isolamento vide item 2.1.2.6.

Após terem sido inoculadas, todas as placas foram deixadas em bancada na condição de temperatura ambiente variando entre vinte e seis a vinte e nove graus Celsius (26 –29°C). E, conforme ocorria o surgimento das colônias, permitindo uma comparação entre elas, foram feitos os isolamentos, considerando-se a diferença no aspecto visual de cada uma. Vale salientar que os aspectos das colônias foram avaliados para cada meio de cultura e substrato de origem, ou seja, não se exclui uma colônia crescida em um mesmo

meio por ser aparentemente semelhante à outra originária de um substrato diferente. Os isolados obtidos foram colocados em grupos de oito (8) por placas com meio TSA, AN ou K523. Cada placa de TSA, AN ou K523 com oito isolados foi identificada com número de ordem de isolamento. Devido à limitação de material por ocasião da escolha dos isolados optou-se por descartar todas as colônias crescidas em placas com meio ES. Em uma planilha foram registrados origem e número de ordem de cada isolado. Todos os isolados foram então transferidos para tubos de vidro de cinco mililitros (5mL) contendo metade do volume de meio TSA e a outra metade de água. Esses tubos foram deixados em geladeira a aproximadamente oito graus Celsius (8°C). Ainda na fase de formação da coleção e para facilitar o acesso aos isolados foram formados grupos de vinte a vinte e cinco (20 – 25) isolados em placas de Petri com meio TSA, AN ou K523 mantidas em geladeira a aproximadamente dez graus Celsius (10°C). Com esses exemplares foram feitos os testes de bancada para pré-seleção. É importante salientar que os isolados crescidos em meio de King foram posteriormente transferidos também para meio TSA, e conseqüentemente, foram usados nos outros ensaios somente aqueles que sobreviveram. A composição do meio de King adotada foi a descrita por Araújo *et al.* (2002): Peptona – 20g.L⁻¹; Glicerina – 10g.L⁻¹; K₂HPO₄ – 1,5g.L⁻¹; MgSO₄.7H₂O – 1,5g.L⁻¹.

2.3 ENSAIO E2/2003: ISOLAMENTO DE ENDOFÍTICOS USANDO MUDAS DE CACAUEIRO EM CONDIÇÕES DE BANCADA DE LABORATÓRIO

2.3.1 PREPARAÇÃO DO SUBSTRATO E FONTE DE INÓCULO

Como substrato, usou-se casca de arroz carbonizada passada em peneira de quatro milímetros (4mm) e retida na de dois milímetros (2mm). Essa fração foi lavada em água corrente de torneira e distribuída em tubos de ensaio de cem mililitros (100mL), aos quais

foram adicionados cinqüenta microlitros (50mL), Depois de fechados com tampa de aço, o conjunto de tubos foi autoclavados 2x (120°C, 1atm por 1:00h) com intervalo de vinte quatro horas (24:00h).

Como fonte de inóculo, usou-se uma porção de aproximadamente dez gramas (10,0g) do macerado das raízes obtidas por peneiramento das amostras de solos listados na tabela 2.1. Na preparação do macerado foram usadas, aproximadamente, cinco gramas (5,0g) de raízes em sessenta gramas (60,0g) de areia lavada autoclavada (duas vezes a 120°C, 1atm por 1:00h com intervalos de aproximadamente 24:00h). Antes de serem maceradas, as raízes foram sanitizadas seguindo-se o procedimento descrito por Araújo *et al.* (2002) com algumas modificações. Inicialmente as raízes foram lavadas em água corrente, depois imersas por um minuto (1min) em cada uma das seguintes soluções: álcool (70% v/v), solução de hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) e novamente álcool 70%. Na passagem de uma solução para outra, as raízes foram mergulhadas por cinco segundos em água destilada autoclavada (H₂Oda). No final do processo de sanitização, as raízes foram lavadas três (3) vezes em H₂Oda. Todo procedimento foi realizado em cabine de isolamento com fluxo laminar.

2.3.2 MATERIAL VEGETAL E UNIDADE EXPERIMENTAL

O material vegetal usado foi o mesmo do ensaio anterior (E1/2003). Cada UE consistiu de uma muda de cacauero TSH 1188 cultivadas em tubos de ensaio de cem mililitros (100mL) contendo sessenta mililitros (60mL) do substrato já descrito no item 2.3.1. As mudas foram obtidas a partir de sementes tratadas como já descrito no item 2.2.4.

2.3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E TRATAMENTOS

Na tabela 2.4 estão apresentados os números de repetições e sumariamente descritos os tratamentos adotados no ensaio E2/2003 para isolamento de bactérias.

Tratamentos	Descrição	Repetições
1: Controle	Solução nutritiva sem inoculação.	5
2: MAN	Inoculadas com macerado de raízes das plantas coletadas em Manaus	5
3: PF1	Inoculadas com macerado de raízes das plantas coletadas na comunidade do Rio Pardo em Presidente Figueiredo-AM.	5
4: PF2	Inoculadas com macerado de raízes das plantas coletadas na comunidade Terra Preta em Presidente Figueiredo-AM.	5
5: IT1	Inoculadas com macerado de raízes das plantas coletadas no Sítio São Luiz - Itacoatiara-AM.	5
6: IT2	Inoculadas com macerado de raízes das plantas coletadas na propriedade Sítio São Luiz - Itacoatiara-AM.	5

Tabela 2.4. Relação e descrição sumária dos tratamentos testados no ensaio E2/2003

O ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco (5) repetições. Os tratamentos consistiram dos diferentes inóculos (macerados de raízes) obtidos a partir das amostras de solos descritos na tabela 2.1. Como controle foram usadas cinco (5) plantas cultivadas nas mesmas condições de cultivo que as demais, porém sem inóculo. Vale observar que nesse ensaio se manteve a individualidade das amostras coletadas nos dois sítios de Itacoatiara.

2.3.4 CONDIÇÃO DE CULTIVO E AVALIAÇÕES

As mudas foram cultivadas em bancada, sem controle de temperatura ou umidade do ar, sob iluminação de luz fluorescente (aproximadamente 12:00h/dia) mais a iluminação natural. Para suprir a necessidade de água e de nutrientes foram feitas aplicações de água (H₂Oda) e solução nutritiva feita a partir da formulação apresentada na tabela 2.5.

Fórmula	Nome do composto	Quantidade
SOLUÇÃO A		
KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potássio	20,40 g.L-1
KNO ₃	Nitrato de potássio	36,50 g.L-1
EDTA	Ácido etileno diamino tetra acético – dissódico	1,26 g.L-1
FeSO ₄	Sulfato ferroso	0,57 g.L-1
MgSO ₄	Sulfato de magnésio	21,10 g.L-1
SOLUÇÃO B		
Ca(NO ₃) ₂	Nitrato de cálcio	128,00 g.L-1
CoCl ₂	Cloreto de cobalto	2,6 mg.L-1
H ₃ BO ₃	Ácido bórico	604,0 mg.L-1
CuSO ₄	Sulfato de cobre	252,7 mg.L-1
MnSO ₄	Sulfato de manganês	324,2 mg.L-1
KCl	Cloreto de Potássio	284,2 mg.L-1
ZnSO ₄	Sulfato de zinco	783,2 mg.L-1
NiCl ₂	Cloreto de níquel	2,1 mg.L-1

Tabela 2.5. Composição da solução usada para suprir em nutrientes as plantas no ensaio E2/2003

Obs. As duas soluções-estoque foram preparadas com antecedência e guardadas em geladeira.

As aplicações de solução nutritiva foram feitas quinzenalmente a partir da quinta semana após plantio, quando as plantas tiveram os cotilédones extirpados. Aplicou-se a cada quinze (15) dias dez mililitros (10mL) de uma solução preparada a partir de duas soluções estoque concentradas cem vezes (100x). Cada litro da solução usada foi preparada completando-se o volume final pela adição de 10mL de cada solução-estoque A e B (Tabela 2.5). Para acompanhar o desenvolvimento das plantas foram feitas apenas medidas quinzenais das alturas de três plantas de cada tratamento, escolhidas ao acaso.

2.3.5 ISOLAMENTO

Foram feitas duas tentativas de isolamento. Na primeira, feita com trinta e três dias após a inoculação (33 DAI) foi usada uma planta de cada tratamento. Na segunda, realizada com 48 DAI foi usada outra planta, enquanto que as três restantes foram colhidas

posteriormente apenas para fins de avaliação do desenvolvimento. No primeiro processo de isolamento foram retiradas duas porções de raízes, uma da parte superior, mais próxima do colo da planta, e outra da porção terminal do sistema radicular. Cada porção totalizou aproximadamente cinco gramas (5g) por cada planta representante de cada tratamento. As porções de raízes foram tratadas como foi feito por ocasião da instalação do ensaio, na preparação dos inóculos. Após prévia sanitização superficial, cada porção de raízes foi macerada e usada na preparação de cinquenta mililitros (50mL) de uma suspensão adicionando-se quarenta e cinco mililitros (45mL) de solução salina 0,85% p/v autoclavada. Da suspensão inicial foram feitas diluições sucessivas até 10^{-5} , da qual foram retirados cem microlitros (100 μ L) para inoculação de uma placa contendo meio K523 ou AN. Cada placa recebeu uma marcação para identificar o meio de cultura, a diluição e a parte do sistema radicular de origem. O procedimento posterior foi de modo semelhante ao já descrito no item (2.2.6). Na segunda tentativa foram retiradas apenas porções terminais do sistema radicular de cada UE escolhida para representar cada tratamento. Estima-se que tenham sido recuperadas, aproximadamente dez gramas (10g) de raízes, por cada amostra, dos quais foram retirados apenas dois gramas (2,0g) para preparação da suspensão. A porção retirada foi colocada em um tubo, os quais foram fechados e depois levados para o fluxo laminar, onde se seguiu o procedimento semelhante ao descrito para o ensaio anterior (2.1.2.6), completando-se um volume final de vinte mililitros (20,0mL) com dezoito mililitros (18,0mL) de solução salina 0,85% p/v autoclavada. Nesse processo de isolamento foi usado apenas TSA como meio de cultura, sobre o qual foram aplicados cem microlitros (100 μ L) das suspensões obtidas a partir do maceramento das amostras de raízes. A diluição aplicada foi de 10^{-5} . É importante observar que nesse caso não foi aplicado qualquer tratamento térmico ou procedimento para enriquecimento da cultura. O isolamento a partir de partes distintas do sistema radicular foi feito com a intenção de

possibilita a avaliação da diversidade nas duas partes. Para isso partiu-se do princípio de que com o uso de partes diferenciadas do sistema radicular na preparação das suspensões se estaria favorecendo grupos com padrões de sucessão distintos.

2.3.6 COLHEITA

Aos cinquenta e seis dias após a inoculação (56 DAI), as três plantas remanescentes de cada tratamento foram retiradas dos tubos com cuidado para manter-se a integridade do sistema radicular. O substrato aderido ao sistema radicular de cada planta foi removido por lavagem em fluxo de água da torneira e depois por imersão em água destilada e autoclavada (H₂Oda). Em seguida, foi feita a avaliação do desenvolvimento das plantas. Mediu-se a altura total, do colo ao ápice, (ALT1) e determinou-se o número de folhas por planta (NFPP), a massa fresca total da planta (MFT), massa fresca da parte aérea (MFPA), e massa fresca do sistema radicular (MFSR). Por ocasião da dessa colheita não foi feito isolamento de endofíticos. Depois de secas em estufa a sessenta e cinco graus (65°C) até peso constante, determinou-se a massa seca de parte aérea e do sistema radicular. Os dados foram analisados estatisticamente para se verificar possíveis efeitos no desenvolvimento das plantas. Na análise estatística foram considerados os resultados obtidos com todas as cinco repetições e não apenas as três que foram colhidas no final do experimento.

2.4 ENSAIO E1/2004: ISOLAMENTO DE RIZOBACTÉRIAS USANDO-SE MUDAS DE CACAUEIRO EM CASA-DE-VEGETAÇÃO COMO PLANTAS ISCAS, EM MANAUS

Como já foi dito, esse ensaio foi montado com o objetivo de se obter novos isolados para recompor a coleção de rizobactérias, bem como, confirmar os efeitos colaterais da autoclavagem dos substratos sobre o desenvolvimento das mudas de cacaueteiro.

2.4.1 COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de solo foram coletadas nos mesmos sítios escolhidos para o primeiro conjunto de ensaios de isolamento e isolamento. Na amostragem, buscou-se repetir os mesmos procedimentos, exatamente nos mesmos locais, escritos no item 2.1.1. Na tabela 2.1 estão as datas de amostragem e a descrição sumária dos locais. Conforme já foi dito, o tempo passado desde a coleta até o momento do processamento foi diferente para cada um dos dois conjuntos de ensaios, mas as condições de armazenamento foram praticamente as mesmas. Como não se pretendia repetir os ensaios de isolamento em condições de bancada de laboratório, não foi feita a coleta de raízes por ocasião do peneiramento do solo, como foi feito na vez anterior. Os demais procedimentos de coleta e preparação das amostras foram semelhantes aos adotados para os ensaios anteriores, descritos a partir do item 2.2.1.

2.4.2 PREPARAÇÃO DOS SUBSTRATOS

Após o peneiramento das amostras de solo, foram preparadas porções de substratos de forma semelhante a que foi descrita no item 2.1.1.2. Depois de prontos, foram retiradas três (03) amostras representando cada um dos dezoito (18) tratamentos para análise química, cujos resultados estão apresentados mais adiante.

2.4.3 UNIDADE EXPERIMENTAL, MATERIAL VEGETAL, DELINEAMENTO E TRATAMENTOS

O ensaio foi montado em DIC, com sete repetições, tendo 18 variações para o fator substrato (Tabela 2.6). O material vegetal utilizado foi obtido a partir de frutos de cacauete variedade scavina colhidos no campo experimental da CEPLAC em Manaus. Esse material cedido pela administração do escritório local da CEPLAC foi o que se

encontrou disponível e mais geneticamente semelhante ao material usado no ensaio E1/2003.

Tratamentos	Descrição
1: MAN	Mistura com solo da Est. Exp. Da CEPLAC em Manaus-AM.
2: MNa1x	Mesma mistura usada no tratamento 1, autoclavada uma vez.
3: MNa3x	Mesma mistura usada no tratamento 1, autoclavada duas vezes.
4: PF1	Mistura com solo da comunidade Terra Preta em Presidente Figueiredo-AM.
5: PF1a1x	Mesma mistura usada no tratamento 4, autoclavada uma vez
6: PF1a3x	Mesma mistura usada no tratamento 4, autoclavada três vezes
7: PF2	Mistura com solo da comunidade do Rio Pardo em Presidente Figueiredo-AM.
8: PF2a1x	Mesma mistura usada no tratamento 7, autoclavada uma vez
9: PF2a3x	Mesma mistura usada no tratamento 7, autoclavada três vezes
10: IT1	Mistura com solo coletado no Sítio São Luiz - Itacoatiara-AM.
11: IT1a1x	Mesma mistura usada no tratamento 10, autoclavada uma vez
12: IT1a3x	Mesma mistura usada no tratamento 10, autoclavada três vezes
13: IT2	Mistura com solo coletado no sítio do Sr Zacarias – Itacoatiara-AM.
14: IT2a1x	Mesma mistura usada no tratamento 13, autoclavada uma vez
15: IT2a3x	Mesma mistura usada no tratamento 13, autoclavada três vezes
16: IT1&IT2	Mistura dos dois solos coletados em- Itacoatiara-AM.
17: IT1&IT2a1x	Mesma mistura usada no tratamento 16, autoclavada uma vez
18: IT1&IT2a3x	Mesma mistura usada no tratamento 6, autoclavada três vezes

Tabela 2.6. Designação e descrição dos tratamentos testados no ensaio E1/2004

Obs. Para detalhes do procedimento de coleta e preparação das amostras vide o item 2.4.1.

Nesse ensaio não foi feito o cultivo em terriço como controle. Além disso, diferentemente do que foi feito no ensaio E1/2003, inclui-se mais um tratamento que preservava a individualidade das duas amostras de solo coletadas em Itacoatiara, além daquele resultante da misturas dos solos de Itacoatiara adotado no ensaio E1/2003. Também foi acrescentada mais uma variação da condição de autoclavagem (Sete porções de cada mistura sofreram três (03) autoclavagens de uma hora (1:00h), a 120oC, 1 atm, intercaladas de 24:00 horas aproximadamente). Esse tratamento foi incluído com o objetivo de se ter uma condição inicial com total ausência de microorganismos. Para averiguar a efetividade do processo de autoclavagem, foi feito um teste cultivando-se placas contendo meio AN e inoculadas com amostras do material autoclavado. Vale observar que foi feita uma mistura com as duas amostras de solo coletadas em Itacoatiara a

fim de se repetir as mesmas condições do tratamento que teve o efeito mais pronunciado atribuído à autoclavagem observada no ensaio E1/2003.

2.4.4 OBTENÇÃO DAS MUDAS, PLANTIO E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Como já foi dito, esse ensaio foi montado seguindo-se os mesmos procedimentos já descritos para o ensaio E1/2003, repetindo-se os procedimentos de preparação de substrato, sanitização das sementes, pré-germinação e plantio. A diferença foi a inclusão de mais uma condição de autoclavagem e de mais uma variação de solo. A inclusão de mais uma variação de solo foi feita para se manter a individualidade de cada amostra coletada nos dois sítios em Itacoatiara. As plantas foram cultivadas em condição de casa-de-vegetação no período de dezembro de 2003 a fevereiro 2004. Durante esse período, não foi aplicado qualquer tratamento com produto químico e a condição ideal de umidade foi mantida por meio de regas diárias usando-se H₂Oda. Quando necessário, foram feitas retiradas manuais das ervas daninhas e catação de insetos.

