

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

**DENSIDADE POPULACIONAL, DIVERSIDADE GENÉTICA E
ATIVIDADE DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE
ACTINOMICETOS ASSOCIADOS À RIZOSFERA DE
CACAUUEIRO**

TÂMARA RODRIGUES BARRETO

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

**DENSIDADE POPULACIONAL, DIVERSIDADE GENÉTICA E
ATIVIDADE DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE
ACTINOMICETOS ASSOCIADOS À RIZOSFERA DE
CACAUUEIRO**

TÂMARA RODRIGUES BARRETO

Engenheiro Agrônomo
Universidade Estadual de Santa Cruz, 2003

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

Orientador: Prof^a Dr^a. Ana Cristina Fermino Soares

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

FICHA CATALOGRÁFICA

B273

Barreto, Tâmara Rodrigues

Densidade populacional, diversidade genética e atividade de promoção de crescimento de actinomicetos associados à rizosfera de cacauzeiro / Tâmara Rodrigues Barreto. - Cruz das Almas, BA, 2007.

56f. : il., tab.

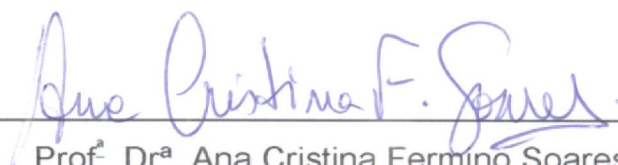
Orientador: Prof. Dr. Ana Cristina Fermino Soares

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

1. Cacau – diversidade populacional. 2. Cacau – diversidade genética 3. Cacau – crescimento. I. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II. Título.

CDD 20.ed. 633.74


COMISSÃO EXAMINADORA



Prof.^a Dr.^a Ana Cristina Fermino Soares

Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - UFRB

(Orientadora)



Prof. Dr. Rodrigo Pires do Nascimento

Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - UFRB



Pesquisador Dr. Aldo Vilar Trindade

EMBRAPA - Mandioca e Fruticultura Tropical

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

Conferindo o Grau de Mestre em Ciências Agrárias em:

.....

Esta dissertação **dedico** aos meus amados Pais, Ademir Barreto e Noélia Barreto e ao meu querido irmão Tarcizo Barreto pelo significado único que tens em minha vida. O que sou e o que serei devo a vocês.

Ofereço ao meu noivo Augusto César que tem dado um novo sentido a minha vida.

AGRADECIMENTOS

A DEUS que me concedeu o Dom da Vida;

Aos meus pais Ademir Barreto e Noélia Barreto pelo amor, ensinamentos, exemplos e incentivos concedidos em todas as horas;

Ao meu irmão Tarcizo Barreto pela grande amizade e companheirismo;

A Augusto César pelo importante apoio emocional e profissional, tornando essa caminhada mais agradável;

À orientadora Prof^a. Dr^a. Ana Cristina F. Soares pela amizade, atenção e valiosos ensinamentos;

Ao co-orientador Prof. Dr. Jorge T. de Souza pela amizade, dedicação, paciência e exemplo de profissionalismo;

Ao Prof. Pesquisador George Sodré e a Msc. Carla Sousa pela atenção e presteza nos trabalhos realizados;

Aos meus Tios e Primos que torceram por mais esta vitória;

Aos colegas de mestrado, em especial a Edivânia, Cândice, Geógenes, Lauro, Leônidas, Márcio Gil, Maria Alice e Zuzinaide pelo convívio amigável durante o curso;

Aos estagiários e técnicos do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola da UFRB por estarem sempre dispostos a ajudar;

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB pela oportunidade da realização do Curso de Mestrado;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida desde a iniciação científica;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela concessão do auxílio ao projeto de dissertação;

À CEPLAC e ao IBC pela infra-estrutura e auxílio dos seus funcionários, sem os quais não seria possível a conclusão desta dissertação;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho.

.....
Três Coisas

*"De tudo, ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando...
A certeza de que é preciso continuar...
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar..."*

*Portanto, devemos:
Fazer da interrupção um caminho novo...
Da queda um passo de dança...
Do medo, uma escada...
Do sonho, uma ponte...
Da procura, um encontro... "*

(Fernando Pessoa)

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO	01
Capítulo 1	
Densidade populacional, diversidade genética e atividade de promoção de crescimento de actinomicetos associados à rizosfera do cacauero.....	11
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
ANEXO.....	44

DENSIDADE POPULACIONAL E DIVERSIDADE GENÉTICA E ATIVIDADE DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE ACTINOMICETOS ASSOCIADOS À RIZOSFERA DE CACAUEIRO

Autor: Tâmara Rodrigues Barreto

Orientadora: Ana Cristina Fermino Soares

RESUMO: Apesar da reconhecida importância das bactérias promotoras de crescimento, apenas um reduzido número de estudos foi conduzido com este grupo de microrganismos na cultura do cacau. Os objetivos deste trabalho foram o estudo da densidade populacional, diversidade genética, atividade fisiológica e o potencial de actinomicetos associados à rizosfera de cacau no crescimento de mudas desta cultura. A densidade populacional de actinomicetos foi semelhante no solo e nas raízes de cacau. Entretanto, houve uma tendência da densidade populacional destes microrganismos ser maior em amostras onde ocorreram menores densidades de bactérias totais. Todos os isolados selecionados para este estudo foram classificados através de análises de seqüências da β -subunidade do gene *rpoB* como pertencentes ao gênero *Streptomyces*. Dentre os isolados testados, constatou-se *in vitro*, a produção de celulase, xilanase, quitinase, ácido indolacético e a capacidade de solubilização de fosfato. Apenas os isolados AC 103 e AC 26 foram capazes de promover o crescimento de mudas vegetativas de cacau. Estes isolados apresentam potencial para serem utilizados na produção de mudas clonais de cacau a partir de estacas.

Palavras-Chave: *Streptomyces spp.*, gene *rpoB*, *Theobroma cacao*.

POPULATION DENSITY, GENETIC DIVERSITY AND ACTIVITY FOR GROWTH PROMOTING OF ACTINOMYCETES ASSOCIATED TO CACAO

Author: Tâmara Rodrigues Barreto

Advisor: Ana Cristina Fermino Soares

ABSTRACT: In spite of the acknowledged importance of growth-promoting bacteria, only a reduced number of studies were conducted with these microorganisms on cacao. The objectives of this work were to study the population densities, genetic diversity, physiological activity and the potential of actinomycetes associated with cacao rhizosphere on growth of cacao clones obtained from stem cuttings. The populations densities of actinomycetes were similar in soil and on cacao roots. However, actinomycete population densities tended to be higher in samples with the lowest densities of total aerobic bacteria. All isolates selected and used in this study were classified through sequence analyses of the β -subunit of the *rpoB* gene as species belonging to the genus *Streptomyces*. *In vitro* cellulolytic, xylanolytic and chitinolytic activity, indolacetic acid production and phosphate solubilization activity were observed for the isolates tested in this study. Only isolates AC 103 and AC 26 were able to induce better growth of cacao clones from stem cuttings. These isolates show potential to be applied on the production of cacao clones propagated through stem cuttings.

Key-words: *Streptomyces spp.*, gene *rpoB*, *Theobroma cacao*.

INTRODUÇÃO

O cacauzeiro (*Theobroma cacao*) é uma espécie nativa da floresta tropical úmida americana e representa uma cultura de importância mundial, pois sua amêndoa é matéria prima para fabricação de chocolate. Tem um enorme valor social e ecológico para o Brasil, por empregar mão-de-obra local e por ser uma planta cultivada em sub-bosque, preservando a floresta. O declínio da produção cacauzeira brasileira, causado pela doença vassoura-de-bruxa (*Moniliophthora perniciosa*), aliado à queda dos preços internacionais vem contribuindo para o êxodo rural no Sul da Bahia, principal região produtora de cacau neste Estado (SANTOS FILHO et al., 1998).

O uso de variedades resistentes aos patógenos é a forma mais efetiva e duradoura de controle de enfermidades (ALMEIDA et al., 2001). Visando à recuperação da lavoura no sul da Bahia, variedades clonais de cacauzeiro, resistentes à vassoura-de-bruxa vêm sendo lançadas pela CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacauzeira) e distribuídas pelo Instituto Biofábrica de Cacau (IBC). O IBC é uma Instituição sem fins lucrativos criada pelo Governo do Estado da Bahia para a produção em larga escala, de mudas de clones de cacauzeiros resistentes à vassoura-de-bruxa, por via vegetativa. Contudo, algumas etapas do protocolo do IBC para a produção de mudas de cacauzeiro por estaquia necessitam de melhor adequação para atender às exigências da cultura e diminuir os custos de produção da muda. O elevado custo do substrato comercial utilizado pelo IBC e a baixa taxa de enraizamento de alguns clones de cacauzeiro estão entre os principais fatores que afetam negativamente a produção dessas mudas.

Estudos relatam que os índices de enraizamento aumentam com a utilização de plantas matrizes mais jovens e que o uso de reguladores de crescimento pode incrementar consideravelmente o índice de enraizamento

(EVANS, 1953). Sodré et al. (2006) sugerem o uso de miniestacas para a forma o de mudas de cacauero permitindo desta maneira, explorar melhor a maior capacidade de enraizamento do material propagativo juvenil, aumentando os níveis de enraizamento e diminuindo os custos da forma o de mudas de materiais clonais. De acordo com estes autores, as miniestacas são retiradas de ramos plagiotrópicos coletados de plantas matrizes e medem aproximadamente 4 a 6 cm de comprimento.

O enraizamento de estacas de cacauero tem sido utilizado comercialmente em Trinidad, Granada, Jamaica e na República Dominicana. Nesses países, são utilizadas estacas semilenhosas, com folhas reduzidas   metade e tratadas com uma mistura de ácido indolbutírico (AIB):  cido indolacético (AIA) na propor o de 1:1 em soluço de álcool e  gua. O substrato utilizado   composto de areia e p  de serra (MOOLEEDHAR, 2000). No equador, as estacas de cacauero são herbáceas com folhas reduzidas a 40-50 % do tamanho original e tratadas com mistura de AIB + ANA ( cido naftaleno acético) na propor o de 1:1, em soluço de  lcool 50 %. O substrato utilizado   composto de solo franco limoso, esterco curtido, areia e casca de arroz na propor o de 8:3:2:2 (CRESPO, 2000).

Substratos são utilizados no mundo todo para o cultivo de plantas e são chamados de cultivo sem solo ou "soiless culture". Este termo refere-se a qualquer sistema de produ o de plantas baseado em meios distintos de solo para o estabelecimento das raízes, embalado em recipientes de qualquer material, forma e tamanho (MILNER, 2006). A substitui o do solo por substratos para a produ o de mudas apresenta diversas vantagens, como a possibilidade de cultivo em áreas com m s condi es físicas e químicas, em locais com doenças de solo e com má qualidade de água para irriga o. Em sistemas de produ o de mudas em substratos, tem se observado elevada produtividade e qualidade nutricional e fitossanitária das mudas, quando comparadas àquelas produzidas em solo, devido   otimiza o das condi es na rizosfera, como a rela o ar/água, concentra o de nutrientes e adequados valores de CE e pH, além de poder produzir novas plantas que não se desenvolveriam bem em solos locais (MILNER, 2006).

Independente do tipo e origem da matéria-prima, as principais características de um bom substrato devem ser a ausência de patógenos,

custo reduzido, acessibilidade no mercado, resistências a variações químicas e físicas, elevada porcentagem de água disponível à planta, boa aeração, alta capacidade de troca catiônica, presença de macro e micronutrientes assimiláveis e pH entre 5 e 7 (REJOVOT, 1994). Além disso, a relação C/N deve estar próxima de 40:1 e os teores de tanino devem ser baixos, isto porque, estes compostos presentes nos substratos diminuem a atividade microbiana e reduzem o crescimento de raízes, enquanto a alta relação C/N promove imobilização do nitrogênio com danos ao crescimento da planta (SODRÉ et al., 2006).

Estudos desenvolvidos por Sodré et al. (2006) indicam que a utilização do substrato alternativo à base de tegumento de amêndoa de cacau e serragem de madeira, beneficia significativamente o processo de produção de mudas de cacauzeiro, diminuindo o custo de produção da muda e melhorando a sua qualidade fitossanitária e nutricional.

O melhor aproveitamento de substratos orgânicos para a produção de mudas pode ainda ser obtido com a inoculação das plantas e do substrato com microrganismos benéficos como as Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (BPCPs) (SOUSA et al., 2006). Estas possuem um importante papel como promotoras de crescimento vegetal, pela ação direta através da solubilização de nutrientes do substrato, produção de substâncias reguladoras de crescimento de plantas (CATTELAN, 1999) e pela ação indireta, através do controle de patógenos que limitam o crescimento das plantas. Além disso, a associação de plantas com estes microrganismos que apresentam a capacidade de seqüestrar ou degradar moléculas tóxicas às plantas pode tornar possível a recuperação de áreas contaminadas, permitindo o desenvolvimento de culturas de importância econômica nestes ambientes (OLIVEIRA et al., 2003).