2.4.5 AVALIAÇÃO, COLHEITA E ISOLAMENTO

Avaliou-se o desenvolvimento das plantas medindo-se algumas das mesmas variáveis adotadas no ensaio E1/2003 (MSPA, MSSR, NFPP e Alt.1), além disso, foi feita a análise dos teores de macro e micronutrientes na parte aérea. Dessa vez a área foliar foi medida usando-se um equipamento apropriado por ocasião da colheita aos oitenta dias após o transplantio (80 DAT).

A medição da área foliar foi feita com auxílio de um aparelho portátil da Marca LI COR modelo 3.000A. Mediu-se a área de todas as folhas das plantas de todos os tratamentos logo após a colheita. Com os valores obtidos foram calculadas as áreas foliares

médias de cada planta e depois foi calculada a média de cada tratamento. As médias das demais variáveis analisadas foram sempre calculadas a partir dos valores obtidos de cada uma das sete repetições, com exceção das médias dos resultados das análises químicas do tecido vegetal, as quais foram obtidas a partir de três repetições. Como forma de garantir a representatividade da variação dentro de cada tratamento, as três repetições usadas nas análises químicas do tecido vegetal foram formadas com a combinação de todas as plantas de cada tratamento, ou seja, de sete repetições juntou-se as quatro primeiras em dois pares e as restantes em um conjunto de três. Cada um desses conjuntos foi triturado com ajuda de um moinho e embalado em tubos plásticos previamente desmineralizados e devidamente identificados. Todas as análises químicas foram feitas no laboratório de análise de solos e plantas da Embrapa Amazônia Ocidental seguindo-se os procedimentos descritos no Manual de Análises Químicas de Solos, Plantas e Fertilizantes (EMBRAPA, 1999). Os dados foram registrados em planilha eletrônica e analisados com o programa estatístico. Por ocasião da análise estatística, nos casos de perdas de alguma UE, ela foi substituída por um valor médio obtido com as remanescentes. Foi feita a análise de variância e em seguida o teste de Tukey (5%) para comparação das médias.

O isolamento foi feito, a partir de diluições sucessivas partindo-se de uma suspensão obtida pela trituração de uma amostra composta de raízes de três plantas escolhidas ao acaso entre as sete repetições de cada tratamento. O procedimento foi semelhante aos já descritos no item 2.2.6. Inicialmente as plantas foram cortadas na altura do colo, separando-se o sistema radicular da parte aérea. Com o auxílio de uma tesoura, retirou-se apenas uma pequena porção, meio grama (0,5g) da terça parte inferior do sistema radicular de cada uma das três plantas escolhidas. Com a porção obtida foi formada uma amostra composta de um grama e meio (1,5g) por tratamento. A partir da amostra composta foi retirada uma porção de um grama (1,0g) de raízes. Essa porção foi

macerada em tubo de ensaio com a adição de nove mililitros (9,0mL) de solução salina (NaCl 0,85% peso/volume). Da suspensão obtida foram feitas diluições sucessivas retirando-se um mililitro (1,0mL) da suspensão anterior e adicionando-se no tubo seguinte contendo nove mililitros (9,0mL) da solução salina. Entre cada transferência, os tubos foram agitados com auxílio de um aparelho agitador de tubos. Quatro placas contendo meio de cultura TSA1/10 foram inoculadas com cem microlitros (100 µL) das suspensões obtidas de cada tratamento, duas com a diluição 10^{-5} e outras duas com a diluição 10^{-4} . As placas inoculadas foram deixadas em estufa com temperatura controlada a $28^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ até a visualização das colônias. Os isolados foram escolhidos levando-se em conta o aspecto visual de cada colônia. Como critério, procurou-se a maior diversidade de cor, forma, padrão de crescimento e textura. Os isolados selecionados foram transferidos inicialmente para placas contendo TSA 1/10 em grupos de vinte. Depois de verificado o crescimento, foi feita a transferência para microtubos de plásticos de um mililitro e meio (1,5mL) contendo aproximadamente seiscentos microlitros (600µL) do meio TSA 1/10. Esses tubos foram numerados pela ordem de isolamento e registrados com o número de ordem e tratamento do qual se originou em uma planilha eletrônica.

Os isolados mantidos em placas foram usados nos demais ensaios e eram repicados conforme a necessidade. Os isolados mantidos em microtubos constituíram a coleção e foram deixados como reserva pra eventuais reposições dos que foram usados.

PARTE 2: ENSAIOS DE BANCADA DE LABORATÓRIO PARA PRÉ-SELEÇÃO DOS ISOLADOS

Visando diminuir a quantidade de isolados a serem testados em ensaios com plantas, foi feita uma pré-seleção testando-se capacidade para produção de quitinases, AIA e solubilizar fosfato. Essas características foram escolhidas como critérios para seleção

devido a viabilidade de execução e importância entre os mecanismos apontados como responsáveis pela promoção de crescimento. A seguir são descritos detalhes dos procedimentos de pré-seleção dos isolados. Vale salientar que todo meio de cultura usado nos ensaios foi preparado seguindo-se o mesmo procedimento padrão de esterilização em autoclave (15min, 120°C, 1 atm).

2.1 PRÉ-SELEÇÃO DE ISOLADOS OBTIDOS NO CENTRO DE PESQUISA ALMIRANTE CACAU, EM ITAJUÍPE

Os isolados obtidos com os ensaios de isolamento realizados no CPAC, possíveis de serem mantidos em meio TSA, foram testados quanto a capacidade de produção de AIA e/ou quitinases. Na ocasião, também foram feitas tentativas de se testar a capacidade de degradar celulose e solubilizar fosfato. No entanto, os testes foram abandonados por não se ter um isolado que servisse como padrão de referência, e desse modo se ter certeza das condições ideais e funcionalidade dos testes. Na execução foram seguidos, basicamente, todos os procedimentos recomendados por Cattelan (1999) com algumas modificações.

2.1.1 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS PRODUTORES DA AIA

O procedimento seguido nos ensaios de bancada, para identificar isolados capazes de excretarem AIA, foi o descrito por Cattelan (1999). Tal procedimento foi originalmente adaptado por Bric *et al.* (1991).

Na execução do ensaio, até no máximo vinte (20) isolados que estavam mantidos em placas contendo meio TSA foram transferidos para uma placa contendo TSA 1/10 enriquecido com cinco milimolar (5,0mM) de L triptofano (1,021g.L⁻¹). Nas primeiras quatro (4) placas testadas, foi seguido integralmente o procedimento descrito por Cattelan (1999), aplicando-se uma membrana de nitrocelulose sobre cada placa de cultura um dia

após a transferência dos isolados. Nesse caso, a revelação foi feita com a solução de Salkowski aplicada sobre a membrana de nitrocelulose, a qual foi retirada em condições assépticas (câmara de fluxo laminar) e em seguida colocada sobre outra placa. O período de permanência da membrana na placa foi de aproximadamente vinte e quatro horas (24:00h). Em um procedimento alternativo, a revelação foi feita aplicando-se um pequeno volume, cerca de cinco mililitros (5,0mL) da solução de Salkowski diretamente sobre cada placa com o meio TSA 1/10 e os isolados inoculados. Nesse procedimento alternativo, a identificação do isolado apontado como positivo foi feita pela observação da posição correspondente na placa deixada como replica, a qual continha os mesmos isolados, nas mesmas posições e ordem que os da placa testada, ou então se observando o número do isolado correspondente marcado em um croqui da placa testada. Após a aplicação da solução de Salkowski, as placas eram deixadas em temperatura ambiente por cerca de uma hora (1:00h) até o surgimento de halos avermelhados característico do resultado positivo. A coloração avermelhada era mais facilmente percebida nas membranas de nitrocelulose devido seu fundo branco de contraste, no entanto, os halos também eram perfeitamente percebidos diretamente sobre as placas com o meio apresentando um fundo levemente amarelado. A comparação entre os modos de leitura pode ser feita pela observação das fotos no anexo dois (02).

As placas inoculadas foram deixadas em estufa bacteriológica regulada para 28 °C + 1,0; o meio de cultura usado foi preparado a partir do produto comercial Agar Tripto-Caseina-Soja (TSA) da marca BIOBRAS lote 9M128Y, e; a solução de Salkowski foi preparada pela diluição de um mililitro (1,0mL) de uma solução de cloreto de ferro ($\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,5M) em cinquenta mililitros (50,0mL) de ácido perclórico (HClO_4 – 35%). Como prova positiva da detecção de AIA no meio, foi aplicada uma gota de cinquenta microlitros (50 μL) de uma solução de AIA a cem micromolar (100 μM) sobre

um único ponto do meio de cultura em cada placa contendo os isolados a serem testados. Os isolados identificados como positivos no teste tiveram suas fichas acrescidas dessa informação e mantidos na coleção juntamente com os demais.

2.1.2 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS PRODUTORES DE QUITINASES

A identificação dos isolados produtores de quitinases foi feita pela observação direta da transformação do substrato adicionado ao meio de cultura baseando-se na mudança de coloração devido ao processo de transformação do substrato. O meio turvo se tornava translúcido como resultado da degradação da quitina adicionada. Também para esse teste foram seguidos os procedimentos básicos descritos por Cattelan (1999).

O procedimento consistiu da repicagem de até vinte (20) isolados em placas de Petri contendo meio sintético com quitina coloidal como fonte de carbono, seguida da incubação das mesmas em estufa bacteriológica, regulada para 28 °C + 1,0 °C, por pelo menos quarenta e oito horas (48:00h). O meio usado foi preparado na seguinte formulação para um litro: 8,0g de quitina coloidal (base seca); 2,0g de (NH₄)₂SO₄ – sulfato de amônio; 1,0g de MgSO₄ – sulfato de magnésio; 0,5g de KH₂PO₄ – fosfato de potássio monobásico; 3,0mL de NaFe EDTA 1,0mM. Para torná-lo sólido acrescentou-se quinze gramas de ágar por litro (15g.L⁻¹).

Como padrão para os testes de produção de quitinases foi usado o primeiro isolado identificado positivamente como quitinolítico entre os primeiros quarenta testados. Os resultados positivos foram registrados nas respectivas fichas de identificação e controle.

A quitina usada como substrato nos testes de produção de quitinases dos isolados obtidos em Itajuípe foi cedida pelo Laboratório de Bacteriologia de Plantas do Departamento de Fitopatologia da UFV (Universidade Federal de Viçosa).

2.2 PRÉ-SELEÇÃO DE ISOLADOS OBTIDOS EM MANAUS:

Em Manaus, os isolados obtidos foram testados quanto a capacidade de produção de AIA e solubilizar fosfato. Nesses ensaios, também foram seguidos os procedimentos descritos por Cattelan (1999). Para o teste de detecção de AIA adotou-se o mesmo procedimento alternativo descrito no item 2.2.1.1, sem o uso das membranas de nitrocelulose, e como padrão também foi usada uma gota de solução de AIA a cem micromolar (100 μ M). Para o teste de solubilização de fosfato adotou-se como padrão um isolado designado como I304, cedido pelo Dr. LUIZ ANTONIO OLIVEIRA, pesquisador da Coordenação de Pesquisas em Ciências Agronômicas (CPCA) do Instituto de Pesquisas da Amazônia (INPA). Na preparação dos meios de cultura foi usado o produto comercial Agar Tripto-Caseina-Soja (TSA) marca Sanofi®, lote 9M128Y.

O procedimento para identificação dos isolados solubilizadores de fosfato é semelhante ao que é feito para identificar quitinolíticos; consiste na observação da mudança de coloração do meio. A atividade enzimática sobre o substrato torna o meio, que é inicialmente opaco, em translúcido. O meio é opaco pela presença de fosfato insolúvel.

Para execução dos procedimentos de isolamento e todos os testes dessa etapa contou-se com o apoio do Laboratório de Genética de Microorganismo do Instituto de Ciências Biológica (ICB), do Laboratório de Solos da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA), e do Laboratório de Produtos Bioativos de Origem Microbiana, todos localizados no mini-campus da UFAM, os quais forneceram o material e os equipamentos usados nessa etapa.

Os isolados foram testados quanto a capacidade de solubilizar fosfato em grupos de vinte por placa. O tempo de incubação em estufa bacteriológica foi de até cinco dias a uma temperatura controlada de 28°C + 2,0. Cada placa devidamente identificada, tinha pontos no fundo para marcar os isolados e um croqui correspondente com a numeração dos

isolados. Como meio foi usado o TSA 1/10 acrescido do fosfato de cálcio. O fosfato de cálcio (CaHPO_4), responsável por tornar o meio opaco, resulta da reação entre o fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e o cloreto de cálcio (CaCl_2), adicionados separadamente ao meio TSA 1/10 ainda líquido, em condições assépticas, logo após o processo de esterilização por autoclavagem (120°C , 1atm, 20min) de todos os produtos. Após a adição das duas soluções, o pH do meio foi corrigido para 7,0 pela adição de NaOH 1,0N previamente esterilizado por autoclavagem. Na preparação das placas com o meio foram adicionados cinquenta mililitros (50,0mL) de solução KH_2PO_4 0,57M e cem mililitros (100mL) de CaCl_2 por cada litro (1,0L) em um volume de oitocentos e cinquenta mililitros (850mL) de TSA 1/10, totalizando um litro (1,0L).

PARTE 3: EXPERIMENTOS DE AVALIAÇÃO COM PLANTA

Todos os testes com plantas foram realizados com o apoio do CPAC em Itajuípe. No planejamento inicial foi prevista a seguinte seqüência de atividades: isolamento, isolamento, pré-seleção, e por fim o teste dos isolados com plantas para seleção final daqueles com potencial para uso na produção comercial de mudas de cacauzeiros. No entanto, por falta de disponibilidade de material, no momento apropriado, os dois primeiros testes com plantas foram feitos com isolados escolhidos ao acaso, sem terem passado por qualquer teste de pré-seleção. O único critério foi o maior crescimento das plantas usadas no ensaio de isolamento. Após ter sido possível a realização dos testes de pré-seleção, repetiu-se o ensaio com plantas testando-se apenas os quitinolíticos e/ou produtores de AIA. A seguir são apresentados os detalhes sobre cada um dos ensaios com plantas.

2.1 EXPERIMENTOS COM ISOLADOS ESCOLHIDOS AO ACASO

A avaliação dos efeitos em plantas foi inicialmente feita com a realização de dois ensaios para se testar onze (11) isolados escolhidos ao acaso entre os obtidos a partir das plantas do tratamento que apresentou o melhor desempenho de crescimento no ensaio de isolamento (E1/2003) e entre os pertencentes à coleção do CPAC.

2.1.1 CONDIÇÕES GERAIS DE EXECUÇÃO DOS EXPERIMENTOS

As mudas usadas nos dois ensaios foram formadas a partir de sementes colhidas de árvores de cacau TSH 1188 de uma plantação comercial pertencente ao CPAC. Após a colheita dos frutos, as sementes retiradas passaram por processo de limpeza usando-se serragem. O processo de limpeza consistiu em se amassar e se esfregar as sementes contra pó de serra até a retirada da mucilagem, depois disso, foram deixadas, de modo estratificado, para germinar em um recipiente contendo serragem levemente umedecida. Após a observação da emissão da radícula foi feita uma seleção das que apresentavam aspecto mais homogêneo de germinação. Para se ter um número suficiente de sementes homogeneamente pré-germinadas foram colocadas três vezes mais sementes para germinar do que se iria usar. Esse procedimento foi seguido nos dois experimentos com plantas usando-se os isolados escolhidos ao acaso. O tempo passado da semeadura até o transplantio foi de sete (7) dias no primeiro e oito (8) no segundo experimento.

Os dois experimentos foram montados em delineamento de blocos casualizados (DBC), sendo doze (12) tratamentos representados pelos onze (11) isolados mais o controle, quatro blocos. Cada unidade experimental foi constituída de cinco mudas de cacau TSH 1188 plantadas individualmente em sacos de polietileno contendo um litro e meio (1,5L) de terriço normalmente usado como substrato para produção comercial de

mudas. Isso resultou em um total de duzentos e quarenta (240) mudas em cada experimento.

O substrato usado em todos os cultivos foi preparado pelo simples peneiramento do solo em malha de quatro milímetros (4mm). Sendo que o solo usado foi retirado da camada superficial de 0 – 10cm de uma área próxima ao CPAC. E embora não tenha sido feita a análise química do mesmo, vale ressaltar que todo substrato usado em todos os experimentos foi preparado a partir de um único lote de terriço.

2.1.2 PLANTIO E INOCULAÇÃO

Os procedimentos seguidos no plantio e inoculação foram praticamente os mesmos para os dois experimentos. Após a escolha de um número suficiente de sementes pré-germinadas foi feito o plantio colocando-se uma semente em cada saco e imediatamente em seguida foi feita a aplicação do inóculo. A aplicação foi sempre feita sobre a semente já enterrada no substrato a uma profundidade de aproximadamente dois centímetros (2,0cm). Os isolados foram aplicados na forma de suspensão em um volume de dez mililitros (10mL) fazendo-se uso de seringas de plástico reutilizadas autoclavadas. Nas parcelas do tratamento controle foi aplicado o mesmo volume de meio aquoso usado na inoculação das outras parcelas, porém sem inóculo.