A promoção de crescimento em plantas tem sido observada em diversos trabalhos com as BPCPs. Os principais grupos destes microrganismos promotores de crescimento de plantas são as *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. e *Streptomyces* spp. (PIZZINATTO et al., 1996). Foram obtidos incrementos de 21,53 % no crescimento da parte aérea e de 94 % na produção de matéria de seca de raízes de tomateiro, com a inoculação de *Streptomyces* spp. (LIMA, 2003). Na cultura da cenoura foi observado um aumento de 48 % na produção

com a inoculação de *Bacillus subtilis* (TURNER et al., 1991) e de até 150 % em plantas de rabanete inoculadas com *Pseudomonas* spp. (KLOEPPER et al., 1981).

Espécies do gênero *Streptomyces*, coletivamente denominadas de estreptomicetos, são actinomicetos comumente encontrados no solo, porém podem também ocorrer em diferentes ambientes aquáticos, como pântanos e folhagens em decomposição (OTINIANO, 2006). No solo, a população de *Streptomyces* spp. pode atingir valores variando entre 10^4 a 10^7 UFC/g de solo seco, ocorrendo principalmente na forma de esporos (ARAÚJO, 1998).

Os estreptomicetos são bactérias Gram-positivas, aeróbicas estritas, filamentosas, que sofrem mudanças morfológicas em todo seu ciclo de vida. O gênero *Streptomyces* é o mais estudado entre os actinomicetos, devido à elevada produção de antibióticos e enzimas extracelulares (WATVE et al., 2001). A produção desses compostos pelos actinomicetos tem sido associada à diferenciação na sua morfologia celular, tal como a produção de esporos, podendo ser limitada ou inibida por deficiências nutricionais. Na rizosfera, dada à quantidade de nutrientes exsudados, a deficiência nutricional não se apresenta como um fator limitante à produção de metabólitos secundários pelos actinomicetos (WILLIAMS & VICKERS, 2000).

Dentre as importantes características dos estreptomicetos, enumera-se a capacidade de degradação de moléculas complexas e recalcitrantes, especialmente a celulose, lignina e xilana, fazendo com que tenham um papel importante nos processos de compostagem (CRAWFORD, 1988; RAMÍREZ et al., 2003), além de produzirem sideróforos, quitinase, β -glucanases e antibióticos que agem no controle de organismos antagônicos (OLIVEIRA et al., 2003; CRAWFORD et al., 1993).

A quitina depois da celulose é o polímero mais abundante da natureza, sendo encontrada como constituinte do exoesqueleto de insetos, de crustáceos e conchas de moluscos, sendo também o maior componente da parede celular de fungos. As quitinases produzidas por muitos organismos, entre eles os estreptomicetos, são enzimas hidrolíticas com a propriedade de hidrolisar a quitina em oligômeros de N-acetilglicosamina (NAG), que assim podem ser absorvidos e metabolizados (GOODAY, 1990; GOODAY et al., 1992).

Sideróforos são moléculas sequestradoras de ferro de baixa massa molecular (400 a 1000 Daltons), secretadas por microrganismos em resposta a baixa disponibilidade de Fe^{+3} em solução. Estes compostos atuam como promotores de crescimento pela capacidade de prevenir a proliferação de fitopatógenos no ambiente rizosférico (OLIVEIRA et al., 2003). Adicionalmente aos mecanismos de antibiose, a competição por nutrientes e nichos ecológicos amplia o potencial de proteção contra fitopatógenos (BETTIOL, 1991).

Outros estudos realizados com rizobactérias indicam também a produção de importantes substâncias reguladoras de crescimento vegetal, como as auxinas, citocininas, giberelinas e etileno (CATTELAN, 1999).

A caracterização das BPCPs e o seu papel no aproveitamento de substratos orgânicos exige a identificação ao nível de gênero e espécie dos isolados de bactérias obtidos. Muitos métodos vêm sendo utilizados para identificação de bactérias, sendo os métodos tradicionais em geral, muito laboriosos e requerem uma série de testes especializados, que podem apresentar resultados variados e de difícil interpretação, em função das condições de cultivo dos microrganismos (WILSON et al., 1998; HARVEY et al., 2001). Além disso, a utilização de tais metodologias fornece informações limitadas para identificação dos microrganismos. Como alternativa, foram desenvolvidas novas tecnologias, dentre as quais se destacam as baseadas em técnicas de biologia molecular. A análise do material genético oferece maior vantagem para o estudo e identificação dos microrganismos, pois não está sujeita às variações fenotípicas e apresenta maior precisão (REIS JR. et al., 2002). Essas técnicas receberam grande impulso com o desenvolvimento da técnica conhecida como PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Descrita por SAKI et al. (1985), esta técnica permite amplificar pequenos e específicos segmentos do genoma, permitindo a obtenção *in vitro* de várias cópias de determinada região do DNA. Seqüências do DNA de determinados microrganismos podem ser amplificadas, usando *primers* (seqüências iniciadoras) complementares a essas seqüências, localizadas em locais específicos do genoma. Os fragmentos do DNA são amplificados a partir dos *primers*, pela ação da enzima *Taq* DNA polimerase (isolada originalmente do microrganismo *Thermus aquaticus*). A técnica de PCR tem oferecido resultados rápidos e precisos na

identificação de bactérias (STEINGRUBE et al., 1995, 1997; WILSON et al., 1998; LAURENT et al., 1999).

Nos primeiros estudos de identificação molecular de bactérias empregando técnicas de seqüenciamento, foi utilizado o gene 16S rDNA, que codifica o RNA estrutural da subunidade menor dos ribossomos bacterianos (WOESE, 1987). Os ácidos ribonucléicos ribossomais (rRNA) são universalmente distribuídos entre os diferentes grupos de seres vivos, sendo a molécula com o maior grau de conservação existente (REIS JR. et al., 2002). Uma das vantagens de se usar informações sobre as seqüências do rRNA é a sua disponibilização gratuita em bases de dados (RDP, Gen-Bank, EMBL), permitindo a comparação de novas seqüências obtidas com as seqüências presentes nessas bases (COUTINHO et al. 1999). Porém, pesquisas recentes têm demonstrado que o uso do 16S rDNA pode não ser satisfatório na maioria dos casos (UEDA et al., 1999), fato este devido à evolução diferenciada das múltiplas cópias deste gene encontradas em uma única célula bacteriana. Por esse motivo, outros genes estão sendo adotados na identificação e em estudos taxonômicos de microrganismos (DAHLLOF et al., 2000; SOUZA et al., 2003). Esses genes apresentam inúmeras vantagens em relação ao 16S, entre elas a presença de uma única cópia por célula, evolução mais acelerada que o 16S, permitindo a identificação de espécies filogeneticamente próximas (FOX et al., 1992).

Estudos realizados por Kim et al. (1999) demonstraram que o seqüenciamento da β -subunidade do gene da RNA polimerase produz ferramentas acuradas e convincentes para análise filogenética do gênero *Mycobacterium* pertencente ao grupo dos actinomicetos. Portanto, o método baseado no *rpoB* pode ser utilizado mais eficientemente que o baseado no 16S rDNA para o delineamento de algumas espécies de actinomicetos.

Os objetivos deste estudo foram: isolar actinomicetos da região rizosférica do cacauero e quantificar a sua população em plantios de cacauero do Centro de Pesquisas do Cacau (CEPEC) e do Instituto Biofábrica de Cacau (IBC), avaliar o efeito de actinomicetos na promoção de crescimento de mudas de cacauero, identificá-los ao nível de gênero e estudar a atividade fisiológica e a diversidade genética dos isolados de actinomicetos.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, L.C. de et al. Seleção de cultivares clonais superiores de cacaueiros para Rondônia, Brasil. **Agrotropica**, v. 13, n 1, p. 9–20, 2001.

ARAÚJO, J.M. Estratégias para isolamento seletivo de actinomicetos. In: MELO, I.S de; AZEVEDO, J.L. (Eds.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA, 1998. p. 351-367.

BETTIOL, W. Seleção de microrganismos antagonísticos a fitopatógenos. In: BETTIOL, W. (Ed.). **Controle biológico de doenças de plantas**. Brasília: EMBRAPA/SPI, 1991. p. 388.

CATTELAN, A.J. **Métodos qualitativos para determinação das características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal**. Londrina: EMBRAPA/CNPSO, 1999. 36p.

COUTINHO, H.L.C. et al. Evaluating the microbial diversity of soil samples: Methodological innovations. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 71, p. 491-503, 1999.

CRAWFORD, D. L. et al. Isolation and characterization of actinomycete antagonist of fungal root pathogen. **Applied and Environmental Microbiology**, Oxford, v. 59, n. 11, p. 3899-3905, 1993.

CRAWFORD, D. L. Biodegradation of agricultural and urban wastes. In: GOODFELLOW M.; WILLIAMS, S.T.; MORDARSKI, M. (Eds). **Actinomycetes in biotechnology**. London: Academic Press, 1988.

CRESPO, F. Métodos comerciais de propagação em grande escala de material clonal de cacaueiro. In: REUNIÃO TÉCNICA, 1., 1998, Ilhéus, BA, **Atas**: atualização sobre produção massal de propágulos de cacau geneticamente melhorado. Ilhéus: CEPLAC, 2000. p. 153-156.

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

EVANS, H. Investigations on the propagation of cacao. **Tropical Agriculture**, v. 28, p. 147-203, 1953.

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

GOODAY, G. The ecology of chitin degradation. **Advances in Microbial Ecology**, v. 11, p. 387-430, 1990.

GOODAY, G.H., ZHU, W. Y., DONNELL, R.W. What are the roles of chitinases in the growing fungus? **FEMS Microbiology Letters**, v. 100, p. 387-392, 1992.

HARVEY, I. et al. Random amplified ribosomal DNA restriction analysis for rapid identification of thermophilic actinomycete-like bacteria involved in hypersensitivity pneumonitis. **Systemic and Applied Microbiology**, v. 24, p. 277–284, 2001.

LAURENT, F.J.; PROVOST, F.; BOIRON, P. Rapid identification of clinically relevant *Nocardia* species to genus level by 16S rRNA gene PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 99–102, 1999.

LIMA, J.L. **Seleção de actinomicetos para o controle biológico de *Ralstonia solanacearum* e promoção de crescimento de mudas de tomateiro**. 2003. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Escola de Agronomia, Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2003.

KIM, B. J. et al. Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 1714–1720. 1999.

KLOEPPER, J.W; SCHROTH, M.N. Plant growth – promoting rhizobacteria and plant growth under genotobiotic conditions. **Phytopathology**, St Paul. v.71, p 642-644, 1981.

MILNER, L. Manejo da Irrigação e fertirrigação em substratos: Aspectos Práticos. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE SUBSTRATOS PARA PLANTAS, 5., 2006, Ilhéus, BA. **Anais...** Ilhéus, BA. 2006. p. 001-172

MOOLEEDHAR, V. A review of vegetative propagation methods in cocoa in Trinidad and implications for mass production of clonal cocoa plants. In: REUNIÃO TÉCNICA 1. 1998, Ilhéus, BA. **Atas: atualização sobre produção massal de propágulos de cacau geneticamente melhorado**, Ilhéus: CEPLAC, 2000, p. 53-156.

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

OTINIANO, A.J; FLORIAN, L.M.; SEVILLANO, R.B. La materia orgánica, importancia y experiencia de su uso en la agricultura. **Idesia**, v. 24, n. 1, p. 49-61, 2006.

PEREIRA, J.C. **Interações entre as populações de actinomicetos e outros organismos na rizosfera**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. 15p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 118).

PIZZINATTO, M.A.; FREITAS, S.S. Efeito de *Pseudomonas* spp. fluorescentes sobre a sanidade e a germinação de sementes e o desenvolvimento do algodoeiro. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal. v. 22, n. 1, p. 9-14, 1996.

RAMÍREZ, P.; COHA, J.M. Degradación enzimática de celulosa por actinomicetos termófilos: aislamiento, caracterización e determinación de la actividad celulolítica. **Revista Peruana de Biología**, v. 10, n. 1, p. 67-77, 2003.

REIS JUNIOR, F.B. dos et al. **Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo**. Planaltina, DF: EMBRAPA Cerrados, 2002. (Embrapa Cerrados, Documentos, 51).

REJOVOT, S.A. **Cultivos bajo condiciones forzadas: nociones generales**. Ediciones Mundi – Prensa, 1994.

SAIKI, R.K. et al. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, DC, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

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

SODRÉ, G.A.; CORÁ, J.E.; PEREIRA, A.B. Substratos na produção de mudas de cacauzeiros. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL DE PESQUISA EM CACAU, 15., 2006, São José, Costa Rica. **Anais...** 2006.

SOUSA, C.S. et al. Estreptomicetos no controle da meloidoginose em mudas de tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1759-1766, 2006.

SOUZA, J.T.; MAZZOLA, M.; RAAIJMAKERS, J.M. Conservation of the response regulator gene *gacA* in *Pseudomonas* species. **Environmental Microbiology**, v. 5, p. 1-13, 2003.

STEINGRUBE, V. A. et al. PCR amplification and restriction analysis of a 65-kilodalton heat shock protein gene sequence for taxonomic separation of rapidly

growing mycobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 149–153, 1995.

TURNER, J.T.; BACKMAN, P.A. Factors relating to peanut yield increases following *Bacillus subtilis* seed treatment. **Plant Disease**, St. Paul, v. 75, p. 347-353, 1991.

UEDA, K. et al. Two Distinct Mechanisms Cause Heterogeneity of 16S rRNA. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 78-82. 1999.

WATVE, M. G. et al. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? **Archives of Microbiology**, v. 176, p. 386–390, 2001.

WILLIAMS, S. T.; VICKERS, J. C. The ecology of antibiotic production. In: PEREIRA, J. C. **Interações entre as populações de actinomicetos e outros organismos na rizosfera**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. 15p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 118).

WILSON, R. W. et al. Clinical application of PCR-restriction enzyme pattern analysis for rapid identification of aerobic actinomycete isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 148–152. 1998

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

Capítulo 1

DENSIDADE POPULACIONAL, DIVERSIDADE GENÉTICA E ATIVIDADE DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE ACTINOMICETOS ASSOCIADOS À RIZOSFERA DE CACAUEIRO¹

¹ Artigo submetido ao Comitê Editorial do periódico científico Brazilian Journal of Microbiology

DENSIDADE POPULACIONAL, DIVERSIDADE GENÉTICA E ATIVIDADE DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE ACTINOMICETOS ASSOCIADOS À RIZOSFERA DE CACAUEIRO

RESUMO

Novos materiais clonais de cacaueteiro resistentes à doença vassoura-de-bruxa (*Moniliophthora perniciosa*) estão sendo propagados por estaquia e distribuídos para o produtor, visando o controle da doença. O aprimoramento do protocolo de produção de mudas é necessário para suprir a demanda dos produtores por essas mudas. Alguns estudos relatam que os índices de enraizamento de estacas de diversas espécies de plantas aumentam com a utilização de bactérias promotoras de crescimento. Os objetivos deste trabalho foram: isolar e identificar ao nível de gênero, actinomicetos do solo e de raízes de cacaueteiro, determinar a densidade populacional, a diversidade genética e a atividade fisiológica desses actinomicetos e estudar o efeito desses microrganismos no crescimento de mudas vegetativas de cacaueteiro. As densidades populacionais de actinomicetos foram semelhantes nas amostras de solo e de raízes de cacaueteiro, apresentando valores médios de $1,0 \times 10^6$ UFC.g⁻¹ e de $9,6 \times 10^5$ UFC.g⁻¹, respectivamente. Diversos isolados de actinomicetos apresentaram a capacidade de produção de celulase, xilanase, quitinase, ácido indolacético e de solubilização de fosfato. Baseado na análise de seqüências da β -subunidade do gene *rpoB*, os isolados de actinomicetos da rizosfera de cacaueteiro foram identificados como pertencentes ao gênero *Streptomyces*. Mudas vegetativas de cacaueteiro mostraram incrementos de 117,7 % e 68,3 % na altura do lançamento quando cultivadas em substrato incubado com os isolados AC 103 e AC 26, respectivamente, ambos pertencentes ao gênero *Streptomyces*. Estes isolados, apesar de terem sido obtidos de tomateiro, apresentam potencial para serem aplicados na promoção de crescimento de mudas de cacaueteiro.

Palavras-chave: *Streptomyces* spp., quantificação, filogenia, *Theobroma cacao*

POPULATION DENSITY, GENETIC DIVERSITY AND ACTIVITY FOR GROWTH PROMOTING OF ACTINOMYCETES ASSOCIATED OF CACAO

ABSTRACT

New cacao genotypes with increased tolerance to witches broom (*Moniliophthora perniciosa*) disease are being multiplied vegetatively and distributed to farmers for control of this disease. Improvements of the protocol to propagate cacao from stem cuttings are necessary to meet farmers' demands for these cacao plants. Some studies have reported increased rooting on cuttings of several plant species, when treated with growth-promoting bacteria. This study aimed to isolate and identify actinomycetes at the genus level, from soil of cacao orchards and cacao roots, to determine the population density, genetic diversity, and physiological activity of these actinomycetes, and to study the effect of these microorganisms on growth promotion of cacao plants from stem cuttings. Population densities of actinomycetes were similar in soil and on cacao roots, showing mean values of 1.0×10^6 CFU.g⁻¹ and 9.6×10^5 CFU.g⁻¹, respectively. Several actinomycete isolates presented the ability to produce cellulase, xylanase, chitinase, and indolacetic acid, and to solubilize phosphate. Based on the analyses of sequences from the β -subunit of the *rpoB* gene, all actinomycetes isolated from cacao roots and soil belong to the genus *Streptomyces*. Cacao clones obtained from stem cuttings, when grown in the plant potting mix inoculated and incubated with the streptomycete isolates codified as AC 103 and AC 26, both belonging to the genus *Streptomyces*, presented 117.7 % and 68.3 % increase in shoot length, respectively. Although these two isolates were originally obtained from tomato plants, they are potential agents for growth promotion of cacao clones from stem cuttings.

Keywords: *Streptomyces* spp., quantification, phylogeny, *Theobroma cacao*

INTRODUÇÃO

O cacauieiro (*Theobroma cacao*) é uma planta perene, arbórea, típica de clima tropical e nativa da região da floresta úmida da América (Souza & Dias, 2001), a qual apresenta elevada importância econômica, social e ambiental para o Sul da Bahia, Brasil. O surgimento da doença vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa*, levou a perdas de até 70 % na produção de cacau (Andebrhan et al., 1999).

Nos últimos anos, a CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira) vem desenvolvendo e lançando clones resistentes à vassoura-de-bruxa, sendo estes distribuídos pelo Instituto Biofábrica de Cacau (IBC) aos produtores da região, na forma de mudas propagadas por estaquia (Marrocos et al., 2004). Contudo, a produção de mudas de clones de cacauieiro por estaquia em larga escala, exige estudos de otimização do sistema de produção. Dentre estes, destacam-se os estudos com substratos alternativos em substituição ao substrato orgânico comercial, os quais podem ser formulados a partir de resíduos industriais locais, contribuindo para a minimização da poluição decorrente do acúmulo desses materiais no meio ambiente e para a redução do custo de produção da muda de cacau (Fermino et al., 2000). Estes substratos ainda podem ser enriquecidos com microrganismos do solo benéficos ao crescimento vegetal, como por exemplo, as bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs).

O efeito direto das BPCPs no crescimento vegetal pode ser devido a produção de fitormônios, mineralização de nutrientes, solubilização de fosfatos, fixação do nitrogênio e aumento da capacidade de absorção de nutrientes pelas raízes, entre outros (Conn et al., 1997; Lazarovitz & Nowak, 1997). Os efeitos indiretos no crescimento podem ocorrer devido à proteção da planta contra fitopatógenos por estes microrganismos, através da produção de ácido cianídrico, bacteriocinas e antibióticos, competição por espaço, Fe^{+3} e outros nutrientes, parasitismo e indução de resistência (Mariano, 2004). As bactérias promotoras de crescimento de plantas podem ser utilizadas para tratamento de sementes, explantes e mudas micropropagadas, incorporadas ao substrato de plantio, utilizadas no tratamento de estacas, tubérculos e

raízes, pulverizações na parte aérea incluindo folhagem e frutos, e em pós-colheita (Pereira, 2000).

Dentre os principais representantes do grupo de BPCPs encontram-se os actinomicetos, que são procariotos Gram positivos, aeróbios e importantes decompositores da matéria orgânica. Estes são encontrados em diversos habitats, mas principalmente no solo onde são menos dominantes que as populações fúngicas e bacterianas, atingindo densidade variando entre 10^4 a 10^7 UFC/g de solo seco (Araújo, 1998). Os actinomicetos compreendem mais de 30 % da população de microrganismos do solo, sendo o gênero *Streptomyces* o mais abundante (70-90 %) e também o mais estudado entre os gêneros, devido principalmente a sua produção de antibióticos (Kennedy, 1999; Padilha, 1998).

Poucos são os estudos de densidade populacional e diversidade genética destes microrganismos do solo, o que deixa uma lacuna de informações sobre sua ocorrência no solo, raízes e sua interação com culturas de interesse econômico. Para a cultura do cacau, não foram encontrados trabalhos na literatura científica envolvendo estes estudos no solo e na rizosfera.

Estudos envolvendo a biologia molecular têm se mostrado importantes na análise da estrutura e composição das espécies de microrganismos. Entre estes estudos, destaca-se à análise de seqüências do rDNA, que tem sido explorada para inferir a relação filogenética entre microrganismos (Muyzer et al., 1993). O sequenciamento do gene 16S rDNA tem sido muito utilizado em estudos de diversidade, porém, pesquisas recentes têm demonstrado que este gene pode não oferecer resultados satisfatórios (Ueda et al., 1999), fato este devido à evolução diferenciada das múltiplas cópias deste gene encontradas em uma única célula bacteriana. Por esse motivo, outros genes estão sendo adotados na identificação e em estudos taxonômicos de microrganismos (Souza et al., 2003). Estudos realizados por Kim et al. (1999) relatam que o sequenciamento da β -subunidade do gene da RNA polimerase (*rpoB*) produz resultados acurados e convincentes para análise filogenética de actinomicetos.

Neste contexto, este trabalho objetivou estudar a densidade populacional, a diversidade genética, a caracterização fisiológica de

actinomicetos associados ao cacau e avaliar o efeito de alguns isolados na promoção de crescimento de mudas de cacau propagadas por estaquia.

MATERIAL E MÉTODOS

Densidade populacional e isolamento de actinomicetos de solo e raiz

Para o estudo das populações bacterianas foram coletadas quatro amostras de solo e de raízes, sendo cada uma delas composta de seis sub-amostras, dos jardins clonais do Instituto Biofábrica de Cacau (IBC) e da Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPEC/CEPLAC). Em cada local (CEPLAC e IBC) foram definidos dois plantios de cacau para a coleta de amostras: plantio de cacau com mais de três anos de idade (velho) e plantio com até três anos de idade (novo), sendo estes denominados: Velho IBC; Novo IBC; Velho Ceplac e Novo Ceplac. A Tabela 1 apresenta as características físicas e químicas das amostras de solo coletadas nesses locais.

Tabela 1. Análise química das amostras de solo coletadas para isolamento de actinomicetos.

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

* Amostras de solo coletadas no IBC e na CEPLAC em área de plantio de cacau com menos de três anos de idade (Novo) e com mais de três anos de idade (Velho).

Para a quantificação de actinomicetos, as amostras de solo foram submetidas a um tratamento térmico, sendo colocadas em estufa à temperatura de 60 °C por 4 horas, para a redução do número de bactérias presentes. Em seguida, fez-se a diluição seriada com amostras de 10 g de raízes e amostras de 10 g de solo, sendo estas transferidas para frascos de Erlenmeyer com 90 mL de solução salina (NaCl a 0,85 %) estéril e agitadas por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foram feitas as diluições decimais em série (1:10), em tubos de ensaio contendo 9 mL da solução salina,

obtendo-se diluições de 10^{-1} a 10^{-4} . Foi realizado o plaqueamento de 50 μ l de cada diluição em meio extrato de solo (Pramer & Schmidt, 1964), adicionado de ciclohexamida na concentração de 100 μ g/mL. Para a contagem de bactérias totais não foi utilizado o tratamento térmico, efetuando-se a diluição seriada (10^{-1} a 10^{-5}), conforme descrito acima e o plaqueamento em meio agar nutriente (Levine, 1954) com ciclohexamida na concentração de 100 mg/mL. Para o crescimento de actinomicetos e bactérias totais, as placas foram incubadas por 12 dias a 30 °C em câmara de crescimento tipo B.O.D. e por 48 horas à temperatura de 28 ± 2 °C, respectivamente.