Na preparação da suspensão foram usadas células obtidas a partir do cultivo dos isolados em meio sólido, as quais foram dissolvidas em solução salina de cloreto de sódio a 0,85%. Cada suspensão teve sua concentração aproximada por ajustes na quantidade de solução salina adicionada. Para isso foi feita uma curva de Densidade Ótica (DO) em função do número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) para cada isolado testado. Os procedimentos para elaboração das curvas de DO x UFC são descritos a seguir.

2.1.3 PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE ISOLADOS

Para tentar padronizar a quantidade total de inóculo em cada tratamento foi feita a estimativa da quantidade de células viáveis de cada suspensão em função da DO. Com base nos procedimentos descritos por Urenha *et al.* (1994) e Neder (1992) foram construídas curvas de concentração usando-se os valores de DO versus UFC obtidos com cada isolado testado. Para isso uma massa de células de cada isolado foi obtida pelo cultivo em meio TSA por um período que variou entre quarenta e três a quarenta e oito horas (43 – 48:h). Cada suspensão foi feita a partir da transferência da massa das placas para um frasco contendo um de solução salina a 0,85%. Para ajudar na transferência, os meios foram lavados com a solução salina. O volume total inicial foi padronizado para dez mililitros (10,0mL). A partir da suspensão inicial foram feitas diluições sucessivas de dez vezes pela transferência de meio mililitro (0,5mL) para tubos seguintes contendo quatro mililitros e meio (4,5mL) da mesma solução salina. Entre cada transferência, os tubos eram agitados com auxílio de um agitador de tubos. Os valores de DO de cada suspensão diluída foram obtidos medindo-se a transmitância em um espectrofotômetro usando-se cubeta de 1,0mL, e feixe de luz no comprimento de 600nm. Para se estimar o UFC correspondente ao valor da DO lida foram cultivadas três placas inoculadas com cem microlitros de suspensão retirados das seguintes diluições: 10^{-2} ; 10^{-4} ; 10^{-6} ; 10^{-8} ; 10^{-10} e 10^{-12} . Após o período de incubação, que variou entre vinte e quatro a trinta e seis horas (24:00 – 36:00h) foi feita a contagem do UFC com auxílio de uma lupa e um contador manual. Os valores de DO e UFC adequados para cada isolado foram obtidos após várias tentativas e aproximações para se estabelecer o número de diluições necessárias. Embora não tenha sido feita a curva de crescimento para se determinar a fase log de cada isolado, adotou-se um período de quarenta a quarenta e oito horas (40:00 – 48:00h) como o mais apropriado para obtenção

do maior número de células viáveis. Além disso, os isolados escolhidos tinham certa semelhança no padrão de crescimento.

Na tabela 2.7 estão relacionados os isolados com as respectivas origens e concentrações aproximadas das suspensões aplicadas por ocasião da instalação dos dois experimentos para se avaliar seus efeitos em planta.

Isolados	Origem ^{*1}	Ensaio1		Ensaio2	
		DO ^{*2}	ufc ^{*3}	DO ^{*2}	ufc ^{*3}
I005-E1ITAaM1-A1	ITAa – meio King's B	51	1,304x10 ¹⁰	45	2,345x10 ¹¹
I007-E1ITAaM1-A3	ITAa – meio King's B	48	4,261x10 ¹¹	45	7,200x10 ¹¹
I023-E1ITAaM1-B1	ITAa – meio King's B	45	3,127x10 ¹²	51	8,732x10 ¹¹
I044-E1ITAaM2-A1	ITAa – meio TSA	55	5,231x10 ¹²	50	3,123x10 ¹²
I045-E1ITAaM2-A2	ITAa – meio TSA	60	2,116x10 ¹⁰	50	4,234x10 ¹²
I054-E1MANM3-A3	MAN – meio K523	74	1,404x10 ¹⁰	66	2,804x10 ¹¹
I103-E1ITAaM3-A12	ITAa – meio K523	79	1,240x10 ¹⁰	61	3,256x10 ¹¹
I164-E1ITAAM5-A1	ITAa – meio ANc/T	65	9,541x10 ¹¹	45	4,754x10 ¹⁰
R069-	Coleção do CPAC	52	1,034x10 ¹⁰	50	2,103x10 ¹⁰
R105-	Coleção do CPAC	64	1,810x10 ¹⁰	56	4,400x10 ¹⁰
Alb352	Coleção do CPAC	57	5,500x10 ⁹	60	1,2544x10 ⁹

Tabela 2.7 Relação dos isolados escolhidos ao acaso e testados nos dois ensaios com plantas

Obs.*1: Os isolados obtidos com os ensaios de isolamento receberam designação que faz referência ao solo e ao meio de cultura usado; *2: Em porcentagem de transmitância a seiscentos nanômetros (%T_{600nm}); *3: Número de Unidades Formadoras de Colônia estimado pela contagem em placas inoculadas com as suspensões obtidas por diluições sucessivas. Para mais detalhes ver item 2.1.3.

2.1.4 CONDUÇÃO, AVALIAÇÕES E COLHEITA

As plantas foram cultivadas em casa-de-vegetação por um período de noventa e nove (99) dias no primeiro experimento, e de cento e nove (109) dias no segundo. Durante os dois cultivos foram repetidas as aplicações das suspensões a cada quinze dias até uma semana antes da colheita. Os isolados foram aplicados em volumes de dez mililitros (10,0mL) do mesmo modo que foi feito na inoculação por ocasião do plantio, usando-se concentrações próximas, pois nesse caso foram ajustadas somente com base na DO da suspensão. O ajuste foi feito pela diluição da massa celular em um volume de solução

salina (0,85% p/v) até que se atingisse o valor de transmitância próximo ao desejado. Além da aplicação freqüente dos inóculos, também foram realizados tratos culturais de rotina como regas diárias, limpeza manual das ervas daninhas e catação manual de pragas.

O desenvolvimento vegetal foi avaliado por meio de medições quinzenais da altura das plantas. Foram feitas medidas de duas alturas até o ápice de cada planta, a primeira a partir do colo, denominada de Alt.1, e a segunda a partir do ponto de inserção dos cotilédones, chamada de Alt.2. Com os valores obtidos, expressos em centímetro (cm), após serem organizados em uma planilha de dados do ©EXCEL foi feita análise de variância e aplicado o teste de Tukey para comparação das médias. Toda análise estatística foi feita com auxílio do software ©SAEG.

Ao final dos dois cultivos, as plantas apresentaram problemas de nutrição. Embora o problema tenha sido observado ainda no primeiro cultivo, foi somente no segundo que se deduziu a relação com a aplicação intermitente das suspensões de bactérias em solução salina a 0,85% (p/vol.), o que estava causando salinização do substrato. Foi então que se mudou o meio aquoso usado nas aplicações. Portanto, na segunda repetição do ensaio, a partir da sexta (6^a) aplicação, as suspensões passaram a ser preparadas com água de poço autoclavada (2x120 oC, 1atm, 45min).

2.2 EXPERIMENTO COM ISOLADOS QUITINOLÍTICOS E PRODUTORES DE AIA

Após os resultados dos testes para identificação de isolados quitinolíticos e produtores de AIA, foi feito um experimento para se avaliar o efeito de cinco isolados identificados como produtores de AIA e cinco quitinolíticos sobre mudas de cacau TSH1188. Nesse ensaio, os isolados também foram aplicados individualmente por ocasião

do plantio e intermitentemente ao longo do cultivo a cada duas semanas a partir da segunda semana após o plantio.

2.2.1 PREPARAÇÃO, INSTALAÇÃO E CULTIVO

O substrato usado foi formado com o mesmo terriço usado nos dois experimentos anteriores. Cada unidade experimental consistiu de cinco mudas de cacau TSH 1188 cultivadas individualmente em um conjunto de cinco tubetes, sendo que cada tubete continha quatrocentos mililitros (400mL) de substrato. O experimento foi montado em DBC, com onze (11) tratamentos representados pelos dez (10) isolados mais o controle e quatro repetições. Os procedimentos para obtenção das sementes, pré-germinação, plantio, inoculação e cultivo foram semelhantes aos já descritos para os dois ensaios anteriores.

2.2.2 AVALIAÇÃO, COLHEITA E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar o efeito da inoculação dos isolados sobre as plantas foram feitas medições das alturas e contagem dos números de folhas de cada planta ao longo do cultivo em intervalos de 15 dias a partir do sétimo dia após o transplante (7o DAT). A última avaliação foi feita aos 36 DAT. Os valores obtidos foram tabulados em planilha do Excel e analisados com ajuda de um programa de análise estatística.

3. RESULTADOS, ANÁLISE E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos com os ensaios para isolamento de rizobactérias estão apresentados e discutidos em quatro (4) partes. Na primeira, item 3.1, são abordados os resultados obtidos nos ensaios de isolamento realizados em Itajuípe, e na segunda, no item 3.2, os resultados do ensaio de isolamento realizado em Manaus. Os resultados dos ensaios de pré-seleção por meio de testes de bancado e os resultados dos testes dos isolados com plantas são apresentados logo em seguida nos itens 3.3 e 3.4.

3.1 ISOLADOS OBTIDOS COM OS ENSAIOS EM ITAJUÍPE-BA.

Conforme anteriormente mencionado no item material e métodos, no primeiro ensaio para isolamento de rizobactérias, realizado em Itajuípe (E1/2003), não foi feito isolamento a partir dos tratamentos com os substratos formados com os seguintes solos que sofreram autoclavagem: o de Manaus (MANa) e os dois de Presidente Figueiredo (PF1a e PF2a), pois as plantas cultivadas nesses substratos não se desenvolveram. Em acordo com a estratégia previamente definida, foi dada prioridade para o isolamento a partir dos tratamentos que apresentaram melhor desenvolvimento das plantas.

O Processo de isolamento foi iniciado usando-se as plantas cultivadas no solo de Itacoatiara autoclavado (ITAA), uma vez que esse foi o tratamento que apresentou maior desenvolvimento das plantas, segundo a avaliação feita por ocasião do isolamento. Na tabela 3.1 estão apresentadas as médias das variáveis altura, número de folhas por planta e área foliar média por planta do ensaio E1/2003 por ocasião do procedimento para obtenção dos isolados de rizobactérias.

	Alt. (cm)		NFPP (unidade)		AFMP (cm ²)	
Controle	19,46	A	4,40	A	1,7400	AB
MAN	20,78	A	4,20	A	1,5950	AB
PF1	21,14	A	4,20	A	1,3067	AB
PF2	22,52	A	4,40	A	1,9464	AB
ITA	21,42	A	4,40	A	1,7998	Ab
MANa	0,00	C	0,00	B	0,0000	B
PF1a	6,25	B	1,00	B	0,0375	B
PF2a	0,00	C	0,00	B	0,0000	B
ITAAa	21,55	A	5,25	A	3,164	A

Tabela 3.1. Valores médios das variáveis, altura (Alt1), número de folhas por planta (NFPP) e área foliar média por planta (AFMPP) das mudas de cacauzeiros do ensaio de captura (E1/2003) por ocasião da coleta de amostras de raízes para o isolamento de rizobactérias, aos trinta e três dias após o transplântio (33 DAT).

Obs. Médias seguidas de mesma letra não possuem diferença significativa das demais em uma mesma coluna pelo teste Tukey (0,5%). Legenda: Alt.: altura; NFP: Número de Folhas por Planta; AFMPP: Área Foliar Média Por Planta; Médias obtidas a partir de quatro ou cinco Plantas de cacau TSH1188 com 33 DAT (dias após o transplântio), cultivadas em substratos formados a partir de amostras de solos coletadas em 3 localidades do Estado do Amazonas (Manaus – MAN, Presidente Figueiredo PF1 e PF2, Itacoatiara – ITA). Para mais detalhes deve ser buscada a descrição do procedimento experimental no item 2.1

Embora as plantas cultivadas no substrato ITAAa não tenham apresentado o maior valor médio de altura, elas apresentaram maior número de folhas e maior área foliar média estimada. Foi levando-se em conta essas condições que se optou por priorizar o isolamento a partir dessas plantas. Foram escolhidas cento noventa e sete (197) colônias entre aquelas crescidas nas placas contendo diferentes meios de cultura e inoculadas com as suspensões obtidas a partir das raízes das plantas cultivadas em substratos formados com as amostras de solo colhidas nas três localidades do Estado do Amazonas mencionadas no item 2.1. Do total obtido, apenas cento e setenta e cinco (175) isolados foram mantidos em meio TSA compondo a primeira coleção de rizobactérias, com os quais foram feitos os testes de bancada de laboratório para pré-seleção. Posteriormente, com os isolados pré-selecionados, foram feitos os testes com plantas. Na tabela 3.2 estão apresentados o número de isolados obtidos a partir de cada tratamento em cada meio de cultura usado no ensaio E1/2003.

Origem	BDA+	Thornton	TSA	K 523	King	AN	AN+tt	ES	Sub tot. *2
01: MAN	(-)	(-)	4-0	12-12	5-1	8-8	4-4	0-0	33-25
02: PF1	(-)	(-)	8-8	8-8	5-5	4-0	8-8	0-0	33-29
03: PF2	(-)	(-)	4-4	8-8	8-4	4-4	8-8	0-0	32-28
04: ITA	(-)	(-)	8-8	12-12	8-4	4-4	4-4	0-0	36-36
05: MANa	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
06: PF1a	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
07: PF2a	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
08: ITAa	(-)	(-)	8-8	12-12	9-9	8-8	8-8	0-0	45-45
09: Cont.	(-)	(-)	1-0	8-8	1-0	4-4	4-4	0-0	18-16
TOTAIS*3	(-)	(-)	33-28	60-60	36-23	32-28	36-36	0-0	197-175 *4

Tabela 3.2. Número de isolados obtidos no ensaio (E1/2003) realizado em Itajuípe utilizando-se diferentes meios de cultura para isolamento de rizobactérias. (*1).

Obs: (-): ausência de dados; *1: O número a esquerda de cada coluna se refere a quantidade de isolados escolhidos, e o da direita se refere a quantidade de isolados preservados na coleção em meio TSA1/10. *2: Número de isolados obtidos em cada tratamento (substrato), considerando-se os diferentes meios de cultura usados no isolamento. *3: Somas das quantidades de isolados obtidos em cada meio de cultura (soma na vertical). *4: total geral. Os isolados foram obtidos a partir das raízes de mudas de cacaueteiro TSH1188, cultivadas em casa-de-vegetação, usando-se substratos formados a partir de amostras de solos coletadas em três localidades do Estado do Amazonas (Manaus – MAN, Presidente Figueiredo PF1 e PF2, Itacoatiara – ITA). Mais detalhes no item Material e Métodos.

Não foi obtido isolado algum a partir dos meios BDA, Thornton e ES. Do meio Thornton não foram escolhidas colônias devido ao crescimento indesejado de fungos e/ou crescimento muito rápido das colônias, o que inviabilizou a seleção. O crescimento de fungos no meio BDA, o que inviabilizou a escolha de colônias de bactérias, ocorreu mesmo tendo sido adicionado 100mg.L^{-1} de cicloheximida. Talvez, o fungicida tenha sido degradado durante a fervura do meio, uma vez que houve a necessidade de reaquecê-lo durante a preparação das placas. Além disso, segundo Beaver e Bollard (1970), esse é um meio em que os carboidratos disponibilizados pela infusão da batata favorecem o crescimento de fungos e leveduras com inibição parcial de bactérias. Associado a isso poder ter ocorrido ineficácia do fungicida, o que poderia ter sido causado pela sua degradação devido seu armazenamento inadequado, ou por qualquer outro motivo capaz de

causar sua deterioração e perda de efetividade de ação, pois se tratava de um produto que já vinha sendo utilizado por um certo tempo. Contudo, nenhuma dessas possibilidades foi verificada. No meio extrato de solo (ES) houve crescimento de um número reduzido de colônias de bactérias, no entanto, pelo fato das mesmas não apresentarem aspecto diversificado e diferente dos demais, todo material foi descartado. O número reduzido de colônias observados no meio ES pode ser atribuído à pobreza do mesmo. Na preparação desse meio foi usado um solo mineral para se obter o extrato, o que implica em pobreza de carbono reduzido. Mesmo não tendo sido feita a análise do teor de matéria orgânica no solo usado na preparação do meio ES, pelas características visuais do mesmo, considerou-se que se tratava de um solo mineral, com menos de oitenta gramas de carbono por quilograma de terra fina (80g.kg^{-1}) (EMBRAPA 2006). Segundo Cardoso (1992), a disponibilidade de carbono reduzido é um dos fatores mais limitantes para o crescimento de bactérias heterotróficas no solo.

Na tabela 3.3 podem ser constatados os valores médios das variáveis de desenvolvimento das plantas ao final do experimento. E; no item 3.2 serão discutidos com mais detalhes os efeitos dos substratos sobre a nutrição e o desenvolvimento das plantas.

Ao se comparar os dados de desenvolvimento das plantas, no momento do isolamento (Tabela 3.1) e no final do experimento (Tabela 3.3), se constata que a vantagem em desenvolvimento das plantas do tratamento (ITAA) em relação às dos demais era mais evidente na fase inicial do que na fase final do experimento. Isso pode ser atribuído à limitação imposta pelo volume de substrato. Ao final do experimento, muito provavelmente, as plantas já se encontravam em uma condição limitante ao crescimento imposta pelo pequeno volume de substrato. As plantas que atingiram, em menor tempo, o potencial máximo de crescimento permitido pelo volume de substrato disponível foram prejudicadas no crescimento devido a limitação de substrato, no entanto, as plantas com

crescimento mais lento continuaram crescendo até atingirem essa condição. Com isso, ao final do experimento, a diferença inicial foi praticamente anulada.