Os actinomicetos crescidos no meio extrato de solo foram preservados para os demais estudos. As colônias individualizadas dos actinomicetos foram repicadas para meio AGS (*Arginine-Glycerol-Mineral Salt Agar*) (Poter, 1960), sendo estas incubadas a 30 °C por 12 a 14 dias. Para a preservação dos isolados de actinomicetos, fez-se a raspagem das colônias com água estéril e o auxílio da alça de platina flambada. A suspensão de esporos foi transferida para aproximadamente 10 g de solo estéril (esterilizado em autoclave por 50 minutos, duas vezes consecutivas) em frascos de vidro tipo penicilina, sendo estes vedados com tampa de borracha e filme PVC e mantidos em temperatura ambiente. As suspensões de esporos também foram transferidas para glicerol estéril na concentração final de 20 %, em tubos criogênicos com tampa de rosca, sendo estes mantidos a temperatura de -20 °C.

As populações de actinomicetos e de bactérias totais no solo e raízes foram estimadas pela contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). Este cálculo foi resultante da seguinte fórmula: $\text{UFC.g}^{-1} \text{ solo seco} = N \times 10 \times F \times Y$, sendo: N = número de colônias, F = 20 (fator de correção do plaqueamento de 50 mL de suspensão por placa para 1 mL de suspensão), Y = fator de diluição da amostra. Para a análise estatística, os dados foram transformados em $\log(x + 1)$, em que x corresponde ao número de UFC. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2000), sendo realizada a análise de variância e, em seguida, a comparação das médias pelo teste de Tukey (Tukey, 1962) a 5 % de probabilidade. A quantificação da densidade populacional de bactérias totais e actinomicetos foi realizada duas vezes e os experimentos foram analisados separadamente.

Diversidade genética dos actinomicetos

1. Extração de DNA

Para extração de DNA, 38 isolados de actinomicetos obtidos das amostras de raízes e de solo de cacauzeiro e da coleção de culturas do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola da UFRB, foram crescidos em frascos de Erlenmeyer contendo 30 mL de meio líquido de Amido-Caseína (Kuster & Williams, 1964) e após 20 dias de crescimento foram centrifugados a 14 000 rpm por 15 minutos para coleta das células, que foram liofilizadas por 18 horas. Após a liofilização, o micélio foi macerado em cadinho de porcelana em contato com N₂ líquido. Em seguida, foram adicionados aproximadamente 20 mg do macerado em tubos de microcentrífuga de 2,0 mL para a extração do DNA através do método do pó de vidro (*glass dust*) descrito por Rehner & Buckley (2003). A fase aquosa da extração foi transferida para novos tubos e o DNA foi precipitado usando isopropanol. O DNA foi ressuscitado em 80 µl de água contendo RNase na concentração de 40 µg/ml e incubado em banho-maria por meia hora a 37 °C para a completa ressuspensão.

Bandas de DNA genômico total, separadas por eletroforese em gel de agarose 0,8 %, foram usadas para a quantificação e como indicadores da integridade do DNA extraído.

2. Sequenciamento e análise das sequências obtidas

Para a identificação molecular e análises filogenéticas, foram utilizadas sequências de fragmentos do gene *rpoB*, amplificadas através dos *primers* SRPOF1 e SRPOR1 (Kim et al., 2004). As amplificações de PCR foram realizadas em um volume total de 50 µl contendo 50 mM de KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 mM de cada dNTP (Promega, Madison, WI, USA), 20 pmol de cada primer, 6 µl de DNA genômico (10ng. µl⁻¹), e 2 U de Taq DNA *polimerase* (Phonutria). Todas as amplificações de PCR foram feitas em um termociclador PTC-100 (MJ Research Inc., Watertown, MA). As amplificações consistiram de uma desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, 10 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 segundos, anelamento de primer a 58 °C por 45 segundos, diminuindo 1 °C a cada ciclo sucessivo, alongamento a 72 °C por 1 minuto,

seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 segundos, anelamento a 48 °C por 45 segundos, alongamento a 72 °C por 1 minuto e uma extensão final de 72 °C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose de baixo ponto de fusão (NuSieve) a 1,5 %. Em seguida, as bandas foram cortadas do gel, congeladas a -80 °C por 1 hora e centrifugadas por 15 minutos a 1400 rpm em uma microcentrífuga (Eppendorf, modelo 5417R). O sobrenadante foi utilizado diretamente para o sequenciamento com os *primers* anteriormente utilizados para a amplificação. O sequenciamento foi feito com o *BigDye Deoxy terminator sequencing kit* (Applied Biosystems), de acordo com as recomendações do fabricante, em um volume total de 5 µl, contendo 0,5 µl de *BigDye Deoxy terminator sequencing kit* (Applied Biosystems), 1 µl de tampão de sequenciamento (5X), 2 pmol de *primer* e 30 ng de DNA. As reações de sequenciamento foram feitas em um termociclador PTC-100 e consistiram na desnaturação inicial de 95 °C por 2 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos, anelamento a 58 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 4 minutos. Após a amplificação, as amostras foram precipitadas com 20 µl de isopropanol a 65 % e a seguir permaneceram em ambiente protegido de luz, à temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, as placas de 96 poços contendo as reações foram centrifugadas por 40 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado e a placa invertida sobre papel toalha. Acrescentou-se 100 µl de etanol 60 % e centrifugou-se à mesma velocidade por 8 minutos. O etanol foi descartado e a placa foi centrifugada sobre o papel toalha a 700 rpm por 10 segundos para remover o excesso de etanol. Após secagem a temperatura ambiente por 15 minutos, foram adicionados 10 µl de formamida a cada amostra e a placa colocada no termociclador para a desnaturação a 94 °C por 3 minutos. Após essa etapa, a placa foi levada para o Sequenciador Automático de DNA, modelo ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer.

Para a análise das seqüências provenientes dos dois *primers* (*forward* e *reverse*), foi utilizado o programa BioEdit versão 5.0.9 (Hall, 1999) para unir as seqüências. Os alinhamentos foram feitos com o programa MEGA versão 3.1 (Kumar et al., 2004). O programa BLAST (Altschul et al., 1997) foi utilizado para comparar as seqüências de cada isolado com aquelas encontradas nos bancos de dados públicos.

As seqüências dos seguintes acessos foram encontradas nos bancos de dados públicos e utilizadas para fim de comparação com as seqüências dos isolados estudados: *Streptomyces coelicolor* (AY280745), *S. albiflavus* (DQ978980), *S. netropsis* (AY280782), *S. fradiae* (AY280750), *S. violaceusniger* (DQ242003), *S. purpureus* (AY280795), *S. lividans* (AY280745), *S. coelicolor* (AL939121), *S. setonii* (AY280766), *S. violaceusniger* (DQ242003), *S. violaceusniger* (DQ241994) e *Micromonosporae chinospora* (AY280788).

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

Caracterização fisiológica dos actinomicetos

1. Produção de Xilanase e Celulase

Foi avaliada a presença da atividade xilanolítica e celulolítica de 26 isolados de actinomicetos: Act 32, Act 35, Act 36, Act 37, Act 38, Act 39, Act 40, Act 41, Act 42, Act 46, Act 47, Act 48, Act 49, Act 51, Act 52, Act 53, Act 54, Act 55, Act 56, Act 57, Act 58, Act 59, Act 61, Act 63, Act 65 e Act 66. Estes foram isolados de solo e de raízes de cacauzeiro, dos jardins clonais da CEPLAC e do Instituto Biofábrica de Cacau (IBC), Ilhéus, BA, conforme descrito acima. As atividades enzimáticas foram determinadas conforme metodologia descrita por Lewis (1988). Os isolados foram multiplicados em meio mínimo de sais (Tuite, 1969), suplementado com xilana (Sigma) ou celulose microcristalina (Vetec) como única fonte de carbono e incubadas em câmara B.O.D. ($28 \pm 2^\circ\text{C}$), durante aproximadamente 10 dias. Após este período, foram adicionados 10 mL da solução vermelho congo 0,5 % em cada placa, seguido de incubação a temperatura ambiente por 15 minutos. Após a incubação, foi removido o excesso da solução de vermelho congo e adicionados 10 mL da solução salina (NaCl a 1 M) em cada placa, sendo estas mantidas a temperatura ambiente por 30 minutos. Após a remoção da solução salina, observou-se a formação ou não de uma zona de hidrólise de coloração alaranjada em torno das colônias, indicando a redução da concentração do polímero.

2. Produção de Quitinase

Para detectar a produção de quitinase pelos isolados de actinomicetos, utilizou-se a metodologia descrita por Renwick et al. (1991). Os actinomicetos foram multiplicados em meio mínimo de sais (Tuite, 1969), suplementado com quitina coloidal (Hsu & Lockwood, 1975) como única fonte de carbono. As culturas foram incubadas em câmara B.O.D. ($28 \pm 2^\circ\text{C}$) durante 10 dias. Após este período, a atividade quitinolítica dos isolados foi detectada pela visualização de uma zona de hidrólise hialina em torno das colônias crescidas.

3. Solubilização de Fosfato Inorgânico

A capacidade de solubilização de fosfato de cálcio foi determinada segundo o método proposto por Katznelson & Bose (1959). Os 26 isolados listados acima foram cultivados em meio de cultura triptocaseína de soja ágar (10 %) acrescido de CaHPO_4 e incubados em câmara B.O.D. a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 7 dias. Após esse período, a solubilização do fosfato foi detectada pela formação de uma zona de solubilização de aspecto opaco em torno das colônias dos isolados de actinomicetos.

4. Produção de Ácido Indolacético

A capacidade de produção de ácido indolacético foi determinada segundo o método proposto por Bric et al. (1991) para os isolados de actinomicetos listados acima. Estes foram crescidos em meio triptocaseína de soja (10 %), acrescido de 5 mM de L-triptofano. Posteriormente, as colônias foram cobertas por uma membrana de nitrocelulose e as placas incubadas em câmara B.O.D. a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ por 10 dias. Após incubação, as membranas foram removidas e saturadas com solução de Salkowski (Gordon e Welber, 1951). Os isolados que formaram um halo de coloração avermelhada na membrana no período de 30 minutos, foram considerados produtores de ácido indolacético.

Promoção de crescimento de mudas de cacauero

Para avaliar o efeito da inoculação e incubação do substrato com isolados de actinomicetos no crescimento de mudas de cacau propagadas

vegetativamente, foram conduzidos dois experimentos. No primeiro experimento foram avaliados seis isolados de actinomicetos, sendo dois oriundos de raízes de cacauero (Act 18 e Act 28) e quatro isolados (AC 26, AC 92, AC 95 e AC 103) provenientes da coleção de culturas do Laboratório de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola da UFRB, selecionados como potenciais agentes de promoção de crescimento para o tomateiro (Lima, 2003; Sousa et al., 2006). Este experimento foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado com sete tratamentos sendo seis isolados de actinomicetos e uma testemunha, utilizando-se quatro repetições e quatro plantas por parcela. A testemunha foi composta por substrato incubado com água, sem inoculação com actinomicetos e a estaca de cacauero tratada com AIB (ácido indolbutírico) na concentração de 6.000 mg.kg^{-1} , conforme o protocolo do IBC.

No segundo experimento avaliou-se o efeito de sete isolados de actinomicetos oriundos de raízes de cacauero (Act 45, Act 48, Act 52, Act 53, Act 58, Act 61 e Act 62). Este foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado com oito tratamentos, sendo sete isolados de actinomicetos e uma testemunha sem inoculação, utilizando-se cinco repetições e quatro plantas por parcela. A testemunha foi constituída por substrato incubado com água, sem inoculação com actinomicetos e a estaca tratada com AIB, conforme descrito acima.

Em ambos os experimentos, para obtenção do inóculo, os isolados foram cultivados em meio AGS sólido por um período de 12 dias em câmara B.O.D. a 30°C e posteriormente foram multiplicados em arroz umedecido e esterilizado, conforme descrito por Sousa (2006). Após este período, o substrato composto por serragem de madeira misturado com areia lavada na proporção de 9:1 (V/V), conforme recomendações do CEPEC/CEPLAC (Sodré, 2006), foi inoculado com os isolados de actinomicetos e incubado por um período de 30 dias. Para tanto, foi adicionado 1 L de suspensão de cada isolado para 8 kg de substrato, sendo esta preparada conforme descrito por Sousa et al. (2006). O substrato foi mantido em bandejas plásticas em casa de vegetação por um período de 30 dias, mantendo-se a umidade na capacidade de campo, com a adição de água potável.