	Alt.1 (cm)	MFPA (g)	MFSR (g)	NFPP (unidade)	MSPA (g)	MSSR (g)
Cont	27,00 a	5,7960 ab	4,4920 BC	9,2000 a	2,3820 A	1,8900 A
MAN	25,60 a	4,7280 bc	3,1360 Bcd	7,8000 ab	2,2940 A	1,4560 Ab
PF1	25,64 a	4,7080 bc	2,5260 Cd	6,2000 b	2,0560 A	1,4070 Ab
PF2	26,98 a	3,9100 bc	3,1300 Bcd	6,4000 b	1,6940 Ab	1,1480 B
ITA	26,30 a	4,8920 ab	4,7720 B	6,6000 ab	1,9100 A	1,3460 Ab
MANa	19,80 b	2,6400 C	1,5333 D	7,6667 ab	0,8233 B	0,3733 C
PF1a	26,00 a	5,2150 ab	2,9200 Bcd	9,2500 a	1,8700 A	0,7450 bc
ITAA	28,73 a	6,9133 A	7,1900 A	9,3333 a	2,4150 A	1,3400 Ab

Tabela 3.3. Valores médios das variáveis de desenvolvimento das mudas de cacauzeiros ao final do ensaio de captura (E1/2003).

Obs. Valores seguidos de mesma letra não possuem DMS (Diferença Mínima Significativa) pelo teste Tukey (5%) que as diferenciam das demais em uma mesma coluna. Legenda: Alt.1: altura – mediada do colo ao ápice da planta; MFPA: Massa Fresca da Parte Aérea; MFSR: Massa Fresca do Sistema Radicular; NFP: Número de Folhas por Planta; MSPA: Massa Seca da Parte Aérea; MSSR: Massa Seca do Sistema Radicular; Médias obtidas a partir de quatro ou cinco Plantas de cacau TSH1188 com 117 dias após o plantio, cultivadas em substratos formados a partir de amostras de solos coletadas em 3 localidades do Estado do Amazonas (Manaus – MAN, Presidente Figueiredo PF1 e PF2, Itacoatiara – ITA). Para mais detalhes, verificar a descrição do procedimento experimental no item 2.1.

Um fato que merece destaque foi o definhamento das plantas do tratamento PF2a depois da coleta das raízes para o isolamento. Para explicar as diferenças de desenvolvimento entre as plantas cultivadas nos substratos autoclavados e não autoclavados, mas de mesma origem, foram levantadas as seguintes alternativas de justificativa: a) efeito da autoclavagem sobre a disponibilidade dos elementos químicos presentes nos substratos, resultando em efeito benéfico ou prejudicial; b) efeito da autoclavagem diminuindo drasticamente a população microbiana original e favorecendo a recolonização do substrato por esporulantes ou de colonizadores, que poderiam favorecer ou não o desenvolvimento das mudas; c) uma combinação das alternativas anteriores, ou seja, uma interação entre a alteração na disponibilidade de nutrientes com a população

microbiana remanescente ou colonizadora. As implicações da autoclavagem na disponibilidade de nutrientes e efeitos sobre o desenvolvimento das plantas são discutidas mais adiante.

Comparando-se o número de isolados recuperados em cada meio de cultura (tabela 3.2), fica evidente a maior diversidade morfológica das colônias apresentada no meio K523. Esse é um meio complexo indefinido, tendo na sua composição extrato de levedura e caseína como fontes de nitrogênio orgânico e apresenta sacarose como fonte de carbono, tudo isso o torna muito apropriado para uma vasta diversidade de grupos metabólicos de bactérias, e por isso tem sido usado no estudo da fisiologia de bactérias dos gêneros *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas* (BIAGI, AZEVEDO, 1992) ou para estudos exploratórios da população bacteriana (HALFELD-VIEIRA *et al.*, 2004). Nesse experimento, foi o meio no qual se observou a maior diversidade de formas de colônias entre todos os meios usados para quase todos os substratos, com exceção para PF1, onde foi observado mesmo número de isolados, tanto para esse meio quanto para TSA (tabela 3.2). Contudo, pode se afirmar que mais uma vez fica comprovada a versatilidade do meio K523 para o cultivo de diversos grupos de bactérias.

O tratamento térmico das suspensões originais antes da inoculação na placa contendo meio (AN+tt) foi um procedimento adotado para favorecer a seleção de bactérias termorresistentes, mais exatamente as do gênero *Bacillus*. Com esse procedimento foi possível a recuperação de trinta e seis (36) isolados, já pré-definidos como termorresistentes e ou esporulantes. Tais isolados foram obtidos a partir das plantas cultivadas nos substratos não autoclavados (MAN, PF1, PF2 e ITA) e no autoclavado de Itacoatiara (ITAA).

As quantidades de isolados obtidos usando-se o meio AN+tt não apresentaram padrão de semelhança aos apresentados pelos demais meios de cultura em cada substrato

de cultivo das plantas (tabela 3.2), ou seja, ao se comparar a variação do número de colônias obtidas com cada um dos meios de cultura usados no procedimento de isolamento (BDA+, Thornton, TSA, K 523, King, AN, ES) entre os substratos de cultivo das plantas de onde esses isolados foram obtidos (MAN, PF1 PF2, ITA, ITAa e Cont.), não foi possível se estabelecer uma tendência bem definida que pudesse indicar uma relação do tratamento térmico com as condições do ambiente representadas pelos substratos de cultivo das plantas. Mesmo assim, ainda é possível se fazer algumas afirmações. Pode se dizer que o tratamento térmico da suspensão antes da inoculação favoreceu a seleção de bactérias termorresistentes ou esporulantes, pois houve menor número de colônias recuperadas com esse tratamento (ANtt) em comparação aos demais, com exceção para PF1 usando-se os meios King e NA, para PF2 usando-se o meio TSA, e para o tratamento Controle usando-se tanto o meio TSA quanto o meio King. Nesses casos o número de isolados obtidos foi maior com o tratamento térmico. Como o tratamento visava favorecer bactérias termorresistentes, o número de isolados recuperados poderia ser menor que nos tratamentos com outros meios de cultura se as condições ambientais de origem dos substratos de cultivo das plantas não favorecessem a predominância de bactérias termorresistentes, mas se as condições fossem favoráveis, então era de se esperar maior diversidade de formas de colônias e maior número de isolados recuperados no meio ANtt do que nos demais meios dentro dos substratos de cultivo das plantas em que tal condição ocorreu. A existência de relação entre substrato de cultivo e o grupo de bactérias termorresistentes é sugerida ao se considerar a diminuição de diversidade em aspecto visual das colônias, quando se compara, por exemplo, o número de isolados obtidos com o meio K523, em cada um dos substratos, com o padrão de variação do número de isolados obtidos com o meio Na+tt. Nota-se que não houve redução do número de isolados somente para os dois tratamentos com os solos oriundos de Presidente Figueiredo. A partir disso se

pode deduzir que os solos de Presidente Figueiredo parecem favorecer grupos de bactérias termorresistentes. Isso pode está relacionado com a hipótese de que as chamadas “terras pretas” da Amazônia terem sua origem antropogênica, e muito provavelmente, pela prática de queimadas exercidas por povos primitivos, o que teria favorecido, em longo prazo, grupos de bactérias termorresistentes. Para se saber se nos solos caracterizados como “terra-preta-de-índio”, encontrados em Presidente Figueiredo, realmente predominam bactérias termorresistentes é necessário um estudo mais detalhado sobre o perfil da população de bactérias nos dois sítios de Presidente Figueiredo e uma comparação com outros locais com e sem histórico de queimadas.

A preferência dada ao isolamento a partir das UE com substrato ITAa, também, de certa forma, estaria direcionando o processo de isolamento, mas nesse caso, nem tanto para os termorresistentes, pois isso estaria dependente muito mais da velocidade de colonização do ambiente alterado do que da presença de propágulos remanescentes após a autoclavagem. É admissível a predominância de organismos termorresistentes no processo de sucessão em um solo que passou por uma seqüência de queimadas. No entanto, devem ser considerados outros aspectos no processo de sucessão microbiana. Segundo Cardoso (1992), a maior ou menor habilidade competitiva de uma população pode ser decorrência de vários fatores, tais como, velocidade de crescimento, rápida assimilação de nutrientes, tolerância a todos os fatores bióticos e abióticos encontrados, presença de mecanismos que superem as “barreiras à colonização” do substrato e plasticidade nutricional. Ou seja, a vantagem na sucessão em um ambiente modificado em seu estado de equilíbrio dinâmico está muito mais condicionada pela habilidade dos organismos utilizarem o substrato disponível para aumentar sua taxa de reprodução, e ou, de alterar alguma condição do ambiente ao seu favor, do que da quantidade inicial de propágulos. Portanto, mesmo que grupos de bactérias esporulantes tenham resistido ao processo de autoclavagem isso por si

só não garante que esse grupo fosse o único favorecido no processo de colonização das raízes das mudas de cacaueteiro usadas como iscas. Em condições naturais, de acordo como Cardoso e Freitas (1992), as bactérias Gran-negativas são mais favorecidas que as Gran-positivas, e as formas não esporulantes mais do que as esporuladas, sendo que a prevalência do gênero *Pseudomonas* sobre *Bacillus* pode ser explicada pela diferença entre as taxas de multiplicação. Ainda segundo as mesmas autoras, para *Pseudomonas*, na rizosfera, o tempo de geração já observado chegou a ser de cinco virgula duas horas (5,2h), enquanto que para *Bacillus*, foi de trinta e nove horas (39h). Portanto, nas condições de cultivo das plantas adotadas nesse experimento, muito provavelmente, as cultivadas em substratos que sofreram autoclavagem, também pode ter ocorrido prevalência de grupos com maior habilidade de colonizar a rizosfera, como *Pseudomonas*, do que *Bacillus*, que possuem menor taxa de multiplicação. Sendo assim, três aspectos relacionados ao processo de sucessão microbiana em solos devem ser considerados na análise do efeito da autoclavagem dos substratos sobre o número de isolados obtidos. O poder residual microbiano, dado principalmente pelo grau de resistência das formas não vegetativas, a facilidade de dispersão e a capacidade de uso dos alimentos disponíveis em cada substrato.

Ao se tentar estabelecer padrões de variações dos números de isolados obtidos entre os diferentes substratos e entre os diferentes meios de cultura, fica mais evidente a falta de pelo menos uma contagem dos diferentes grupos morfológicos de bactérias por placa. O que permitiria uma comparação da densidade populacional em cada condição estudada, pois como já foi mencionado por Pereira *et al.* (1996), uma simples avaliação das densidades populacionais da comunidade microbiana nos solos, é importante, tanto na identificação de fatores que exercem influência no equilíbrio microbiológico dos solos, como na caracterização das relações entre os diferentes grupos e espécies de microrganismos. Portanto, a informação da densidade populacional poderia ajudar a

esclarecer que grupos realmente teriam levado vantagem na colonização dos substratos autoclavados.

Outro ponto que merece destaque é a diferença entre o número de isolados obtidos em cada meio usado no isolamento e o número de isolados preservados em meio TSA (Tabela 3.2). Essa variação pode ser relacionada com a seletividade de cada meio de cultura, no entanto, outros fatores relacionados com as condições de preservação podem ter afetado a sobrevivência dos isolados no meio adotado para preservação. Levando-se em conta apenas os totais isolados em cada meio e os preservados em meio TSA1/10, se observa que com o meio K523 foi obtida a maior diversidade de isolados sem ocorrência de perdas após a transferência para o meio TSA1/10, adotado como meio para preservação da coleção. Em situação oposta se destaca o meio de King, indicado para seleção de *Pseudomonas fluorescens*, *P. aurioGINOSA* e *P. putida*. Com esse meio foi selecionado um grupo de bactéria que não se adaptou posteriormente ao meio TSA, ocorrendo o maior número de perdas entre os meios. A escolha dos isolados crescidos no meio de King foi feita com base na coloração indicativa da produção de sideróforos, portanto, teoricamente se estaria transferindo *Pseudomonas* para o meio TSA. Contudo, não se encontrou uma possível explicação para as perdas ocorridas.

O fato de não ter ocorrido perdas na transferência dos isolados obtidos a partir do substrato ITAa, mesmo para os oriundos do meio de King, pode ser apontado como efeito da autoclavagem sobre o perfil dos isolados favorecidos pela autoclavagem. Isso indica que o grupo selecionado, provavelmente, é muito “cosmopolita” e resistente às condições adversas.

Do isolamento feito a partir de uma planta do primeiro ensaio realizado em condições de bancada de laboratório (E2/2003), montado para captura de bactérias endofíticas, foram obtidos pelo menos dois isolados de uma das partes do sistema radicular

amostrado – superior ou inferior. No total foram escolhidos, nesse primeiro isolamento, vinte e nove (29) isolados para compor a coleção. Na tabela 3.4 estão apresentadas as quantidades de isolados obtidos com cada tratamento do ensaio E2/2003 para captura de endofíticos.

Tratamentos:	MAN		PF1		PF2		ITA1		ITA2	
	Sup	Inf	Sup	Inf	Sup	Inf	Sup	Inf	Sup	Inf
K523	2	2	2	2	2	3	2	2	1	3
NA	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0
Tot./trat.	8		8		5		4		4	

Tabela 3.4. Número de isolados obtidos no ensaio E2/2003 – primeiro isolamento – a partir da porção superior (Sup) ou inferior (Inf) do sistema radicular de mudas de cacaueteiro.

Obs. Cada tratamento corresponde a uma fonte de inóculo obtida a partir de diferentes amostras de solo coletadas no Estado do Amazonas. Inf.: significa que a suspensão foi obtida a partir de uma amostra de raízes retirada da porção terminal inferior do sistema radicular; Sup.: significa que a suspensão foi obtida a partir da porção superior do sistema radicular, mais próxima do colo da planta. Para mais detalhes ver a descrição do procedimento experimental no item material e método.

Do segundo isolamento, feito a partir das plantas remanescentes do primeiro ensaio para captura de endofíticos (E2/2003), foram escolhidos apenas quatro (4) isolados por cada um dos seguintes tratamentos: MAN, PF1, PF2, ITA1 e ITA2. O critério para escolha continuou sendo o aspecto visual das colônias, no entanto, foi estabelecido esse número máximo. Não foi feita qualquer tentativa de isolamento a partir das plantas do tratamento controle, uma vez que esse tratamento só foi incluído para servir de referência na verificação de eventuais efeitos dos demais tratamentos sobre o crescimento das plantas. No final do segundo isolamento foram obtidos mais vinte isolados, o que totalizou quarenta e nove (49) isolados a partir das plantas inoculadas com macerados de raízes e cultivadas em condições de bancada de laboratório.

Os valores médios das variáveis de desenvolvimento das plantas usadas como UE do ensaio E2/2003 estão apresentadas na tabela 3.5.

	Alt.1 (cm)		MFPA (g)	MFSR (g)	NFPP (unidade)	MSPA (g)	MSSR (g)
Cont	25,2467	A	2,4840 A	1,1527 A	5,0 AB	0,3953 A	0,0720 A
MAN	26,9800	A	2,7160 A	0,9420 A	5,8 A	0,4340 A	0,0900 A
PF1	26,2000	A	2,5260 A	1,0940 A	4,8 AB	0,3980 A	0,1040 A
PF2	27,5200	A	2,6120 A	0,9640 A	5,2 AB	0,4220 A	0,0940 A
IT1	25,5000	A	2,1640 A	0,8700 A	3,8 AB	0,3040 A	0,0680 A
IT2	24,7800	A	2,0180 A	0,8220 A	3,6 B	0,3300 A	0,0680 A

Tabela 3.5. Valores médios das variáveis de desenvolvimento de plantas usadas no ensaio de captura de endofíticos (E1/2003). Plantas com trinta dias após o transplântio (30 DAT).

OBS. Cada tratamento corresponde a uma fonte de inóculo obtida a partir de fragmentos de raízes coletadas de diferentes amostras de solos oriundas de Manaus – MAN, Presidente Figueiredo – PF1 e PF2, Itacoatiara – IT1 e IT2. Médias obtidas a de cinco repetições. Letras iguais para médias estatisticamente semelhantes segundo o teste Tukey (5%). Para mais detalhes ver a descrição do procedimento experimental no item material e método.

Pelo resultado da análise estatística dos dados sobre o desenvolvimento das plantas do ensaio E2/2003, só houve diferença significativa na comparação entre os valores médios da variável NFPP. Para essa variável, a única diferença foi dada pelo tratamento MAN, o qual apresentou valor médio significativamente superior em relação ao tratamento ITA2, mas não sobre o controle. Como já foi dito, para as demais variáveis, não houve diferença estatisticamente significativa nas condições testadas. No entanto, deve ser destacado o fato das plantas do tratamento MAN, as quais foram inoculadas com macerado de raízes coletadas das amostras de solo oriundas da Estação Experimental da CEPLAC em Manaus, terem apresentado os maiores valores médios de MFPA, NFPP e MSPA, e só não terem apresentado os maiores valores médios ao se comparar as variáveis Alt.1, MFSR e MSSR. Esses resultados apontam para um efeito do tratamento sobre o desenvolvimento das plantas, o qual pode ter sido resultado da atuação de microorganismos. O argumento para essa dedução se sustenta nos seguintes pontos: Parece ser regra na natureza o desenvolvimento de mecanismos eficientes em ambientes com escassez de recursos. Sendo assim, é presumível que as plantas de um modo geral evoluam no sentido de estabelecerem

associações simbióticas mutualísticas, justamente para suprirem suas necessidades nutricionais. Dois elementos essenciais servem bem como exemplos disso, o nitrogênio (N) com bactérias fixadoras, e o fósforo (P) com os fungos micorrízicos; Ao se considerar o fato de que os latossolos da Amazônia são tidos como de baixa fertilidade, podemos esperar que nessa condição, as possibilidades sejam maiores para que ocorram associações em busca de maior eficiência no aproveitamento dos poucos recursos disponíveis. Dessa forma, a possibilidade de ocorrerem associações positivas entre bactérias e plantas seria menor nos outros ambientes de coleta, uma vez que eles não apresentam solos de baixa fertilidade, pelo contrário, são de boa fertilidade. Outro fato que também serve de argumento é o tempo de uso do solo para o cultivo de cacau. Sendo assim, o maior tempo de uso do solo para o cultivo de cacau e a diversidade natural de microorganismo da região estariam contribuindo para uma maior possibilidade de se encontrar associações ou interações benéficas. Não se quer dizer aqui que já tenha ocorrido uma modificação evolucionária nas variedades de cacau cultivadas na EE-CEPLAC em favor do estabelecimento de uma associação simbiótica mutualística, contudo, há que se considerar o fato de que, segundo Guatrecasas (1964), a Amazônia e o centro de dispersão dessa cultura o que garante a possibilidade de que as variedades de *Theobroma cacao* L. possam ter desenvolvido interações ecológicas positivas com a microbiota da região. Embora não se tenha provas evidentes de uma coevolução entre plantas e bactérias, segundo Preston (1998) os estudos comparativos sobre genoma funcional indicam que os grupos de bactérias que se associam simbioticamente com plantas são geneticamente próximos aos fitopatogênicos, o que torna possível uma transição das espécies entre os grupos funcionais muito estreitamente dependente das condições nutricionais das plantas. Além disso, a diminuição do sistema radicular já foi apontado como um possível efeito do estabelecimento da associação entre planta, bactérias diazotróficas e micorrizas (Cardoso,

Freitas 1992). Levando em conta o que foi dito, há que se reconhecer uma falha de estratégia no procedimento adotado para esse ensaio. Talvez, tivesse sido mais interessante, a adoção de meios seletivos na primeira tentativa de isolamento. Por exemplo, a adoção de um meio sem uma fonte de nitrogênio poderia ter sido usado na seleção de isolados com capacidade de fixar nitrogênio. A possibilidade de ocorrência de bactérias diazotróficas na rizosfera do cacau não é remota.

Como já foi dito na descrição do procedimento experimental, por ocasião do isolamento, a escolha dos isolados foi feita apenas com base nas diferenças visualmente perceptíveis de cada colônia, sem qualquer outro critério, mesmo porque a aplicação de testes na fase de isolamento aumentaria os custos iniciais. Contudo, devem ser levados em conta outros aspectos relacionados ao procedimento adotado, os quais apontam para validade do mesmo. A idéia básica no momento da idealização dos ensaios para captura era a de se estabelecer um conjunto de procedimentos que garantissem a recuperação da maior diversidade possível. O primeiro fator adotado para esse fim foi a variação dos ambientes de coleta, o segundo, foi o processo de preparação do substrato, com e sem autoclavagem, e por fim, a variação dos meios de cultura. O aspecto visual da colônia serviu apenas como um critério para limitar o total de colônias a serem escolhidas. Nesse ponto, também há de se reconhecer uma falha. Pois se tivesse ocorrido uma descrição mais detalhada do aspecto visual de cada colônia acompanhada da frequência de cada uma, os dados gerados poderiam servir para dar uma idéia da diversidade encontrada em cada ecossistema. Um procedimento simples, mas que poderia ter um bom resultado. Contudo, o critério adotado pode ser considerado como válido, uma vez que o aspecto visual de uma colônia está relacionado com uma série de aspectos fisiológicos da bactéria e a composição do meio de cultivo. Não foi possível se achar detalhes sobre a seletividade dos meios utilizados a não ser as já mencionadas anteriormente.

3.2 ISOLADOS OBTIDOS COM O ENSAIO DE CAPTURA REALIZADO EM MANAUS

Com o ensaio de captura realizado em Manaus (E1/2004) foram obtidos apenas sessenta e cinco (65) isolados, apesar do número de tratamentos correspondentes às fontes de inóculos ter sido maior. Essa reduzida quantidade final de isolados está relacionada com o fato de ter sido usado apenas o meio TSA1/10 para cultura e se aplicado maior rigor na diferenciação do aspecto visual durante a escolha das colônias. Na tabela 3.6 estão apresentadas as quantidades de isolados obtidos em cada tratamento do ensaio de captura realizado em Manaus.

	MAN			PF1			PF2			IT1			IT2			IT1e2		
Condição do substrato ^{*1}	Na	a1	a2	na	a1	A2	na	a1	a2	na	a1	a2	na	a1	a2	na	a1	a2
Quantidade de isolados	3	5	3	5	2	2	5	2	1	4	3	3	4	4	5	5	3	6
Tot./solo	11			9			8			10			13			14		

Tabela 3.6. Quantidade de isolados obtidos a partir de raízes de mudas de cacaueteiro usadas no ensaio para captura de rizobactérias (E1/2004) realizado em Manaus usando diferentes substratos.

Obs: *1: As abreviaturas abaixo da designação dos tratamentos se referem às condições de preparação dos substratos onde as mudas de cacaueteiro foram cultivadas: **na**: substrato não autoclavado; **a1**: autoclavado uma vez; **a2**: autoclavado duas vezes. Os isolados foram obtidos a partir das raízes de mudas de cacaueteiro cultivadas em casa-de-vegetação em substratos formados com amostras de solos coletadas em Manaus – MAN, Presidente Figueiredo – PF1 e PF2, Itacoatiara – IT1, IT2, indicados na parte superior da tabela. Para mais detalhes sobre os procedimentos ver o item material e métodos.

O reduzido número de isolados obtidos nesse ensaio, de certo modo, reforça a indicação de que os procedimentos adotados no ensaio de captura realizado em Itajuípe (E1/2003) foram apropriados para ampliar a diversidade recuperada a partir das amostras de solo, levando-se em conta apenas o aspecto visual das colônias.

As quantidades de isolados, obtidos a partir dos diferentes substratos usando-se apenas o meio de cultura TSA, não se mostraram próximas para os dois ensaios (E1/2003 e E1/2004), quando são comparados nas mesmas condições de preparação e meio de cultura (Tabelas 3.1 e tabela 3.6). Isso pode estar relacionado a uma série de fatores que

condicionam a densidade da população bacteriana no solo. Por outro lado, também pode ter sido devido a um maior rigor durante a escolha das colônias no ensaio realizado em Manaus. Novamente se constata que a dificuldade para se estabelecer uma relação consistente entre os dois ensaios de captura decorre do simples fato de não se ter feito uma avaliação da densidade populacional. Além disso, não foi possível se estabelecer relações consistentes entre a variação do número de isolados obtidos com a variação da condição de autoclavagem adotadas nos dois ensaios. A maior dificuldade para se estabelecer tais relações também está associada ao fato de que, no ensaio E1/2003, não terem sido recuperados isolados das UE com substratos autoclavados formados a partir dos solos coletados em Manaus e Presidente Figueiredo. Relembrando que isso decorreu devido ao pouco desenvolvimento das plantas na ocasião do isolamento. Contudo, como um efeito resultante da autoclavagem dos substratos no ensaio E1/2004, nota-se a diminuição, mais acentuada, no número de isolados obtidos a partir das UE com os substratos de Presidente Figueiredo, e em menor intensidade, nas com o substrato de Manaus (Tabela 3.6). Muito provavelmente, o número reduzido de isolados recuperados a partir dos substratos MAN e os dois de Presidente Figueiredo autoclavados pode estar associado ao menor desenvolvimento das plantas. Na tabela 3.7 estão apresentados os valores médios das variáveis usadas para avaliar o desenvolvimento das plantas do ensaio de captura realizado em Manaus.

Mesmo se considerando que o menor desenvolvimento das plantas tenha afetado negativamente a diversidade de colônias recuperadas a partir das plantas cultivadas nos solos autoclavados de Manaus e Presidente Figueiredo, tal fato conspira contra a hipótese levantada anteriormente de que os solos de Presidente Figueiredo abrigariam uma população mais numerosa de bactérias termorresistentes. A contradição está nos padrões de

variação do número de isolados associada à autoclavagem dos substratos e ao tratamento térmico das suspensões.

Tratamentos	Altura		Folhas		Área		MSPA	
	Cm		Unidades		cm ²		g	
MAN	20,54	AB	6,00	AB	207,99	AB	1,10	AB
MNa1x	12,66	BC	4,20	AB	68,80	DE	0,45	DEF
MNa3x	10,38	C	3,00	B	56,50	E	0,52	CDEF
PF1	18,40	ABC	6,20	AB	174,35	ABCD	0,85	ABCDEF
PF1a1x	19,30	AB	6,40	A	189,60	ABC	1,00	ABCD
PF1a3x	14,50	ABC	4,20	AB	78,79	CDE	0,38	EF
PF2	19,14	AB	6,40	A	157,90	BCDE	0,80	BCDEF
PF2a1x	16,28	ABC	5,00	AB	119,64	BCDE	0,83	ABCDEF
PF2a3x	13,94	ABC	4,40	AB	73,71	CDE	0,33	F
IT1	19,60	AB	6,20	AB	213,46	AB	1,17	AB
IT1a1x	19,90	AB	6,60	A	232,59	AB	1,16	AB
IT1a3x	19,78	AB	7,00	A	218,20	AB	1,09	AB
IT2	21,36	A	7,00	A	280,55	A	1,38	A
IT2a1x	20,30	AB	6,60	A	239,06	AB	1,21	AB
IT2a3x	18,94	AB	5,80	AB	191,01	ABC	0,99	ABCD
IT1&IT2	18,74	AB	6,60	A	243,29	AB	0,92	ABCDE
IT1&IT2a1x	18,16	ABC	6,00	AB	212,96	AB	1,01	ABC
IT1&IT2a3x	17,12	ABC	6,40	A	174,06	ABCDE	0,85	ABCDEF

Tabela 3.7. Valores médios das variáveis adotadas para acompanhar o desenvolvimento das unidades experimentais no ensaio de captura (E1/2004) realizado em Manaus.

OBS. Mudanças de cacaueteiro cultivadas em casa-de-vegetação, por um período de 80 DAT, em diferentes substratos formados a partir de solos coletados em Manaus (MAN), Presidente Figueiredo (PF) e Itacoatiara (IT). Médias seguidas de mesma letra não possuem diferença significativa pelo teste Tukey (0,5%) das demais em uma mesma coluna. Legenda: Alt.: altura; MFT: Massa Fresca Total; MFPA: Massa Fresca da Parte Aérea; MFSR: Massa Fresca do Sistema Radicular; NFP: Número de Folhas por Planta; MSPA: Massa Seca da Parte Aérea; MSSR: Massa Seca do Sistema Radicular.

No ensaio E1/2003 realizado em Itajuípe, conforme já foi destacado anteriormente, o resultado obtido com o tratamento térmico das suspensões estaria indicando a

predominância de isolados termorresistentes nos solos de Presidente Figueiredo, portanto, era de se esperar que com a seqüência de autoclavagem dos substratos feitas no ensaio E1/2004, fosse obtido, pelo menos, um número semelhante ao recuperado a partir das UE com substrato não autoclavado, e não uma diminuição. Não foi possível fazer a comparação do número de isolados obtidos a partir dos solos autoclavados de PF1 e PF2, no ensaio E1/2003, com o número de isolados obtidos no ensaio E1/2004, devido ao não isolamento a partir das mudas desses dois tratamentos em questão no ensaio E1/2003. No entanto, o padrão de variação do número de isolados obtidos a partir dos diferentes substratos que sofreram autoclavagem no ensaio realizado em Manaus (E1/2004) contradiz o padrão observado no E1/2003 uma vez que, ao contrário do esperado, houve diminuição acentuada do número de isolados obtidos a partir das UE de PF1 e PF2 autoclavados, ao mesmo tempo, se observa manutenção ou leve elevação para os demais substratos autoclavados (Tabela 3.6). Contudo, explica-se essa diminuição, atribuindo-se existir relação entre o reduzido número de isolados recuperados e crescimento das mudas, a qual fica reforçada, pelo fato do número de isolados recuperados ter aumentado com a autoclavagem dos substratos IT2 e IT1&IT2 (Tabela 3.6), os quais apresentaram melhor desenvolvimento das plantas e maior número de isolados recuperados. Devendo ser ressaltado que o rigor aplicado na escolha dos isolados no ensaio E1/2004, embora tenha sido subjetivo, foi o mesmo para todos os tratamentos. Outro fator a ser considerado é a possível colonização por bactérias do ambiente. Por terem sido cultivadas em ambientes não controlados de casa-de-vegetação, é possível que parte dos isolados obtidos tenha sido originado da colonização do substrato autoclavado por bactérias locais. Não foi possível se verificar se isso de fato ocorreu ou não, pois isso necessitaria de pelo menos uma caracterização que permitisse uma comparação entre os grupos.

O fato das plantas terem se desenvolvido menos, no ensaio realizado em Manaus, pode realmente ter limitado o crescimento da população de rizobactérias, pois um dos fatores limitantes ao crescimento da população de bactérias no solo é a disponibilidade de fontes de carboidratos (Cardoso 1992; Cardoso & Freitas 1992). Uma idéia da disponibilidade de carbono em cada um dos substratos usados no ensaio E1/2004 pode ser feita a partir dos teores de matéria orgânica (MO) obtidos com as análises químicas apresentadas na tabela 3.8.

Amostras	PH*1	Ca ⁺²	Mg ⁺²	Al ⁺³	(H+Al)	P	K	MO
						(mg.Kg ⁻¹)		(%)
		*2(cmol _c kg ⁻¹)						
MAN	4,47 K	0,38 E	1,08 ABCDE	0,28 D	4,82 AB	1,00 D	32,67 B	23,27 ABCD
MNa1x	5,20 FG	0,40 E	1,10 ABCDE	0,25 D	4,26 B	1,00 D	31,33 B	21,51 ABCD
MNa3x	5,36 EF	0,38 E	0,93 BCDE	0,23 D	4,78 AB	1,00 D	32,67 B	24,12 ABCD
PF1	4,38 K	0,50 E	0,77 DE	0,48 AB	5,78 A	1,00 D	18,67 B	29,55 A
PF1a1x	4,59 JK	0,45 E	0,90 BCDE	0,42 BC	5,17 AB	1,00 D	14,00 B	26,73 ABC
PF1a3x	4,70 J	0,23 E	1,03 ABCDE	0,38 C	5,11 AB	1,00 D	34,00 B	27,28 AB
PF2	4,75 IJ	0,18 E	0,75 DE	0,55 A	4,86 AB	1,00 D	17,33 B	23,25 ABCD
PF2a1x	4,94 HI	0,27 E	0,53 E	0,43 BC	4,23 B	1,00 D	8,00 B	24,77 ABCD
PF2a3x	5,01 GH	0,30 E	0,48 E	0,48 AB	4,62 AB	1,00 D	15,33 B	23,90 ABCD
IT1	5,46 E	2,82 D	1,30 ABCD	0,00 E	1,54 C	33,33 BC	33,33 B	13,69 D
IT1a1x	5,80 D	2,90 D	1,48 AB	0,00 E	1,26 C	31,67 BC	38,00 B	14,12 CD
IT1a3x	5,98 CD	2,95 D	1,50 AB	0,00 E	1,15 C	33,67 BC	39,00 B	15,64 BCD
IT2	6,31 AB	3,80 BC	1,67 A	0,00 E	1,10 C	29,67 C	32,00 B	22,16 ABCD
IT2a1x	6,36 AB	3,90 BC	1,47 ABC	0,00 E	1,26 C	31,33 BC	33,33 B	18,47 ABCD
IT2a3x	6,47 A	4,10 BC	1,50 AB	0,00 E	0,95 C	35,33 B	31,00 B	19,22 ABCD
IT1&IT2	5,99 CD	5,05 A	0,80 CDE	0,00 E	1,04 C	62,00 A	96,00 A	15,97 BCD
IT1&IT2a1x	6,15 BC	3,70 C	1,15 ABCDE	0,00 E	1,23 C	62,33 A	97,33 A	16,08 BCD
IT1&IT2a3x	6,24 B	4,30 B	1,08 ABCDE	0,00 E	0,99 C	66,33 A	98,00 A	18,25 ABCD

Tabela 3.8. Resultado das análises químicas dos substratos usados em cada tratamento do ensaio para captura de rizobactérias realizado em Manaus.

OBS. Substratos formados a partir de amostras de solos coletados em Manaus (MAN), Presidente Figueiredo (PF) e Itacoatiara (IT), usados no cultivo de mudas de cacau em casa-de-vegetação por oitenta dias. Todas análises foram feitas seguindo-se os procedimentos determinados por EMBRAPA (1999); *1: pH em água; *2: cmol_c kg⁻¹ (centimol de carga por kg de substrato); MO: Matéria orgânica. Cada valor corresponde a uma média dos resultados das análises de 3 amostras simples de cada tratamento. Médias seguidas de mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste Tukey (0,5%) das demais em uma mesma coluna.