No primeiro experimento, após os 30 dias de incubação, o substrato foi distribuído em sacos pretos de polietileno de 15 x 0,9 cm, colocando-se 500 cm³ de substrato por saco de muda. No segundo experimento, o substrato foi distribuído em vasos plásticos com capacidade para 500 cm³ de substrato. Para ambos os experimentos, mini-estacas de cacauero medindo aproximadamente 4 a 6 cm de comprimento foram retiradas de ramos plagiotrópicos de plantas do Clone CEPEC 2006, mantidas no banco de germoplasma do CEPEC/CEPLAC. Foi utilizada uma mini-estaca por saco de muda ou vaso e estes foram mantidos em câmara de nebulização com umidade em torno de 90 %, temperatura de 28 °C e com irrigação de 30 segundos a cada 15 minutos de intervalo. No vigésimo dia, foi aplicado 1 g por estaca do adubo Osmocote[®] de liberação lenta. Após o plantio, as estacas permaneceram por 45 dias em câmara de nebulização, sendo em seguida transferidas para casa-de-vegetação, permanecendo por mais 45 dias, sendo progressivamente reduzido o turno de irrigação em até três vezes ao dia.

Após 90 dias, avaliou-se a altura do lançamento (brotamento da estaca) (HL). A parte aérea e as raízes foram removidas do substrato, lavadas e secas em estufa de secagem com ventilação forçada a 65 °C por 72 horas, sendo posteriormente determinado o peso da matéria seca da haste (MSH), e da raiz (MSR). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste Scott & Knott a 5 % de probabilidade pelo programa Sisvar (Ferreira, 2000).

Foi realizada a análise da densidade populacional dos isolados de actinomicetos no substrato após a coleta das mudas. Para tanto, foram pesadas 10 g de substrato fresco de cada tratamento, com três repetições. Utilizou-se o método de diluição seriada e plaqueamento em meio Amido-Caseína-Ágar, como descrito anteriormente.

RESULTADOS

Densidades populacionais

Os dados de densidade populacional de bactérias totais e de actinomicetos são apresentados na Tabela 2. A densidade populacional de bactérias totais diferiu ($P < 0,05$) no solo e nas raízes de cacauero, para algumas amostras (Tabela 2). Na quantificação de actinomicetos não foram encontradas diferenças populacionais significativas entre as amostras de solo e de raízes de cacauero ($P < 0,05$), com valores médios de $1,0 \times 10^6$ UFC g^{-1} de solo e de $9,6 \times 10^5$ UFC g^{-1} de raízes. A porcentagem da população total de bactérias representada por actinomicetos variou de 0,3 a 5,2 % no solo e de 0,02 a 2,46 % nas raízes (Tabela 2).

Tabela 2. Densidade populacional de bactérias totais e actinomicetos em solo e raízes de cacauero.

Amostras ²	Densidade Populacional (UFC.g ⁻¹ solo seco) ¹					
	Bactérias		Actinomicetos		Relação Actinomicetos/Bactérias	
	Solo	Raízes	Solo	Raízes	Solo	Raízes
Velho IBC	2,51x10 ⁷ a	5,28x10 ⁷ a	1,3x10 ⁶ a	1,3x10 ⁶ a	5,20 %	2,46 %
Novo IBC	1,90x10 ⁸ a	8,23x10 ⁸ a	5,6x10 ⁵ a	8,2x10 ⁵ a	0,30 %	0,10 %
Velho CEPLAC	1,53x10 ⁸ a	1,21x10 ⁹ b	5,3x10 ⁵ a	2,1x10 ⁵ a	0,34 %	0,02 %
Novo CEPLAC	2,10x10 ⁸ a	7,07x10 ⁸ a	1,6x10 ⁶ a	1,5x10 ⁶ a	0,76 %	0,21 %

¹Médias seguidas da mesma letra nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. ²Amostras coletadas no IBC e na Ceplac em áreas de plantio de cacauero com menos de três anos de idade (Novo) e com mais de três anos de idade (Velho).

Identificação e análise filogenética

A análise das seqüências de 315 pb alinhadas, pertencentes à região da β -subunidade do gene *rpoB*, indicaram serem os isolados de actinomicetos pertencentes ao gênero *Streptomyces*. Observa-se na árvore filogenética

(Figura 1) a formação de cinco grupos entre os isolados de *Streptomyces* associados ao cacauero. A comparação entre as sequências destes isolados e dos isolados da coleção de culturas do Laboratório e as sequências encontradas nos bancos de dados públicos, mostra identidade de 97 % para os isolados Act 46, Act 58, Act 42, Act 65, Act 38, Act 56, Act 43, Act 36, Act 62, Act 35, AC 95, Act 53, Act 57, Act 39, Act 31, Act 48, Act 47, Act 59, Act 54, Act 40, Act 66, Act 52, Act 61, Act 60, Act 32 e *Streptomyces coelicolor* (AY280745). Para Act 11, Act 41 e Act 9, as sequências obtidas apresentaram até 94 % de identidade quando comparadas com as sequências do acesso *S. albidiflavus* (DQ978980). A mesma identidade (94 %) foi encontrada para Act 37, Act 45 e *S. violaceusniger* (DQ242003). Para o isolado Ac 103 e *S. purpureus* (AY280795) foi encontrada identidade de 93 %. Identidade de 92 % foi obtida entre o isolado AC 26 e *S. violascens* (AY280773) e para Act 30 e *S. netropsis* (AY280782). Para os isolados AC 29, Act 50, Act 49 e *S. fradiae* (AY280750) a identidade foi de 91 % e de 84 % entre Act 28 e *S. violaceusniger* (DQ241994).

Caracterização fisiológica dos actinomicetos

A maioria dos isolados de *Streptomyces* spp. testados apresentaram a capacidade de produção de celulase, xilanase e quitinase, de solubilização de fosfato e produção do ácido indolacético (Tabela 3). Todos os isolados de *Streptomyces* spp. apresentaram atividade celulolítica (Figura 2). Dentre os 26 isolados testados, 24 apresentaram produção de xilanase (Figura 3). Com exceção de Act 36, Act 46, Act 49 e Act 51, todos os isolados apresentaram atividade quitinolítica (Figura 4). Nos testes de solubilização de fosfato de cálcio, os isolados Act 32, Act 37, Act 41 e Act 61 não apresentaram a capacidade de solubilização deste mineral (Figura 5). Dentre os 26 isolados testados, 23 apresentaram a capacidade de produzir ácido indolacético (Tabela 3).

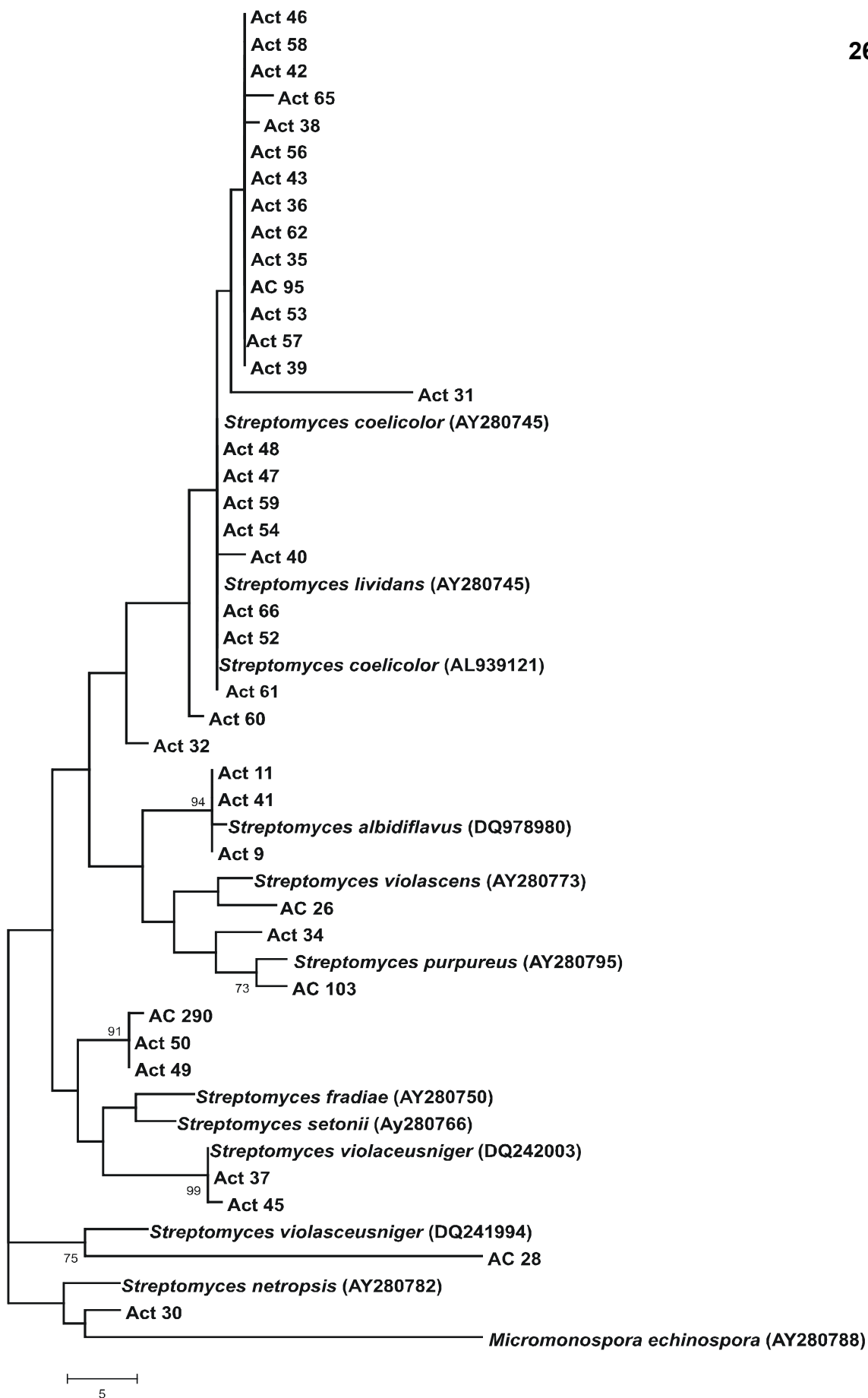


Figura 1. Filograma genético dos isolados de *Streptomyces* spp. baseado no alinhamento de 315 pb de nucleotídeos da β -subunidade do gene *rpoB*. O método utilizado para construção foi o da Máxima Parcimônia com os parâmetros de Jukes-Cantor. Os valores apresentados nas ramificações do filograma correspondem ao *bootstrap* e foram calculados com base em 1000 repetições. A escala indica o número de substituições de nucleotídeos por sítio.

Tabela 3. Produção de enzimas extracelulares, ácido indolacético (AIA) e solubilização de fosfato por 26 isolados de *Streptomyces* spp. associados ao cacauzeiro.

<i>Streptomyces</i> spp.*	Enzimas extracelulares			Solub. de Fosfato	Ácido Indolacético
	Celulase	Xilanase	Quitinase		
Act 32	+	-	+	-	+
Act 35	+	+	+	+	+
Act 36	+	+	-	+	-
Act 37	+	+	+	-	+
Act 38	+	+	+	+	+
Act 39	+	+	+	+	+
Act 40	+	+	+	+	+
Act 41	+	-	+	-	+
Act 42	+	+	+	+	+
Act 46	+	+	-	+	+
Act 47	+	+	+	+	+
Act 48	+	+	+	+	+
Act 49	+	+	-	+	+
Act 51	+	+	-	+	-
Act 52	+	+	+	+	+
Act 53	+	+	+	+	+
Act 54	+	+	+	+	+
Act 55	+	+	+	+	+
Act 56	+	+	+	+	+
Act 57	+	+	+	+	+
Act 58	+	+	+	+	+
Act 59	+	+	+	+	+
Act 61	+	+	+	-	+
Act 63	+	+	+	+	-
Act 65	+	+	+	+	+
Act 66	+	+	+	+	+

*Os isolados foram cultivados em meio mínimo de sais com os respectivos substratos para as enzimas e a atividade foi verificada através da presença de zonas de hidrólise em torno das colônias para a produção das enzimas celulase, xilanase e quitinase. Para a capacidade de solubilização de fosfato, foi utilizado o meio de cultura triptocaseína de soja ágar (10 %) acrescido de CaHPO_4 , a atividade foi observada pela formação de zona de solubilização de aspecto opaco em torno das colônias. Para produção de AIA utilizou-se o meio triptocaseína de soja (10 %), acrescido de 5 mM de L-triptofano e a atividade foi indicada pela presença de halo avermelhado na membrana de nitrocelulose. O sinal positivo indica produção e o negativo a não produção das enzimas extracelulares, ácido indolacético e solubilização de fosfato.

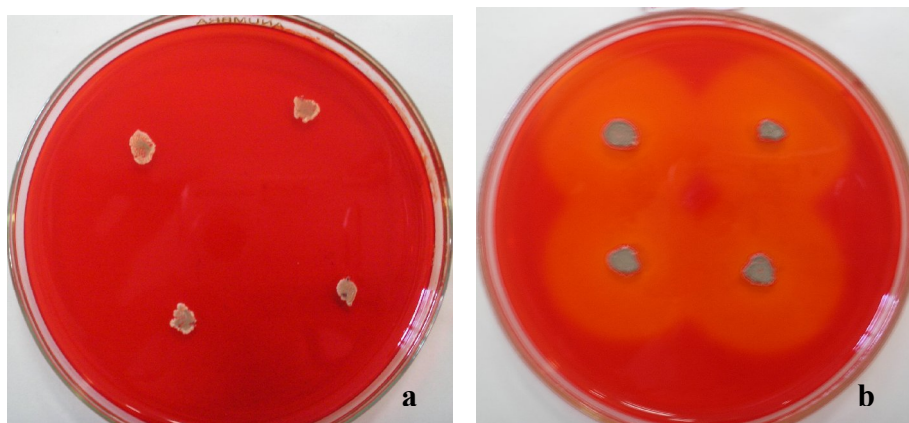


Figura 2. Teste para produção de celulase pelos isolados de *Streptomyces* spp.: (a) Negativo para produção de celulase, (b) Positivo para produção de celulase.

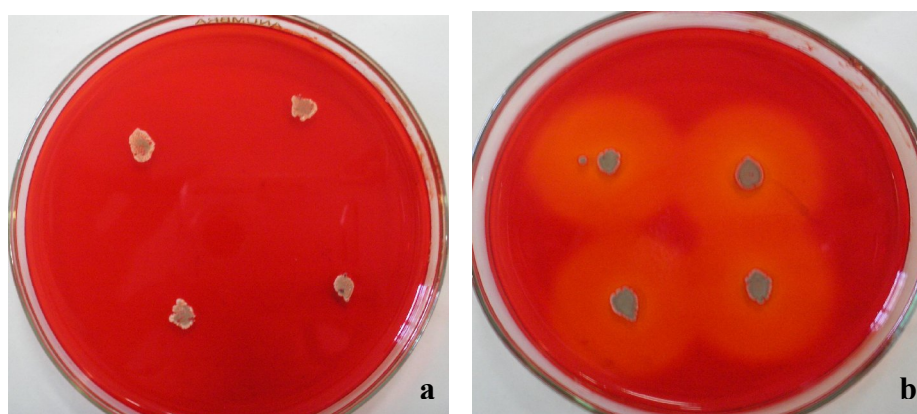


Figura 3. Teste para produção de xilanase pelos isolados de *Streptomyces* spp.: (a) Negativo para produção de xilanase, (b) Positivo para produção de xilanase.

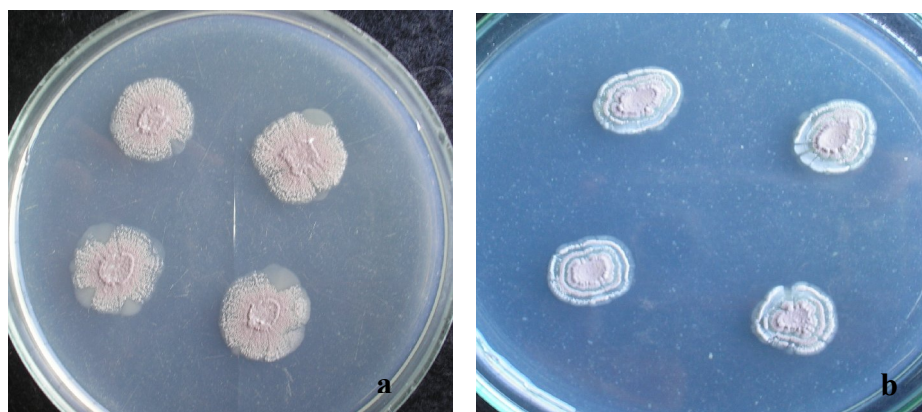


Figura 4. Teste para produção de quitinase pelos isolados de *Streptomyces* spp.: (a) Negativo para produção de quitinase, (b) Positivo para produção de quitinase.

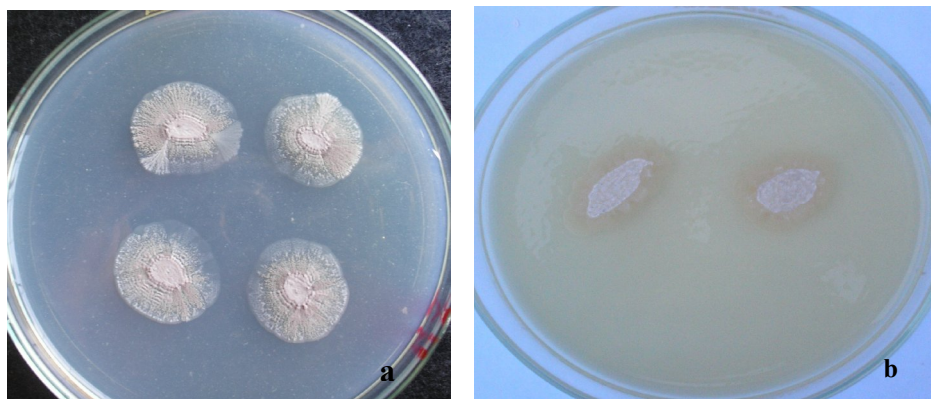


Figura 5. Teste para solubilização de fosfato por isolados de *Streptomyces* spp. (a) Negativo para solubilização, (b) Positivo para solubilização.

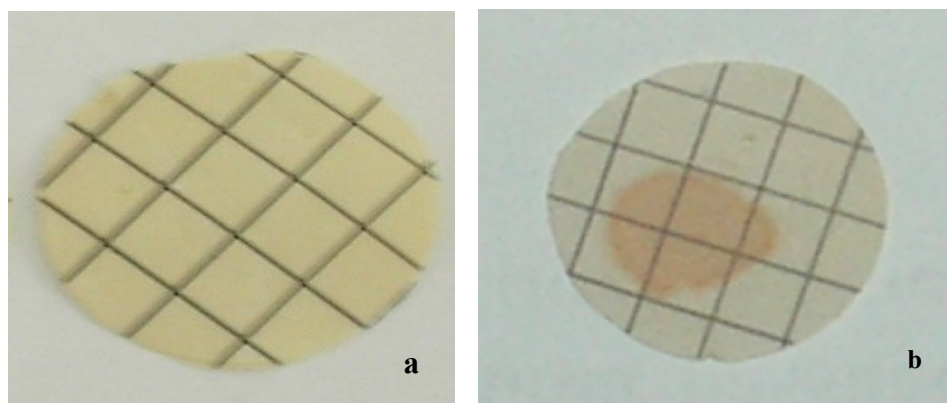


Figura 6. Teste para produção de ácido indolacético (AIA) por isolados de *Streptomyces* spp. (a) Negativo, (b) Positivo.

Promoção de crescimento de mudas de cacauero

Para o primeiro experimento, apenas os isolados AC 103 e AC 26 promoveram incrementos significativos na altura do lançamento das mudas de cacauero em 117,7 % e 68,3 %, respectivamente, quando comparados com a testemunha. Para os isolados Act 18, Act 28, AC 92 e AC 95, não foram observadas diferenças significativas, quando comparados com a testemunha, para a matéria seca do brotamento das estacas (lançamento) e das raízes (Figura 7).

A densidade populacional dos isolados de *Streptomyces* spp. no substrato revelou populações de $3,97 \times 10^4$, $3,21 \times 10^4$, $0,7 \times 10^4$, $1,09 \times 10^4$, $2,38 \times 10^4$ e 5×10^4 UFC/g solo seco para os isolados Act 18, AC 26, Act 28, AC 92, AC 95 e AC 103, respectivamente.

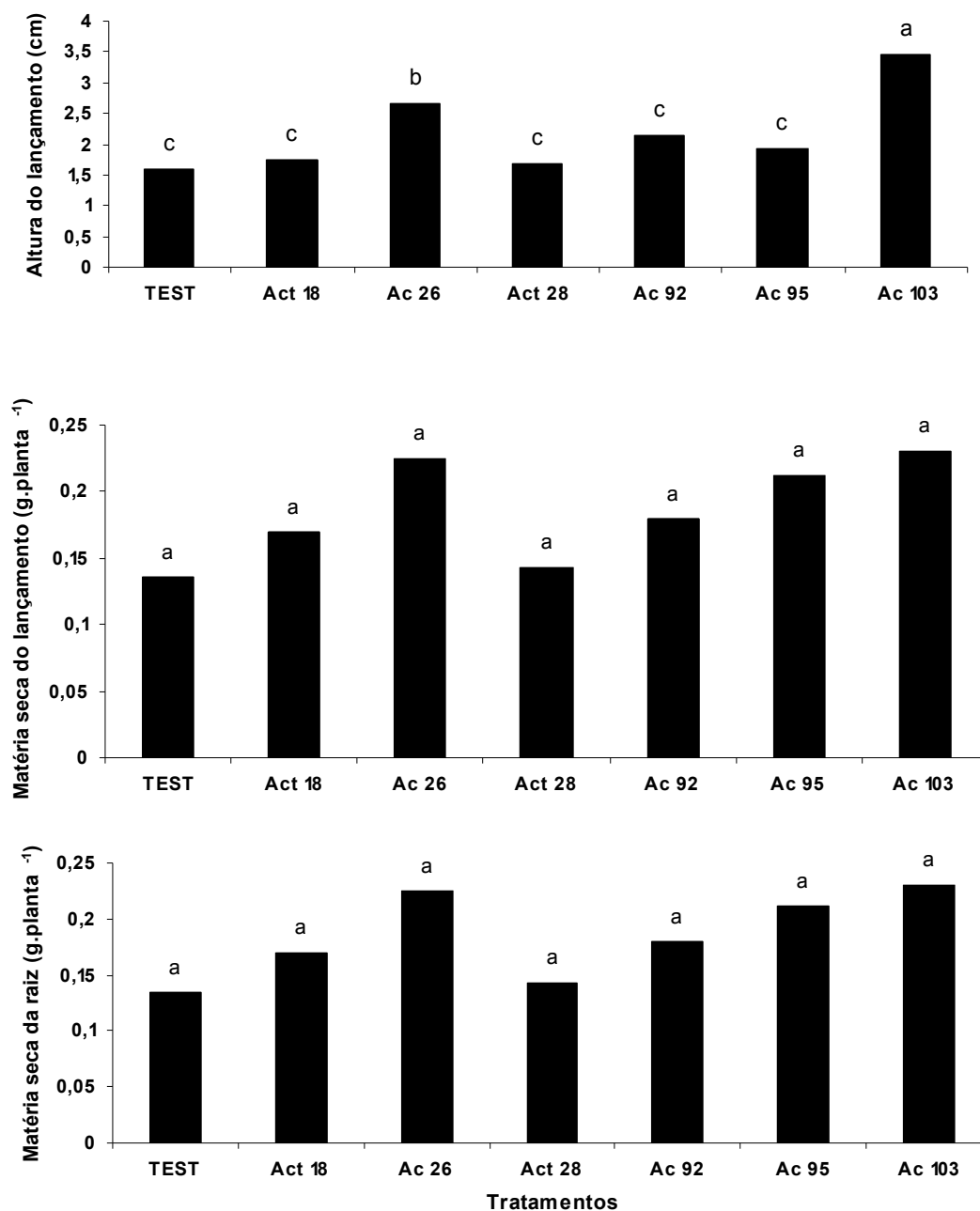


Figura 7. Crescimento de mudas de cacauero cultivadas em substrato incubado com actinomicetos. O substrato utilizado foi composto por serragem e areia incubado por 30 dias com os isolados de *Streptomyces* spp. Act 18, AC 26, Act 28, AC 92, AC 95 e AC 103. O tratamento testemunha (TEST) foi formado por estacas tratadas com ácido indolbutírico (AIB) e plantadas em substrato sem inoculação com actinomicetos. As avaliações foram feitas 90 dias após a instalação do experimento. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Scott & Knott ($P < 0,05$).

No segundo experimento não foi constatada diferença significativa entre os isolados de actinomicetos avaliados e a testemunha ($P < 0,05$), para a altura e matéria seca do lançamento (Figura 8).