A maior quantidade inicial de carbono em cada substrato autoclavado estaria favorecendo a colonização por grupos oportunista de fácil dispersão e crescimento rápido. Isso deveria ter como consequência uma menor diversidade recuperada. Em termos

absolutos, o substrato não autoclavado que apresentou maior teor de matéria orgânica (MO) foi PF1, enquanto o menor foi IT1. Os demais, MAN, PF2 e IT2, apresentaram valores intermediários muito próximos um dos outros e considerados como estatisticamente semelhantes entre si. Embora não seja possível se estabelecer uma relação consistente, em primeira análise, ao contrário do que se esperava, a diversidade encontrada no E1/2004 parece estar associada aos substratos não autoclavados que apresentaram maiores teores de MO (tabelas 3.6 e 3.8). No entanto, ao se considerar o fato de que não houve efeito significativo da autoclavagem sobre o teor de MO dos substratos, pode se dizer que os com maiores teores de MO (PF1 – 29,55%, MAN – 23,27% e PF2 – 23,25%) apresentaram diminuição na diversidade recuperada em consequência da autoclavagem, ou seja, realmente a maior disponibilidade inicial de MO nos substratos autoclavados estaria favorecendo muito mais um grupo de bactérias, aqueles com maior habilidade para aproveitar os recursos disponíveis, e com isso diminuindo a diversidade. O fenômeno da diminuição da diversidade em consequência de alguma perturbação já foi muito bem tratado por vários autores (ZAK, 1992; DIX, 1995). Deve ser considerado também, o fato de que o isolamento foi feito quarenta e cinco dias após o transplante (45 DAT), um tempo razoável, mas que não permitiria o estabelecimento de um equilíbrio dinâmico. Vale salientar ainda, que na preparação dos substratos não autoclavados ocorreu apenas uma diluição da população bacteriana inicial pela adição de areia autoclavada, o que pode ser considerado como uma alteração bem menos drástica do que a autoclavagem. Dessa forma a estrutura funcional inicial ainda poderia ter sido, em parte, preservada nas amostras não autoclavadas. Portanto, teoricamente, a diversidade recuperada nos tratamentos não autoclavados deveria ser realmente maior do que a obtida com os substratos autoclavados, mesmo quando se comparasse amostras com baixos teores de MO, não autoclavadas, com amostras com maiores teores de MO, autoclavadas. No entanto, esse padrão não ocorreu

para os substratos MAN, IT2 e IT1&2, nos quais observou-se um número maior de isolados recuperados em pelo menos uma das duas condições de autoclavagem, em comparação à condição não autoclavado. Uma possível explicação para isso poderia ser atribuída ao desenvolvimento das plantas, no entanto os tratamentos que apresentaram maior desenvolvimento das plantas cultivadas em substrato autoclavado do que as cultivadas no não autoclavado foram IT1 e PF1 (tabela 3.7), justamente onde foram observadas diminuições do número de isolados recuperados ao se comparar não autoclavadas com autoclavadas.

A análise dos efeitos dos tratamentos sobre o crescimento e o estado nutricional das UE usadas nos ensaios para captura realizado em Manaus, também só será feita mais adiante no item 3.2.

3.3 ANÁLISE DOS EFEITOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DAS PLANTAS DURANTE OS ENSAIOS DE CAPTURA

De acordo com os resultados da análise estatística dos dados sobre desenvolvimento das plantas, obtidos com os ensaios de captura realizados em Itajuípe, (Tabela 3.5) e Manaus (Tabela 3.7), houve diferença estatisticamente significativa entre as médias dos tratamentos nos dois ensaios. Os efeitos sobre o desenvolvimento das plantas podem ser explicados em primeiro lugar pelas condições de fertilidade de cada substrato (tabela 3.8), isso inclui disponibilidade de nutrientes e condições de acidez. Levando-se em conta os resultados da análise química dos substratos apresentados na tabela 3.8 e as recomendações feitas por Silva Neto *et al.* (2001) – 0,3 de fósforo (P), 1,2 de potássio (K) – ambos em mg/kg; 5, 75 de cálcio (Ca), 2,75 de magnésio (Mg) – em cmol/kg, para fase de viveiro – pode se dizer que as melhores condições para o cultivo, entre os substratos que não sofreram autoclavagem no ensaio E1/2004, estavam no tratamento IT2 (tabela 3.8),

enquanto as menos recomendadas, no tratamento MAN. Deve ser observado que autor mencionado não estabelece limites de pH, mas menciona a falta de resposta da planta à correções, contudo, é possível se deduzir que o pH possa oscilar entre 5,5 a 6,0, dependendo do teor de Al. Se for alto o teor de Al no solo for alto, o pH deve ser mantido mais alto, pois o Al, quando presente, torna o solo ácido, deixando o pH mais baixo. Quanto ao ensaio E1/2003, podemos inferir que as duas respectivas condições de fertilidade se encontravam nos substratos ITA e MAN. O teste de comparação de médias mostra que ocorreu um efeito diferenciado da autoclavagem entre os substratos somente para as variáveis pH em água, teores de Ca^{+2} , Al^{+3} e P. Não ocorrendo efeito nas demais variáveis (teores de Mg^{+2} e K, acidez total e porcentagem de matéria orgânica). É importante salientar que devem ser levados em conta os aspectos de fertilidade e da nutrição mineral das plantas, uma vez que, o desenvolvimento vegetal está condicionado diretamente a eles. E como já foi dito por Cardoso e Freitas (1992), o aproveitamento dos microorganismos da rizosfera para fins biotecnológicos aplicados à agricultura depende de uma interação entre várias áreas do conhecimento. Além disso, na essência, a opção por fazer o isolamento, priorizando plantas com o melhor desenvolvimento, foi tomada buscando-se encontrar uma situação onde estivesse ocorrendo um melhor aproveitamento de nutrientes em pró do desenvolvimento, o que poderia ser decorrente da interação entre a planta e bactérias. Para isso, foi necessário se analisar o estado nutricional da planta e a condição de fertilidade dos substratos.

A autoclavagem pode afetar a disponibilidade de nutrientes nos substratos, como por exemplo, aumentar a disponibilidade de manganês (Mn^{+2}) tornando-o tóxico. Embora não tenha sido feita análise de Mn nos substratos usados nos dois ensaios (E1/2003 e E1/2004), é bem possível que tenha ocorrido elevação do teor de Mn nos substratos autoclavados. A dedução disso se baseia no fato de que houve variação significativa de pH

com a autoclavagem para maioria dos substratos (tabela 3.8), ao mesmo tempo em que ocorreu variação do teor de Al disponível apenas para os substratos PF1 e PF2. Entre as variáveis analisadas, MO e teor de Al disponível são as que poderiam alterar o pH. Como não houve variação significativa de MO e sim apenas variação de Al para os dois tratamentos mencionados, é possível que a alteração de pH observada esteja relacionada, nesse caso, com maior teor de Mn^{+2} . Os dois substratos, que apresentaram maiores teores de Al, são os que apresentam menores valores de pH – maior acidez. Portanto, isso não exclui a possibilidade de que o Mn seja a causa desse efeito sobre o pH.

Na tabela 4.9 estão os resultados das análises químicas do tecido vegetal para macronutrientes, e na tabela 4.10 para micronutrientes. Como não foi possível a análise detalhada dos substratos, também não é possível se afirmar com certeza de que ocorreu liberação de Mn devido a autoclavagem dos substratos. Como não houve diferença significativa entre os tratamentos ao se comparar os valores das variáveis usadas para diagnosticar o estado nutricional de plantas, e nem tão pouco foi possível se fazer uma análise completa dos teores de nutrientes no solo, como já foi dito, isso não tornou possível uma análise mais detalhada do estado nutricional das plantas, mesmo porque, há uma carência de literatura que trate sobre a eficiência de uso de nutrientes pelo cacauzeiro. Contudo, é possível se constatar, que as plantas cultivadas nos substratos com melhor condição de fertilidade (IT2) apresentaram os maiores valores para as variáveis diagnósticas do desenvolvimento vegetal, e que, pela comparação dos valores de elementos disponíveis no solo (tabela 3.8), variáveis de desenvolvimento (tabela 3.7) e conteúdo de nutrientes no tecido vegetal (tabelas 3.9 e 3.10) apresentados pelos tratamentos MAN e IT1 em relação aos demais, aparentemente, é nessas duas condições que se encontram os exemplos de maior eficiência de aproveitamento de nutrientes pelas plantas. Talvez, o menor aproveitamento nas UE de PF1 e PF2 esteja associado ao efeito tóxico do Al, o qual

causa, entre outras conseqüências, o encurtamento do sistema radicular da maioria das plantas diminuindo a capacidade de absorção de nutrientes. Além disso, se observa que os teores de P, K, Ca e Mg ficaram abaixo do recomendado por Silva Neto *et al.* (2001)

Amostras	N	P	K	Ca	Mg	S
	----- (g/kg) -----					
MAN	18,803	2,153	7,407	5,410	3,580	1,037
MNa1x	27,797	4,423	11,403	1,850	3,240	2,130
MNa3x	23,459	3,949	8,409	2,722	3,584	2,350
PF1	21,183	2,520	7,320	7,230	2,077	1,437
PF1a1x	20,070	2,147	7,583	5,560	2,237	1,660
PF1a3x	27,898	4,305	11,233	3,692	2,367	2,212
PF2	20,690	2,490	7,480	6,420	2,313	1,150
PF2a1x	24,220	3,060	7,657	3,920	2,323	1,703
PF2a3x	30,872	4,776	12,359	2,824	2,469	2,325
IT1	18,040	1,990	10,113	7,080	4,047	1,347
IT1a1x	19,433	2,380	10,693	5,710	4,250	1,660
IT1a3x	19,843	2,352	11,327	6,158	4,070	2,028
IT2	20,303	2,157	8,753	7,100	4,577	1,330
IT2a1x	20,503	2,133	9,273	7,390	4,890	1,720
IT2a3x	20,393	2,295	9,795	6,662	4,486	1,716
IT1&IT2	20,887	2,247	11,277	7,890	4,817	1,887
IT1&IT2a1x	22,773	2,763	12,763	6,210	4,673	2,010
IT1&IT2a3x	21,423	2,825	12,381	6,594	4,503	2,026

Tabela 3.9. Teores médios de macronutrientes na parte aérea das plantas cultivadas no ensaio E1/2004.

Obs.: Médias obtidas a partir de três repetições de análise do material resultante da combinação das plantas de um mesmo tratamento.

Embora não se tenha encontrado estudos sobre a eficiência de aproveitamento de nutrientes por plantas de cacau, foram levadas em conta as informações de fisiologia do crescimento apresentadas por Marengo e Lopes (2005).

Amostras	Cu	Fe	Mn	Zn
	-----(g/kg)-----			
MAN	10,733	106,100	146,000	27,467
MNa1x	23,667	152,733	152,667	43,967
MNa3x	19,173	119,227	270,533	40,233
PF1	11,033	266,033	163,000	29,267
PF1a1x	9,667	198,200	187,667	26,667
PF1a3x	21,733	394,840	99,533	43,333
PF2	9,767	120,833	174,000	30,033
PF2a1x	13,167	150,467	179,667	33,600
PF2a3x	24,033	306,573	110,333	41,080
IT1	9,567	147,867	96,333	28,667
IT1a1x	10,633	175,000	785,333	25,300
IT1a3x	10,127	167,360	1122,667	33,530
IT2	9,800	129,600	89,667	26,900
IT2a1x	10,933	182,823	353,000	29,600
IT2a3x	12,147	167,205	902,200	25,920
IT1&IT2	11,733	194,533	100,000	30,700
IT1&IT2a1x	15,000	160,200	277,667	33,400
IT1&IT2a3x	12,720	247,640	894,333	29,720

Tabela 3.10. Teores médios de micronutrientes na parte aérea das plantas cultivadas no ensaio E1/2004.

Obs.: Médias obtidas a partir de três repetições de análise em material resultante da combinação das plantas de um mesmo tratamento.

A eficiência de crescimento (YG) é comumente expressa em gramas de carbono incorporado no novo tecido (biomassa) por grama de carbono usado no processo (MARENCO, LOPES, 2005). Segundo os mesmos autores, os custos de construção variam em função da composição do tecido vegetal e de uma série de fatores que afetam tanto a respiração de manutenção (RM) quanto a respiração de crescimento (RG). Como todas as características fisiológicas, estas também são determinadas geneticamente, portanto, em uma situação ideal de substrato para uma determinada planta, seu crescimento está limitado geneticamente. No entanto, a interação planta-microrganismo, altera vários parâmetros fisiológicos relacionados ao crescimento (JACKSON, TAYLOR, 1996).

Micorriza por exemplo alteram a cinética de absorção de P e vários parâmetros fisiológicos de citrus (SENA, 1998), e a fixação simbiótica de nitrogênio está condicionada pelo custo de absorção do N a partir do solo e pelos custos de manutenção da simbiose. Isso tudo mostra que a identificação de uma situação onde esteja ocorrendo maior eficiência de aproveitamento de nutrientes, em decorrência de uma possível interação entre planta-bactéria, depende do acompanhamento de um maior número de variáveis, principalmente fisiológicas. Nesse trabalho não foi possível a medição de variáveis fisiológicas, o que permitiria uma análise mais detalhada e permitisse a identificação da situação procurada.

3.3 ISOLADOS PRÉ-SELECIONADOS NOS ENSAIOS DE BANCADA

3.3.1 ISOLADOS PRODUTORES DE AIA

Ao final dos ensaios de bancada, feitos com os 175 isolados obtidos no primeiro ensaio de isolamento E1/2003 mais os outros 49 isolados obtidos com o ensaio E2/2003, realizados em Itajuípe, foi possível se obter seis (06) produtores de AIA. No entanto, com a aplicação do mesmo teste realizado nos isolados obtidos com o ensaio de captura realizado em Manaus (E1/2004) não foi possível identificar isolados produtores de AIA. Na tabela 3.11 estão apresentadas as origens dos respectivos isolados identificados como produtores de AIA.

Isolado	Ensaio	Solo de origem	Meio de cultura de origem
002	E1/2003	PF1 não autoclavado	King
014	E1/2003	PF1 não autoclavado	King
039	E1/2003	ITA não autoclavado	TSA
042	E1/2003	ITA não autoclavado	TSA
080	E1/2003	ITA não autoclavado	K523
092	E1/2003	ITA autoclavado	K523

Tabela 3.11. Relação dos isolados identificados como produtores de AIA e respectivas origens.

A quantidade de isolados produtores de AIA encontrados não parece estar condicionada a nenhum meio de cultura ou substrato. Mello *et al.* (2002) não encontraram nenhum isolado com essa característica entre dezenove testados. No entanto, vale se observado que todos os isolados testados pelos referidos autores foram originados da parte aérea e não do solo, como foram os testados nesse trabalho. Levando esse fato em conta, a única inferência que se pode fazer é a de que, no solo, a probabilidade de se encontrar bactérias produtoras de AIA é maior, o que está de acordo com o fato do solo ser o reservatório da maior diversidade de bactérias (BRANDÃO, 1992).

3.3.2 ISOLADOS PRODUTORES DE QUITINASES

A realização do ensaio de bancada para identificar isolados quitinolítico se justificou pelo fato da atividade de quitinases, segundo vários autores está relacionada com respostas de defesa da planta contra fungos deletérios ao crescimento das plantas (Lambais, 1996; Enebak *et al.*, 1998). Ao final foram diferenciados os seguintes padrões de comportamento dos isolados testados: a) Isolados que cresceram e formaram halo claro bem característico da degradação de quitina: 001, 015, 016, 017, 018, 090, 113, 140, 141, 142, 146, 148, 156, 176, 179, 180, 181 e 196 (18 isolados); b) Isolados que cresceram bastante, mas não formaram halo claro característico da degradação de quitina: 005, 006, 007, 009, 010, 011, 013, 014, 030, 051, 088, 091, 092, 094 e 100 (15 isolados); c) Isolados que cresceram moderadamente e não formaram halo característico da degradação de quitina: (vários).

Na tabela 3.12 estão relacionados os dezoito isolados de bactérias identificadas como quitinolíticas com respectivos meios de isolamento e substrato de origem

Isolado	Ensaio	Solo de origem	Meio de cultura do isolamento
001	E1/2003	PF1 não autoclavado	King
015	E1/2003	PF2 não autoclavado	King
016	E1/2003	PF2 não autoclavado	King
017	E1/2003	PF2 não autoclavado	King
018	E1/2003	PF2 não autoclavado	King
090	E1/2003	ITA não autoclavado	K523
113	E1/2003	MAN não autoclavado	AN
140	E1/2003	MAN não autoclavado	ANtt
141	E1/2003	MAN não autoclavado	ANtt
142	E1/2003	MAN não autoclavado	ANtt
146	E1/2003	PF1 não autoclavado	ANtt
148	E1/2003	PF1 não autoclavado	ANtt
156	E1/2003	PF2 não autoclavado	ANtt
176	E2/2003	MAN	K523
179	E2/2003	MAN	K523
180	E2/2003	MAN	AN
181	E2/2003	MAN	NA
196	E2/2003	PF2	King

Tabela 3.12. Relação dos isolados identificados como quitinolíticos nos testes de bancada.

Obs. Os isolados foram obtidos a partir de raízes de mudas de cacau cultivadas em casa-de-vegetação em substratos formados a partir de amostras de solo coletadas em Manaus (MAN), Presidente Figueiredo (PF1 e PF2) e Itacoatiara (IT1 e IT2). O meio de cultura usado foi TSA. Para mais detalhes vide a descrição do procedimento experimental.