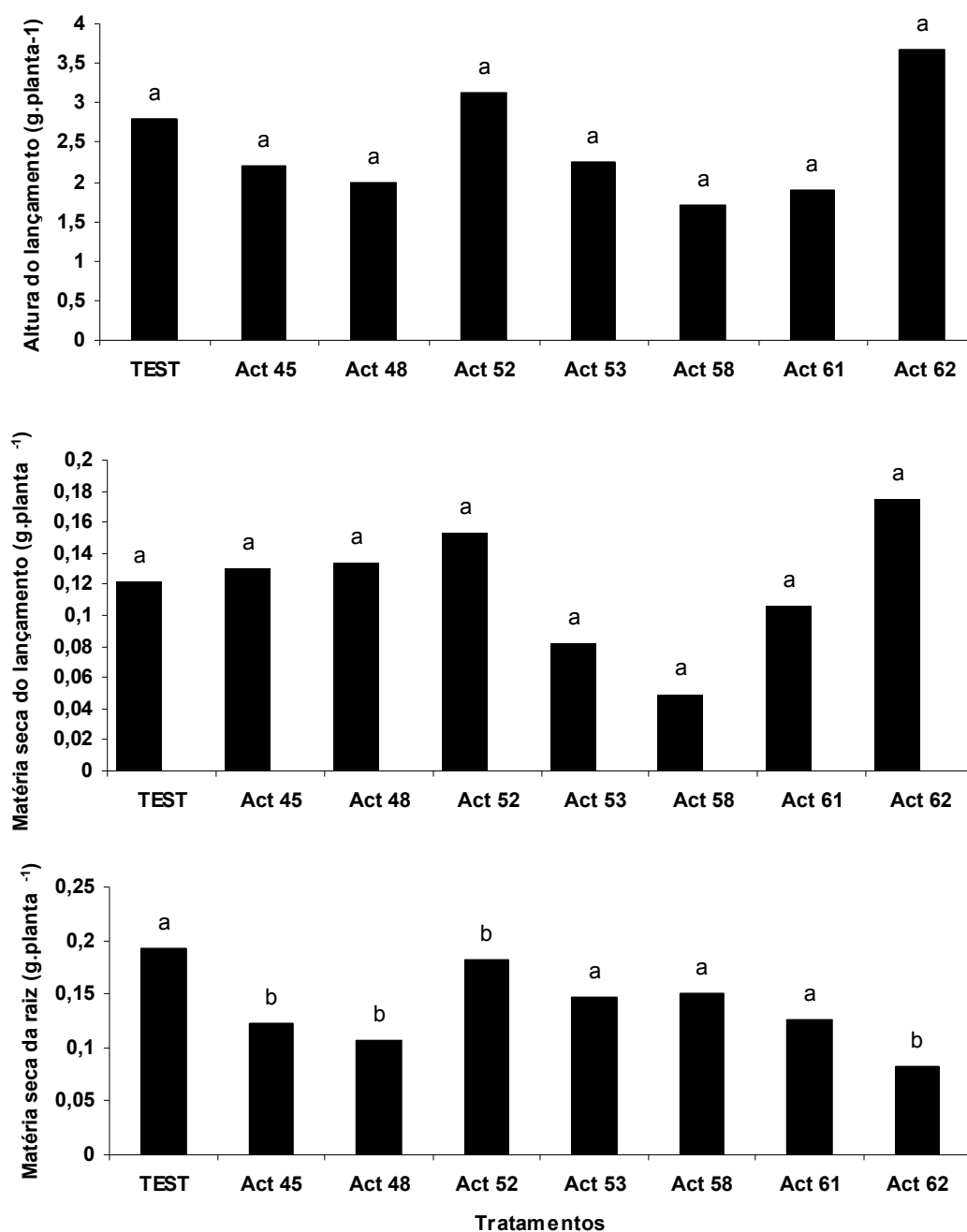


Figura 8. Crescimento de mudas vegetativas de cacauero em substrato incubado com isolados de actinomicetos. O substrato foi composto por serragem e areia, incubado por 30 dias com isolados de *Streptomyces* spp. Act 45, Act 48, Act 52, Act 53, Act 58, Act 61, Act 62. O tratamento testemunha (TEST) foi formado por estacas tratadas com ácido indolbutírico (AIB) e plantadas em substrato sem inoculação com actinomicetos. A avaliação foi realizada após 90 dias. Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste de Skott & Knott ($P < 0,05$).

Para matéria seca da raiz, as mudas produzidas em substrato inoculado e incubado com os isolados Act 52, Act 53 e Act 58 apresentaram valores semelhantes ao da testemunha, enquanto que as mudas produzidas nos substratos tratados com os isolados Act 45, Act 48, Act 61 e Act 62 apresentaram valores inferiores à testemunha.

A quantificação dos isolados de *Streptomyces* spp. no substrato, após a coleta das mudas, revelou as seguintes densidades populacionais: $5,0 \times 10^4$, $4,3 \times 10^4$, $4,7 \times 10^4$, $5,2 \times 10^4$, $3,8 \times 10^4$, $1,0 \times 10^4$ e $2,1 \times 10^4$ UFC/g solo seco, para os isolados Act 45, Act 48, Act 52, Act 53, Act 58, Act 61 e Act 62, respectivamente.

DISCUSSÃO

Apesar da grande importância na agricultura dos microrganismos do solo, benéficos às plantas, nenhuma informação existe sobre a variabilidade genética e densidade populacional de actinomicetos associados à rizosfera de cacauero. Neste estudo, investigou-se a densidade populacional e a diversidade genética de actinomicetos associados à rizosfera do cacauero, bem como a capacidade de produção de algumas enzimas, de solubilização de fosfato, produção de ácido indolacético e o efeito de alguns isolados sobre o crescimento de mudas de cacauero propagadas vegetativamente. A identificação dos isolados como espécies do gênero *Streptomyces* já era esperada, uma vez que aproximadamente 90 % dos actinomicetos encontrados no solo e em raízes pertencem a este gênero (Gava & Neves, 2007). Atualmente, a identificação de actinomicetos ao nível de espécie é muito difícil, devido à falta de trabalhos completos de sistemática molecular para este grupo de microrganismos. São mais de 3000 espécies descritas de actinomicetos e não se sabe quais espécies são válidas (Christova et al., 1995).

A quantificação de bactérias totais nas amostras de solo e de raízes revelou maior população nas amostras da CEPLAC, dos plantios novo e velho, tanto em solo quanto em raízes, quando comparadas aos valores obtidos para as amostras do IBC, de ambos os plantios. Para actinomicetos, não foram observadas diferenças populacionais entre as amostras dos dois locais (Ceplac e IBC) e nem entre as amostras de solo e de raízes de cacauero. Em geral, a influência da rizosfera sobre as populações de actinomicetos é menor do que

sobre as populações das demais bactérias, visto que esses são microrganismos de crescimento lento com baixa capacidade competitiva (Pereira, 2000). O estudo de correlação entre a população de bactérias e actinomicetos nas amostras de solo e de raízes, indicou uma correlação positiva, porém não significativa.

Em geral, os actinomicetos são produtores de celulase, como foi observado nos testes *in vitro* com 26 isolados de solo ou raiz de cacaueteiro (Tabela 3). A produção de celulase tem um papel importante na degradação da matéria orgânica de origem vegetal, podendo ser este um dos mecanismos que atuam na promoção de crescimento de plantas por estes microrganismos. Murashima et al. (2002) descrevem a celulose como um dos componentes mais abundantes da biomassa vegetal, composto de moléculas de glicose unidas através de ligações glicosídicas β (1-4), formando cadeias lineares, longas e rígidas (Moreira & Siqueira, 2002) e que pode ser degradada por uma série de microrganismos mediante a ação da celulase. A ação da celulase (β -1,4 glucosidase) ocorre com a clivagem da celulose, molécula complexa e recalcitrante, desdobrando-a em um dissacarídeo chamado celobiose e uma glicose. As reações envolvidas na degradação da celulose do solo tornam o carbono disponível para o crescimento de microrganismos (Deng & Tabatabai, 1994). Os microrganismos que são capazes de degradar este composto, a exemplo dos isolados de *Streptomyces* spp. avaliados neste trabalho, podem ter um papel importante na degradação da matéria orgânica do solo, beneficiando o desenvolvimento de plantas pela disponibilização de nutrientes, podendo ter ação também de biocontrole de fitopatógenos que possuem celulose na sua parede celular (Berg et al., 2000).

A capacidade de degradação da xilana não foi observada nos isolados Act 41 e Act 32. Para os demais, constatou-se atividade xilanolítica, correspondendo a 92 % do total de isolados avaliados. A xilana é o segundo maior constituinte das plantas e sua estrutura básica consiste de uma cadeia principal linear de resíduos β -D-xilopiranosil, unidos por ligações glicosídicas β -1,4 (Haltrich et al., 1996). Esse polissacarídeo é degradado pelo complexo xilanolítico, as xilanases, que são enzimas extracelulares, produzidas principalmente por fungos e bactérias (Brochini, 2007), as quais atuam na decomposição da matéria orgânica. As xilanases agem clivando as ligações glicosídicas internas da cadeia principal da heteroxilana, resultando em uma diminuição no grau de polimerização do substrato (Sunna & Antranikian, 1997). A atividade xilanolítica é mais uma

característica dos actinomicetos que pode atuar na promoção de crescimento de plantas e, conseqüentemente, pode ter influenciado no crescimento das mudas de cacauero produzidas em substrato inoculado com esses actinomicetos.

Dos isolados de *Streptomyces* spp. testados, 22 apresentaram atividade quitinolítica. A quitinase degrada a quitina pela quebra das ligações glicosídicas β , -1,4 existentes nos polímeros de N-acetilglucosamina (Cohen-Kupiec, 1998). Nos testes de avaliação da solubilização de fosfato de cálcio pelos actinomicetos, 84,6 % dos isolados apresentaram atividade positiva. O fósforo (P) é um elemento essencial para os seres vivos, desempenhando várias funções, tanto estruturais quanto funcionais (Domingos et al., 2003). No solo, o P é encontrado nas formas orgânicas (P-org), geralmente formando complexos com a matéria orgânica do solo e inorgânica (Pi), representada principalmente pela fração fosfato (PO_4^-). Tendo em vista a sua baixa disponibilidade nos solos, particularmente nos solos brasileiros, o P é um dos componentes essenciais e mais críticos para a nutrição de plantas e microrganismos, depois do nitrogênio (Domingos et al., 2003). Bactérias, fungos e actinomicetos, envolvidos nos processos de solubilização do P inorgânico, excretam ácidos orgânicos que atuam dissolvendo diretamente o material fosfático ou quelando os cátions que acompanham o ânion fosfato (Kucey, 1983).

Na avaliação da produção do ácido indolacético, 84,6 % dos isolados de *Streptomyces* demonstraram ser produtores deste hormônio que atua no crescimento vegetal. Isto é mais um dos mecanismos de promoção de crescimento vegetal que estes microrganismos podem oferecer quando associados ao cultivo de plantas. O ácido indolacético afeta a morfologia das raízes, aumentando o comprimento e o número de pêlos radiculares (Barbieri et al., 1986), tornando as plantas menos susceptíveis ao déficit hídrico e à escassez de nutrientes (Cattelan, 1999). A produção desta auxina por actinomicetos pode ter influenciado o crescimento das mudas de cacauero. Neste trabalho, foram observados incrementos na produção de massa seca da raiz e da parte aérea e também foram observados valores semelhantes à testemunha tratada com o ácido indolbutírico.

Este estudo sobre o crescimento de mudas de cacauero produzidas por estaquia, em substrato alternativo (pó se serragem com areia lavada) inoculado e incubado com isolados de *Streptomyces* spp., mostrou efeitos benéficos ao

crescimento das mudas de cacaueteiro, evidenciado pelo incremento na altura do lançamento das mudas de 117,7 % e 68,3 %, proporcionado pela inoculação do substrato com os isolados AC 103 e AC 26, respectivamente. Trabalhos com isolados de *Streptomyces* spp. em tomateiro também demonstraram incrementos significativos, com valores entre 96,9 % e 165 % para altura das plantas e entre 31,6 % e 51,3 % para matéria seca das raízes, além de um efeito de biocontrole da meloidoginose no tomateiro (Sousa et al., 2006). Outros autores também relataram a promoção de crescimento por estreptomicetos nesta cultura (Lima, 2003; Igarashi et al., 2003). Entretanto, para a cultura do cacaueteiro, não foram encontrados na literatura científica estudos com bactérias promotoras de crescimento de plantas.

Sousa (2006), avaliando o tempo de incubação do substrato Plantmax[®] com isolados de actinomicetos, demonstrou a necessidade de um período de incubação variando de 30 a 40 dias para que houvesse o efeito benéfico dos actinomicetos na promoção de crescimento do tomateiro. Este período está provavelmente associado ao ciclo de vida dos actinomicetos do gênero *Streptomyces* e a produção de enzimas extracelulares, a exemplo das celulasas, xilanases e outras que estão envolvidas na decomposição dos compostos orgânicos presentes no substrato e na liberação de nutrientes para a planta (Sousa, 2006; James et al., 1991). Os microrganismos são os principais responsáveis pela mineralização dos nutrientes do solo, tornando-os disponíveis na solução do solo (Lavelle, 2000). Além dessas enzimas extracelulares, os actinomicetos também produzem substâncias reguladoras de crescimento vegetal. Sousa (2006) demonstrou que os isolados AC 103 e AC 26 produzem ácido indolacético. Essas substâncias proporcionam o melhor desenvolvimento de raízes laterais e alongamento das raízes primárias (Oliveira et al., 2003) e, como consequência, proporcionam a melhor exploração do solo ou substrato pela planta (Cattelan & Hartel, 2000). A promoção de crescimento do sistema radicular, principalmente do crescimento de raízes secundárias e aumento dos pêlos radiculares, tem sido observada por diversos autores, em trabalhos com rizobactérias (Silveira, 2001).