3.3.3 ISOLADOS SOLUBILIZADORES DE FOSFATO

Como resultado dos testes para identificar bactérias solubilizadoras de fosfatos foram obtidos sete (07) isolados, cujos códigos de identificação estão listados na tabela 3.13 com seus respectivos substratos de origem. Esses isolados foram obtidos a partir das condições sumariamente descritas na tabela 3.13 Todos eles foram obtidos a partir do ensaio de captura realizado em Manaus.

Isolado	Ensaio	Tratamento de origem
001	E1/2004	MAN não autoclavado
003	E1/2004	MAN não autoclavado
009	E1/2004	MANa2
016	E1/2004	PF1 não autoclavado
022	E1/2004	PF2 não autoclavado
035	E1/2004	IT1a1
063	E1/2004	IT1& IT2a2

Tabela 3.13 Relação dos isolados identificados como solubilizadores de fosfato e respectivas origens.

Obs. Os isolados foram obtidos a partir de raízes de mudas de cacau cultivadas em casa-de-vegetação em substratos formados a partir de amostras de solo coletadas em Manaus (MAN), Presidente Figueiredo (PF1 e PF2) e Itacoatiara (IT1 e IT2). O meio de cultura usado foi TSA. Para mais detalhes vide a descrição do procedimento experimental.

3.4 EFEITO DA INOCULAÇÃO DOS ISOLADOS PRÉ-SELECIONADOS SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE MUDAS DE CACAUEIRO.

Conforme já foi dito no item material e métodos, nos dois ensaios para se avaliar os efeitos sobre as plantas foram usados onze isolados escolhidos entre aqueles obtidos a partir do substrato ITAa, no ensaio E1/2003. Aqui são apresentados os valores obtidos com as medições de altura das plantas. Na tabela 3.14 estão representados os valores médios da variável altura das plantas obtidos com o ensaio para avaliar o efeito sobre o desenvolvimento das plantas.

Devido ao fato de não ter sido observada diferença estatística significativa superior a dez por cento (10%) entre as alturas das plantas, ao final do período de cultivo dos dois experimentos, não foi feita a avaliação da biomassa.

4 CONCLUSÃO

Nenhum dos isolados testados causou efeito de promoção de crescimento superior a dez por cento em relação às mudas produzidas sem inoculação, nem aqueles identificados como solubilizadores de fosfato, quitinolíticos ou produtores de ácido indolacético, demonstrando assim que essas características por si só não são suficientes para identificarem bactérias com capacidade para promover o crescimento vegetal, uma vez que o crescimento vegetal é um processo complexo que depende de um grande número de variáveis. Considerando o fato de que o nitrogênio e o fósforo são os dois elementos de maior importância para as plantas cultivadas, é fundamental que os trabalhos de busca por bactérias promotoras de crescimento incluam a identificação de bactérias diazotróficas e das que de alguma forma possam afetar positivamente o uso do fósforo pela planta, incluindo as solubilizadoras de fosfatos. A supressão dos efeitos deletérios de patógenos por bactérias produtoras de antibióticos é muito citada na literatura como relacionada à promoção do crescimento, mas isso não deveria ser caracterizado como promoção do crescimento, uma vez que a supressão de patógenos é apenas a reversão de uma situação que não é a padrão no cultivo de mudas, no entanto, a produção de substâncias quelantes de íons metálicos que atuam na planta como micronutrientes pode estar relacionada com a promoção de crescimento, pois a liberação dessas substâncias na rizosfera pode facilitar a absorção desses micronutrientes pela planta, portanto, a identificação de bactérias com a capacidade de produzir substâncias quelantes, também deve ser incluída em trabalhos de prospecção como esse.

O uso das mudas de cacaueteiro para captura de rizobactérias promotoras de crescimento pode ser usado como estratégia eficiente na busca de bactérias promotoras do crescimento com afinidade para com a planta, e o conjunto de variáveis de desenvolvimento aqui adotadas também pode ser considerado adequado para identificação

da situação de cultivo na qual a plantas se apresentou em condição de melhor aproveitamento dos nutrientes do que plantas não inoculadas, no entanto, a identificação de tal situação pode ser complementada com o monitoramento de variáveis mais relacionadas com a fisiologia da plantas, como por exemplo, eficiência respiratória, pois com isso também seria possível avaliar efeitos de substâncias estimulantes ou atuação de hormônios vegetais.

A diversificação dos meios de cultura é de fundamental importância para se aumentar a diversidade de bactérias a serem recuperadas em um trabalho de prospecção.

5. BIBLIOGRAFIA

ARAÚJO, Welington Luiz de *et al.* Manual: isolamento de microrganismos endofíticos. Piracicaba: CALQ, 2002, 86p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CHOCOLATE, CACAU, BALAS E DERIVADOS – ABICAB. Estatísticas. Apresenta dados sobre produção e consumo de chocolate. Disponível em: <http://www.abicab.org.br/index_home.htm>. Acesso em: 11 março 2007.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant-growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology and Biochemistry*, London, v.30, n.8 p.1225-1228, 1998.

BASHAN, Y., LEVANON, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as challenge for agriculture. *Canadian Journal of Microbiology*, v.36, p.591-608, 1990.

BEEVER, R.E.; BOLLARD, E.G. The nature of the stimulation of fungal growth by potato extract, *Journal of General Microbiology*, v.60, p.273, 1970.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; ROMEIRO, R. S.; MIZUBUTI, E. S. G. Métodos de Isolamento de Bactérias do Filoplano de Tomateiro Visando Populações Específicas e Implicações como Agentes de Biocontrole. *Fitopatologia brasileira*, v.29, n.6, p.638-643, 2004

BEYLER, M.; KEEL, C.; MICHAUX, P.; HAAS, D. Enhanced production of índole-3-acetic acid by genetically modified strain of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 affect root growth of cucumber, but does not improve protection of the plant against *Pythium* root rot. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 28, p.225-233, 1999.

BIAGI, C.M.R. de; AZEVEDO, J.L. de. Detection of bacteriocins produced by plant pathogenic bacteria from the genera *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Sci. agric.*, Piracicaba, v. 49, n. spe, 1992. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-

90161992000400002&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 28 Feb 2007. Pré-publicação. doi: 10.1590/S0103-90161992000400002

BRANDÃO, Edgar M. Os componentes da comunidade microbiana do solo. In: CARDOSO, E.J.B.N.; Tsai, S.M; Neves, M.C.P. Microbiologia do solo. Campinas: SBCS, 1992, 360p. Cap.1 p.1-15.

BRIC, J.M., BOSTOCK, R.M. AND SILVERSTONE, S.E. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. Appl. Environ. Microbiology, v. 57, p.535-538, 1991.

BUENO, M. A vassoura-de-bruxa com os dias contados. Agroanalysis (Brasil), v. 21, n.9, p. 67-72, set 2001.

CARDOSO, Elke J.B.Nogueira Ecologia Microbiana In: CARDOSO, E.J.B.N.; Tsai, S.M; Neves, M.C.P. Microbiologia do solo. Campinas: SBCS, 1992, 360p. Cap.3 p.33-39.

CARDOSO, Elke Jurandir B. .Nogueira; FREITAS, Sueli S. A rizosfera. In: CARDOSO, E.J.B.N.; Tsai, S.M; Neves, M.C.P. Microbiologia do solo. Campinas: SBCS, 1992, 360p. Cap.4 p.41-30.

CATTELAN, *et al.* Screening For Rhizobacteria To Promote Early Soybean Growth. Soil Sci. Soc. Am. J., v.63, p.1670–1680, nov./dez. 1999.

CAVALCANTE, P. B. Frutas Comestíveis da Amazônia. 5ed. Belém: CEJUP; Brasília: CNPQ-Museu Emílio Goeldi, 1991, 279p.

CHEN, Y. *et al.* The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in Chinese agriculture. In: UTKHEDE, R.S.; GUPTA, V.K. Management of soil borne diseases. New Delhi: Kalyani publishers, 1996. Cap. 8, p.164-184.

CONSELHO ADMINISTRATIVO DE DEFESA ECONÔMICA – CADE. Ato de Concentração nº 08012.001697/2002-89. Determina desconstituição da operação e aprovava com restrições. Disponível em:

<http://www.cade.gov.br/atas/arquivosPDF/ata312.asp>. 2004. Acesso em 11 março 2007.

- CORAL, F.J. Ecofisiologia do cacauero. In: Ecofisiologia da Produção Agrícola. Piracicaba: Ceres, 1987, p.231-238.
- COSTACURTA, A.; VANDERLEYDEN, J. Synthesis of phytohormones by plants-associated bacteria. *Critical Review of Microbiology*, v. 21, p. 1-18, 1995.
- DAYMOND, A.J; HADLEY, P. The effects of temperature and light integral on early vegetative growth and chlorophyll fluorescence of four contrasting genotypes of cacao (*Theobroma cacao*) *Annals of Applied Biology* v.145, n.3 , 257–262, 2004
- DIX, N.J. Fungal ecology. London: Chapman & Hall, 1995, 549p.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Manual de Análises Químicas de Solos, Plantas e Fertilizantes. Brasília: Embrapa Solos, 1999, 370p.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. 2.ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006, 306p.
- ENEBAK, S.A.; WEI, G.; KLOPPER, J.W. Effects of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Loblolly and Slash Pine seedlings. *Forest Science* v.44, n.1, p.139, 1998.
- FETT, W.F.; OSMAN, S.F.; DUNN, M.F. Auxin production by plant-pathogenic pseudomonads and xanthomonads. *Applied Environmental Microbiology*
- FIGUEIRA, A.; JANICK, J.; LEVY, M; GOLDSBROUG, P Reexamining the classification of *Theobroma cacao* L. using molecular markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* v.119, n.5, p.1073-1082, 1994.
- GAGNE, S. *et al.* Increase of greenhouse tomato fruit yields by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) inoculated into the peat-based growing media. *Soil Biology and Biochemistry*, v.25, n,2, p.269-272, 1993.
- GUATRECASAS José. Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. Washington: Smithsonian Institution, 1964, p.379-614.

GLICK, B.R.; PENROSE, D.M.; LI, J. A model for the lowering of plant ethylene concentration by plant growth-promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology*, v.190, n.1, p.63-68, 1998.

GLICKMANN, E.; GARDAN, L.; JAQUET, S.; ELASRI, M. O.; PETIT, A.; DESSAUX, Y. Auxin production is a common feature of most pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, v. 11, p. 156-162, 1998.

HALFELD-VIEIRA, Bernardo A.; ROMEIRO, Reginaldo S.; MIZUBUTI, Eduardo S.G.. Isolation methods of tomato phylloplane bacteria aiming specific populations and implications as biocontrol agents. *Fitopatol. bras.*, Brasília, v. 29, n. 6, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-41582004000600007&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 28 Feb 2007. Pré-publicação. doi: 10.1590/S0100-41582004000600007

HAWKEY, P. M.; MCCORMICK, A.; SIMPSON R.A. Selective and differential medium for the primary isolation of members of the Proteaceae. *J. Clin. Microbiol.* v.23, n.3, p.600-603, 1986

HOLL, F.B.; CHANWAY, C.P. Rhizosphere colonization and seedling growth promotion of lodgepole pine by *Bacillus polymyxa*. *Canadian Journal of Microbiology*, v.38, p.303-308, 1992.

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. ed. Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Brasília: Embrapa, 1994, 524p.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Mapa de solos do Brasil. Rio de Janeiro: IBGE CNPS/Embrapa, 2001. 1 mapa:88 x 107 cm. Escala: 1:5.000.000.

INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION – ICCO, Quarterly Bulletin Cocoa Statistics 2005/06. London: ICCO, v.32, n.2, 2007A.

INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION – ICCO. Review of the cocoa market situation. London: ICCO, 2006, 13p. Disponível em: <<http://www.icco.org/documents/publications.aspx>> Acessado em 12 março 2007.

INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION – ICCO: Annual Report 2005/06.
London: ICCO, 2007A, 43p. Disponível em:
<<http://www.icco.org/documents/publications.aspx>> Acessado em 12 março 2007.

INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION – ICCO: The Manufacturing
Confectioner, v. 78, n.2, p31-38, 1998.

INTERNATIONAL COCOA ORGANIZATION – ICCO. The world cocoa market: An
analysis of recent trends and of prospects to the year 2000. London: ICCO, 1993, 29p.

JACKSON, Andrew O.; TAYLOR, Crispin B. Plant-Microbe interactions: life and death at
the interface. Maryland: The Plant Cell v.8, n.10, 1996 (special review issue on plant-
microbe interactions , p.1651-1668

KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*,
Corynebacterium, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. *Phytopathology*, v.60, p.969–
979, 1970.

KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N.; MILLER, T.D. Effects of rhizosphere colonization
by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield.
Phytopathology, v. 70, p.1078-1082, 1980.

KUREK, E, JAROSZUK-SCISEL, J. Rye (*Secale cereale*) growth promotion by
Pseudomonas fluorescens strains and their interactions with *Fusarium culmorum* under
various soil conditions. *Biological Control*, v.26, n.1, p.48-56, 2003.

LAMBAIS, M.R. (1996) Aspectos Bioquímicos e Moleculares das Relações Fungo-planta
em Micorrizas Arbusculares. In: SIQUEIRA, J.O (Org.) Avanços em Fundamentos e
aplicações de Micorrizas. Lavras: UFLA, Cap. 2, p.5-38.

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

LUGTENBERG, B. J. J.; de WEGER, L. A.; BENNETT, J. W. Microbial stimulation of
plant growth stages and protections from disease. *Current Opinion in Biotechnology*, v.2,
p.457-464, 1991.

LUZ, E.D.M.N.; SANTOS, A.F. dos; MATSUOKA, K.; BEZERRA, J.L. (2001). Doenças causadas por Phytophthora no Brasil. Campinas: Livraria Rural, 758p.

LYNCH, J.M. Soil biotechnology: microbiological factors in crop productivity. Oxford: Blackwell, 1983, 192 p.

MACHADO, R. C. R.; MÜLLER, M. W.; GOMES, A. R. S. Mobilization of stored carbohydrates to developing leaves and fruits of cocoa plants (*Theobroma cocoa* L.). *Agrotropica*, v.1, n.2, p.122-127, 1989.

MARENCO, Ricardo A.; LOPES, Nei F. Fisiologia Vegetal. Viçosa: UFV, 2005, 451p.

MELO, I.S. de Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas: descrição e potencial de uso na agricultura. In: MELO, I.S. de AZEVEDO, J.L. de, ed. Ecologia Microbiana. Jaguariúna: Embrapa/CNPMA, 1998, 488p. Parte 1, p.87-116.

MELO, I.S. de AZEVEDO, J.L. de, ed. Ecologia Microbiana. Jaguariúna: Embrapa/CNPMA, 1998, 488p.

MELLO, M.R.F. de *et al.* Seleção de bactérias e métodos de bacterização para promoção de crescimento em mudas de abacaxizeiro micropropagadas. *Summa Phytopathologica*, v.28, p.222-228, 2002.

NEDER, R.N. Microbiologia: manual de laboratório. São Paulo:Nobel, 1992, 138p.

NEVES, Maria Cristina Prata; RUNJANEK, Norma Gouvêa Ecologia das Bactéria Diazotróficas nos solos tropicais. In: Melo, Itamar Soares de; Azavedo, João Lúcio de, ed. Ecologia Microbiana. Jaguariúna: Embrapa- CNPMA, 1998, P15

O GLOBO. Cade reabre caso sobre a garoto: Compra da empresa pela Nestlé tramita na Justiça. Rio de Janeiro. Disponível em <<http://g1.globo.com/Noticias/Negocios/0,,AA1447115-5600,00.html>>. Acesso em:11 março 2007.

OKON, Y.; ITZIGSOHN, R. The development of *Azospirillum* as a commercial inoculant for improving crop yields. *Biotechnology Advances*, v.13, n.3, p.415-424, 1995.

ORGANIZAÇÃO PARA AGRICULTURA E ALIMENTOS DAS NAÇÕES UNIDAS -
FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO.

Production yearbook. Disponível em:

<http://www.fao.org/waicent/faostat/agricult/prod_e.htm>. Acesso em: 09 dezembro 2002.

PAN, B.; VESSEY, J. K.; SMITH, D. L. Response of field-grown soybean to co-inoculation with the plant growth promoting rhizobacteria *Serratia proteamaculans* or *Serratia liquefaciens*, and *Bradyrhizobium japonicum* pre-incubated with genistein. *European Journal of Agronomy*, v.17, n.2, p.143-153, 2002.

PANDEY, A.; SHARMA, E.; PALNI, L. M. S. Influence of bacterial inoculation on maize in upland farming systems of the Sikkim Himalaya. *Soil Biology and Biochemistry*, v.30, n.3, p.379-384, 1998.

PARKINSON, D.; GRAY, T.R.G.; WILLIAMS, S.T. Methods for studying the ecology of soil micro-organisms. London: International Biological Programme, 1971. 116p. (IBF Handbook, n.19).

PATTEN, C. I.; GLICK B. R. Bacterial biosynthesis of índole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 42, p. 207-220, 1996.

PEREIRA, João Carlos; NEVES, Maria Cristina Prata; DROZDOWICZ, Adam. Quantificações das populações de bactérias em geral, de bactérias resistentes a antibióticos e de actinomicetos em solos. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1996. 21p.

PINAZZA, L.A.; ALIMANDRO, R. Uma longa crise. *Agroanalysis (Brazil)*, v.21, n.9, p.59-62, 2001.

PINAZZA, L.A.; ALIMANDRO, R. Cresce a oferta de chocolate no mundo e no Brasil o preço ao produtor de cacau não chega a incentivar, *Agroanalysis (Brazil)*, v.22, n.2, p.36-38, 2002.

PRESTON, Gail M.; HAUBOLD, Bernhard; RAINEY Paul B. Bacterial genomics and adaptation to life on plants: implications for the evolution of pathogenicity and symbiosis. *Current Opinion in Microbiology*, London, v.1, n.5, p.589–597, out. 1998.

RODRÍGUEZ, Hilda; FRAGA, Reynaldo. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, v.17, n4-5, p.319-339, 1999.

ROMEIRO, R. S.; TAKATSU, A.; UESGI, C. H., *et al.* Um método simples para seleção de rizobactérias com capacidade de promover colonização de raízes e suas implicações na indução de resistência sistêmica à enfermidades e na promoção de crescimento de plantas. *Fitopatologia Brasileira*, v. 24, p.255, 1999.

SAGARDOY, M. A.; SALERNO; C. M. Number, distribution, and characterization of heterotrophic bacteria in some Argentine soils. *Anales de Edafologia y Agrobiologia*, Madrid, v.42, p.2069-2081, 1983.

SCHROTH, M.N.; WEINHOLD, A.R. Root-colonizing bacteria and plant health. *Hort Science*, v.21, n.6, p.1295-1302, 1986.

SENA, José O. Alves de. Caracterização Bioquímica da Depressão de Crescimento de Porta-Enxertos Cítricos Inoculados com Fungo Micorrízico Arbuscular em Doses Altas de Fosfato. 1998. 111 f. Tese (Doutorado em agronomia) – Esalq, Piracicaba.

SHISHIDO, M.; PETERSEN, D.J.; MASSICOTE, H.B. CHANWAY, C.P. Pine and spruce seedling growth and mycorrhizal infection after inoculation with plant growth promoting *Pseudomonas* strains. *FEMS Microbiology Ecology*, v.21, p.109-119, 1996.

SILVA NETO, P. J. da *et al.* Sistema de produção de cacau para a Amazônia brasileira. Belém: CEPLAC, 2001, 125p.

SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas. Brasília: MEC/ABEAS; Lavras: ESAL/FAEPE, 1988, 236.p

SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; GRISI, B.M.; HUNGRIA M.; ARAUJO, R.S. Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental. Brasília: EMBRAPA-CNPAP, 142p, 1994.

SOUZA, Jorge T. de. Distribution, diversity, and activity of *Pseudomonas* spp. 2002. 161 f. Tese (Doutorado) – Wageningen University, The Netherlands.

THORNTON, H. G. On the development of a standardized agar medium for counting soil bacteria with special regard to the repression of spreading colonies. *Annals of Applied Biology*, Cambridge, 1922, v 9, p.241-274.

URENHA, L. C.; PRADELLA, J. G. C.; OLIVEIRA, M. S. O.; BONOMI, A. Produção de biomassa celular de rizóbio. In: Hungria, M.; Araújo, R. S. (Ed.). *Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola*. Brasília: Embrapa, 1994. Cap. 4, p. 95-137.

VAN PEER, R.; NILEMANN, G.J.; SCHIPPERS, B. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium Wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. Strain WCS417r. *Phytopathology*, 1991, v.81, n.7, p.728.

WAKSMAN, S.A. *The actinomycetes; classification, identification and descriptions of genera and species*. Baltimore: The Williams & Wilkins, 1961.

WANG, Chunxia; KINILL, Edouard; GLICK, Bernard R.; DÉFAGO, G. Effect of transferring 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 and its *gacA* derivative CHA96 on their growth-promoting and disease-suppressive capacities. *Canadian Journal of Microbiology*, v.46, p. 898-907, 2000.

WELLER, D.M. (1988) Biological control of soil-borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, v.26, p.379-407.

ZAK, J.C. Fungal Responses to Disturbance: Agriculture and Forestry. In: CARROL, G.; WICKLOW, D.T. ed. *The fungal community*. 2ed. New York: Dekker, p.403-425, 1992.

ANEXO 1

RESUMO DOS RESULTADOS DAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Tabela A1-01. Resumo das Análises de Variâncias das variáveis de desenvolvimento das plantas do ensaio E1/2003, por ocasião do isolamento aos 33 DAT.

FV	QMT E QMR POR VARIÁVEL E PROBABILIDADE DO "F" SER SIGNIFICATIVO						
	GL	Alt1	p(F<Fc)	NFPP	p(F<Fc)	AFMP	p(F<Fc)
Substratos	8	401,1266	<(0,001)	18,7014	<(0,001)	4,8105	0,004
Resíduo	32	6,7521	(-)	0,5609	(-)	1,3420	(-)
CV (%)	(-)	16,70	(-)	23,0880	(-)	86,7590	(-)

Legenda: DAT: dias após o transplante; QMT: quadrado médio do tratamento; QMR: quadrado médio do resíduo; FV: fonte de variação; GL: grau de liberdade; Alt1: altura da planta medida do colo ao ápice; NFPP: número de folhas por planta; AFMP: área foliar média por planta; CV: coeficiente de variação; (-): ausência de dados.

Tabela A1-02. Resumo das Análises de Variâncias das variáveis de desenvolvimento das plantas do ensaio E1/2003, por ocasião da colheita (117DAT).

GL Tratamentos	GL Resíduo	Variável	QMT	QMR	CV (%)	p(F<Fc)
7	29	Alt1	27,7271	4,6920	8,3860	<(0,001)
7	29	MFPA	6,5963	0,9389	20,0010	<(0,001)
7	29	MFSR	12,7029	0,99942	27,0280	<(0,001)
7	29	NFPP	8,1861	1,6167	16,4490	<(0,001)
7	29	MSPA	1,1264	0,1863	22,1480	<(0,001)
7	29	MSSR	0,9439	0,1200	27,8230	<(0,001)

Obs. As abreviaturas usadas aqui têm os mesmos significados já descritos anteriormente com exceção para: MFPA: massa fresca da parte aérea; MFSR: massa fresca do sistema radicular; MSPA: massa seca da parte aérea; MSSR: massa seca do sistema radicular.

Tabela A1-03. Resumo das análises de variância das variáveis usadas para avaliar o desenvolvimento vegetal das plantas ao final do ensaio E2/2003 com 56 DAT.

GL Tratamentos	GL Resíduo	Variável	QMT	QMR	CV (%)	p(F<Fc)
6	28	Alt1	5,1205	11,9059	13,310	N.S.
6	28	MFPA	0,3087	0,4211	26,713	N.S.
6	28	MFSR	0,0906	0,0660	25,706	N.S.
6	28	NFPP	3,0476	1,4428	25,325	N.S.
6	28	MSPA	0,1142	0,0232	39,769	N.S.
6	28	MSSR	0,0011	0,00110	41,896	N.S.

Obs. As legendas usadas aqui têm os mesmos significados já descritos anteriormente.

Tabela A1-04 Resumo das análises de variância das variáveis de desenvolvimento vegetal das UE do ensaio E4-R1/2003 em diversas épocas de avaliação.

		QM E p(Ft<Fc) DE CADA VARIÁVEL POR ÉPOCA DE COLHEITA								
FV	GL	Alt1			Alt2			NFPP		
		29 DAT	43 DAT	57 DAT	29 DAT	43 DAT	57 DAT	29 DAT	43 DAT	57 DAT
Bloco	3	2,7514 (N.S.)	1,5693 (N.S.)	(-) (-)	2,0966 (0,279)	1,6480 (0,365)	(-) (-)	0,3148 (N.S.)	0,0284 (N.S.)	(-) (-)
Trat.	11	2,5088 (N.S.)	2,3843 (N.S.)	2,5604 (N.S.)	1,5723 (0,465)	1,3230 (N.S.)	(-) (-)	0,2241 (N.S.)	0,2121 (N.S.)	0,5463 (0,277)
Resíduo	33	3,0468	2,6807	2,7142	1,5687	1,5050	(-)	0,3153	0,2420	0,4244
CV (%)	(-)	10,847	9,907	9,487	13,779	12,719	(-)	15,713	12,466	11,227

Obs. As legendas usadas aqui têm os mesmos significados já descritos anteriormente com exceção para: Alt2: altura da planta medida do ponto de inserção dos cotilédones ao ápice; Trat.: tratamento.

Tabela A1-05 Resumo das análises de variância das variáveis de desenvolvimento vegetal das UE por ocasião da colheita do ensaio E4-R1/2003 aos 99 DAT.

		QM E p(Ft<Fc) DE CADA VARIÁVEL		
FV	GL	Alt1	NFPP	MFPA
		Bloco	3	2,4999 (N.S.)
Trat.	11	2,5977 (N.S.)	1,2718 (N.S.)	0,2081 (N.S.)
Resíduo	33	3,1979	2,4752	0,4725
CV (%)	(-)	9,800	46,496	32,703

Obs. As legendas usadas aqui têm os mesmos significados já descritos anteriormente.

Tabela A1-06 Resumo das análises de variância das variáveis de desenvolvimento vegetal das UE por ocasião da colheita do ensaio E4-R2/2003 aos 32 DAT.

		QM E p(Ft<Fc) DE CADA VARIÁVEL		
FV	GL	Alt1	Alt2	MFPA
		Bloco	3	430,5643 (0,134)
Trat.	11	203,5494 (N.S.)	15,6459 (N.S.)	1,3834 (0,049)
Resíduo	33	215,73901	24,1138	0,6569
CV (%)	(-)	71,796	50,179	22,740

Obs. As legendas usadas aqui têm os mesmos significados já descritos anteriormente.

Tabela A1-07 Resumo das análises de variância das variáveis de desenvolvimento vegetal das UE do ensaio E5/2003 em diferentes épocas de avaliação.

QM E p(F<Fc) DE CADA VARIÁVEL POR ÉPOCA DE COLHEITA					
FV	GL	Alt1		NFPP	
		07 DAT	21 DAT	07 DAT	21 DAT
Bloco	3	1,1567 (N.S.)	1290,0630 (0,028)	0,6424 (N.S.)	4,6059 (N.S.)
Trat.	11	2,3633 (N.S.)	101.330,2 <(0,001)	0,9309 (0,451)	105,4672 <(0,001)
Resíduo	33	3,1109	375,8254	0,9170	4,7689
CV (%)	(-)	9,053	6,105	13,282	12,042

Obs. As legendas usadas aqui têm os mesmos significados já descritos anteriormente.

Tabela A1-08 Resumo das análises de variância das variáveis de fertilidade dos solos usados com as UE do ensaio E1/2004.

GL Tratamentos	GL Resíduo	Variável	QMT.	QMR	DMS	CV (%)	p(F<Fc)
17	36	PH	1,5634	0,0490	0,2146	1,284	<(0,001)
17	36	Al	0,1391	0,0088	0,0909	15,181	<(0,001)
17	36	Ca	9,85700	0,0340	0,5652	9,068	<(0,001)
17	36	Mg	0,3633	0,4768	0,6690	20,123	<(0,001)
17	36	(H+Al)	11,1061	0,1553	1,2074	13,095	<(0,001)
17	36	P	1736,9630	2,3704	4,7170	7,022	<(0,001)
17	36	K	2.383,0590	114,7778	32,8239	27,470	<(0,001)
17	36	MO	68,0631	17,1929	12,7039	19,746	<(0,001)

Obs. As legendas usadas aqui têm os mesmos significados já descritos anteriormente com exceção para: MFPA: massa fresca da parte aérea; MFSR: massa fresca do sistema radicular; MSPA: massa seca da parte aérea; MSSR: massa seca do sistema radicular.

Tabela A1-09 Resumo das análises de variância das variáveis de desenvolvimento vegetal das plantas do ensaio E1/2004 por ocasião da colheita aos 80 DAT.

G.L. Tratamentos	G.L. Resíduo	Variável	Q.M.T.	Q.M.R.	Q (5%)	C.V.	p(F<Fc)
17	71	Alt1	776,8994	12,8021	5,116	20,190	<(0,001)
17	71	NFPP	6,4915	2,0725	5,116	24,927	<(0,001)
17	71	AFMP	443,3038	65,1385	5,116	28,941	<(0,001)
17	71	MSPA	0,4531	0,0589	5,116	27,241	<(0,001)
17	71	MSSR	0,7377	0,0405	5,116	26,957	<(0,001)

Obs. As legendas usadas aqui têm os mesmos significados já descritos anteriormente com exceção para: MFPA: massa fresca da parte aérea; MFSR: massa fresca do sistema radicular; MSPA: massa seca da parte aérea; MSSR: massa seca do sistema radicular.

Tabela A1-10 Resumo das análises de variância dos teores de nutrientes no tecido vegetal das UE do ensaio E1/2004 por ocasião da colheita aos 80 DAT.

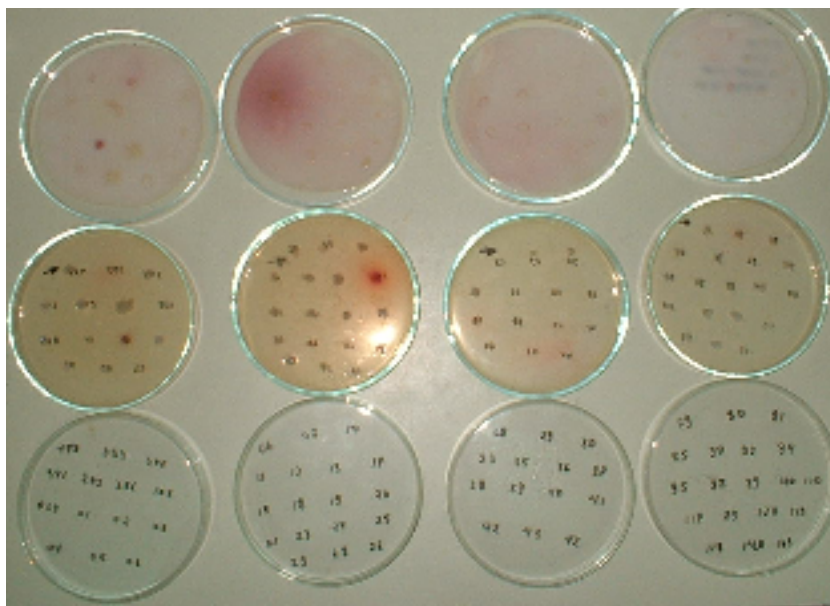
G.L. Tratamentos	G.L. Resíduo	Variável	QMT	QMR	Dms	CV (%)	p(F<Fc)
17	36	N	36,5133	5,0918	6,913	10,190	<(0,001)
17	36	P	2,4088	0,1766	1,288	14,843	<(0,001)
17	36	K	10,9520	3,7271	5,915	19,608	(0,003)
17	36	Ca	9,8071	0,3248	1,746	10,215	<(0,001)
17	36	Mg	3,1910	0,0628	0,768	6,996	<(0,001)
17	36	S	0,4608	0,0845	0,891	16,493	<(0,001)
17	36	Cu	74,0366	6,5162	7,821	18,706	<(0,001)
17	36	Fe	16250,16	2848,473	163,519	28,362	<(0,001)
17	36	Mn	337737,9	1165,05	323,736	31,156	<(0,001)
17	36	Zn	109,4232	30,6246	16,955	17,193	<(0,001)

Obs. As legendas usadas aqui têm os mesmos significados já descritos anteriormente com exceção para: N: nitrogênio; P: fósforo; K: potássio; Ca: cálcio; Mg: magnésio; S: enxofre; Cu: cobre; Fe: ferro; Mn: manganês; Zn: zinco.

ANEXO 2
FOTOGRAFIAS



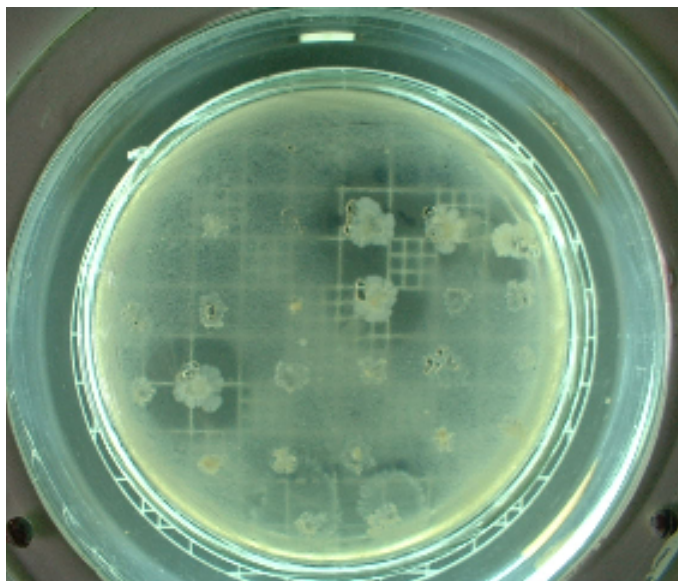
Fotografia 1. Vista geral das mudas de cacaueteiro usadas como plantas armadilhas no ensaio E1/2003, em casa-de-vegetação, para captura de rizobactérias, em Itajuípe-BA.



Fotografia 2. Exemplo de resultado do teste para verificação da produção de AIA por bactérias. A: aplicando-se a solução reveladora sobre a membrana de nitrocelulose. B: aplicando-se a solução reveladora diretamente sobre o meio de cultura com os isolados. C: tampas das placas com a numeração de controle dos isolados testados.



Fotografia 3. Vista geral das mudas de cacaueteiro usadas como plantas armadilhas no ensaio E1/2004, em casa-de-vegetação, para captura de rizobactérias, em Manaus-AM.



Fotografia 4. Exemplo de resultado do teste para identificação de bactérias quitinolíticas