Apesar dos isolados AC 26 e AC 103 terem sido obtidos e selecionados como promotores de crescimento de tomateiro (Lima, 2003; Sousa, 2006), estes foram capazes de induzir crescimento em mudas de cacaueteiro propagadas por

estaquia. Entretanto, o mesmo efeito de promoção não foi observado entre os isolados obtidos do cacauero. Isto se deve provavelmente à ausência de uma pré-seleção dos isolados para esta atividade, visto que a grande maioria das bactérias isoladas da rizosfera não apresenta a capacidade de promover o crescimento de plantas (Chen et al., 1996).

O substrato composto por serragem misturada com areia lavada mostrou-se promissor para produção de mudas de cacauero por estaquia. Este poderá substituir outros compostos comerciais de custo elevado, já que a serragem é proveniente de subprodutos de serrarias, sendo um material de baixo custo e disponível em elevadas quantidades na região, e apresenta boas características para o desenvolvimento de mudas (Sodré et al., 2005).

Os isolados de *Streptomyces* spp. AC 103 e AC 26, selecionados neste trabalho como os mais promissores deverão ser mais estudados, visando a sua possível utilização no processo de produção de mudas de cacauero por estaquia com o substrato alternativo pó de serra. Entretanto, outros fatores deverão ser analisados como o período de incubação do substrato, o qual foi definido anteriormente para o substrato Plantmax[®] (Sousa, 2006), devendo-se avaliar diferentes períodos para o substrato alternativo, considerando que este possui uma composição física e química diferente do Plantmax[®] que é composto por casca de *Pinus* sp. processada, vermiculita expandida, turfa processada e enriquecida e carvão granulado. O substrato alternativo inoculado com actinomicetos e enriquecido com nitrogênio e outros nutrientes ou com diferentes fontes de matéria orgânica também deverá ser avaliado, principalmente levando-se em consideração a relação C:N do substrato na época da inoculação e incubação com os actinomicetos. Outros fatores também poderão ser estudados como a avaliação do desenvolvimento das mudas após um período mais longo (superior a 90 dias) em casa de vegetação.

REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S.F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389–3402, 1997.

ANDEBRHAN, R.L. et al. Molecular fingerprinting suggests two primary outbreaks of witches' broom disease (*Crinipellis pernicioso*) of *Theobroma cacao* in Bahia, Brasil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 105:167-175, 1999.

ARAÚJO, J.M. Estratégias para isolamento seletivo de actinomicetos. In: MELO, I.S de ; AZEVEDO, J.L. (Eds.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA, 1998. p. 351-367.

BARBIERI, P. et al. Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. **FEMS Microbiology Letters**, v. 36, p. 87-90, 1986.

BERG, G. et al. Successful strategy for the selection of new strawberry-associated rhizobacteria antagonist to *Verticillium* wilt. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 1-10, 2000.

BOCCHINI, D.A. et al. **Aplicação de xilanase termoestável de *Bacillus* sp 1 no branqueamento da polpa kraft de *Eucalyptus***, Disponível em: <http://www.celuloseonline.com.br/imagembank/Docs/DocBank/dc/dc141.pdf>. Acesso em: 28 jan. 2007

CATTELAN, A.J.; HARTEL, P.G. Traits associated with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). **Tópicos em Ciência do Solo**, v. 1, p. 213-234, 2000.

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. (Eds.) **Management of soil born disease**, Ludhiana: Kalyani Publishers, p. 165-184, 1996.

CHRISTOVA, K.; SHOLEVA, Z.; CHIPEVA, V. Application of molecular biological methods in taxonomy of genus *Streptomyces*. **Journal of Culture Collections**, v. 1, p. 3-10, 1995.

COHEN-KUPIEC, R.; CHET, I. The molecular biology of chitin digestion. **Current Opinion Biotechnology**, Israel, v. 9, p. 270-277. 1998.

CONN, K.L., NOWAK, J.; LAZAROVITS, G. A gnotobiotic bioassay for studying interactions between potatoes and plant growth-promoting rhizobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 801-808. 1997.

DENG, S.P.; TABATABAI, M.A. Cellulase activity of soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, p.1347-1354, 1994.

DOMINGOS, J.B. et al. The chemistry of phosphate esters. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 745-753, 2003.

FASSBENDER, H. **Química de suelos com ênfases en suelos de América Latina**. San José, Costa Rica: IICA, 1982. 422 p.

FERMINO, M.H.; TRENTIN, A.L.; KÄMPF, A.N. Caracterização física e química de materiais alternativos para composição de substratos para plantas: 1.resíduos industriais e agrícolas.In: KÄMPF, A.N.; FERMINO, M.H. (Eds.). **Substratos para plantas: a base da produção vegetal em recipientes**. Porto Alegre: Genesis, 2000. p. 241-248.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 2000, São Carlos, **Programas e resumos**. São Carlos: UFSCar, 2000. v. 45, p. 255-258.

GAVA, C.A.T.; NEVES, M.C.P. **Populações de actinomicetos como componentes da comunidade bacteriana dos solos**. Disponível em: <<http://www.cnpab.embrapa.br/actino.html>>. Acesso em: jan. 2007.

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

HALTRICH, D. et al. Production of fungal xylanases. **Bioresource Technology**, v. 58, p. 137-161, 1996.

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

HSU, S.U. ; LOCKWOOD, J.L. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. **American Society for Microbiology**, v. 29, p. 422-426, 1975.

IGARASHI Y. et al. Secondary metabolites of endophytic actinomycetes with plant growth promoting activity. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE BIOLOGY OF ACTINOMYCETES, 13., 2003. **Abstracts...** 2003. p. 20.

JAMES, P.D.; EDWARDS, D.; DAWSON, M.J. The effects of temperature, pH and growth rate on secondary metabolism in *S. thermoviolaceus* grow in chemostat. **Journal General Microbiology**, v. 137, p. 1715-1720, 1991.

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

KENNEDY, A.C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 74, p. 65-76, 1999.

KIM, B. J. et al. Phylogenetic analysis of the genera *Streptomyces* and *Kitasatospora* based on partial RNA polymerase b-subunit gene (*rpoB*) sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 593–598, 2004.

KIM, B.J. et al. Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 1714–1720. 1999.

KUCEY, R.M.N. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 63, p. 671-678, 1983.

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

KUSTER, E.; WILLIAMS, S.T. Selection of media for isolation of estrepotomycetes. **Nature**, v. 202, p. 928 – 929, 1964.

LAVELLE, P. Ecological challenges for soil science. **Soil Science**, Washington, v. 165, n. 1, p. 73-86, 2000.

LAZAROVITZ, G.; NOWAK, J. Rhizobacterium for improvement of plant growth and establishment. **Hortscience**, v. 32, p. 188-192. 1997.

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

LEWIS, K.J. **Biological control mechanism of the mycoparasite**. *phytium oligandum*. Thesis (PhD) - University of Sheffield, Sheffield, 1988.

LIMA, J.L. **Seleção de actinomicetos para o controle biológico de *Ralstonia solanacearum* e promoção de crescimento de mudas de tomateiro**. 2003. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Escola de Agronomia, Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2003.

MARIANO, R.L.R. et al. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 1, p. 89-111, 2004.

MARROCOS, P.C.L., SODRÉ, G.A. Sistema de produção de mudas de cacauzeiros. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE SUBSTRATO PARA PLANTAS, 4., 2004, Viçosa-MG. **Anais..** Viçosa, MG: UFV, 2004. p. 283-310.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002. 626 p.

MUYZER, G.; WAAL, E.C.; UITTERLINDEN. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.

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

PADILHA, G. Biologia molecular de *Streptomyces* e aplicações industriais. In: MELO, I.S. de; AZEVEDO, J.L. (Eds.). **Ecologia microbiana**, Juaguariúna, EMBRAPA –CNPMA, 1998. p. 327-343.

PEREIRA, J.C. **Interações entre as populações de actinomicetos e outros organismos na rizosfera**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. 15p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 118).

POTER, J.N.; WILHELM, J.J.; TRESNER, H.D. Method for the preferential isolation of actinomycetes from soils. **Applied Microbiology**. v. 8, p. 174-178, 1960.

PRAMER, D.; SCHMIDT, E.L. **Experimental soil microbiology**. Minnesota: Burgess, 1964. 107 p.

REHNER, S.A.; BUCKLEY, E.P. "Isolation and characterization of microsatellite loci from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales). **Molecular Ecology Notes**, p. 409-411, 2003

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

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

SODRÉ, G.A. et al. Características químicas de substratos utilizados na produção de mudas de cacauzeiros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 27, n. 3, p. 514-516, 2005.

SODRÉ, G.A.; CORÁ, J.E.; PEREIRA, A.B. Substratos na produção de mudas de cacauzeiros. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL DE PESQUISA EM CACAU, 15. 2006, São José, Costa Rica. **Anais...** 2006.

SOUSA, C.C. **Estreptomicetos promotores de crescimento e agentes de biocontrole da meloidoginose no tomateiro**. 2006. 109f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Centro de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2006.

SOUSA, C.S. et al. Estreptomicetos no controle da meloidoginose em mudas de tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1759-1766, dez 2006.

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

SOUZA, C.A.S.; DIAS, L.A.S. Melhoramento Ambiental e Socio-econômico. In: DIAS, L. A. S. (Ed.). **Melhoramento genético do cacauero**. Viçosa: FUNAPE/UFG, 2001.

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Critical Review of Biotechnology**, v. 17, p. 39-67, 1997.

TUITE, J. Plant pathological methods: Fungi and Bacteria. Minneapolis: **Burgess Publishing Company**, 1969.

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

UEDA, K. et al. Two Distinct Mechanisms Cause Heterogeneity of 16S rRNA. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 78-82. 1999.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho teve como objetivo o estudo da densidade populacional, caracterização fisiológica, diversidade genética e do potencial de actinomicetos associados ao cacauero para a promoção de crescimento de mudas desta cultura propagadas por estaquia.

A baixa influência das raízes sobre as populações de actinomicetos, evidenciada na diferença não significativa entre as populações encontradas nas amostras de solos e de raízes, diferente do que ocorre com outras populações de bactérias e até mesmo sobre populações fúngicas, se deve provavelmente, pelo crescimento lento dos actinomicetos e baixa capacidade competitiva (PEREIRA, 2000).

A utilização de seqüências do gene *rpoB* para a identificação molecular do actinomicetos permitiu a classificação ao nível de gênero, sendo todos os isolados pertencentes ao gênero *Streptomyces*. Apesar das vantagens de utilização do gene *rpoB* sobre o 16S rDNA (KIM et al., 1999), a falta de uma coleção universal de isolados padrão de espécies de *Streptomyces*, bem como de seqüências confiáveis nos bancos de dados públicos, fazem da identificação de isolados de *Streptomyces* ao nível de espécie, uma tarefa muito difícil (ANDERSON & WELLINGTON, 2001).

A produção *in vitro* de celulase, xilanase, quitinase e do ácido indolacético e a capacidade de solubilização de fosfato pelos isolados de actinomicetos foram avaliadas como características indicadoras dos possíveis mecanismos de ação destes isolados. Contudo, geralmente não existe correlação entre a atividade *in vivo* e *in vitro* para a maioria dos organismos (VESSEY, 2003).

Observou-se nos testes em mudas de cacauero, promoção de crescimento de até 117,7 % em relação à testemunha, em substrato composto por serragem e areia e inoculado com os isolados AC 26 e AC 103, previamente selecionados para promoção de crescimento e controle da meloidoginose em mudas de tomate (Sousa et al., 2006). Entretanto, para os isolados de *Streptomyces* spp. obtidos de cacauero não houve diferença significativa entre os tratamentos e a testemunha tratada com ácido indolbutírico. Isto pode ter ocorrido devido à baixa colonização dos actinomicetos nas raízes das plantas, considerando que a colonização das raízes é essencial para que ocorram uma série de benefícios mediados por

rizobactérias (WELLER, D.M, 1998; LUGTENBERG et al., 2001). Portanto, é necessário testar um maior número de isolados para o crescimento de mudas de cacaueteiro, uma vez que, de acordo com CHEN et al. (1996), apenas 1 % das bactérias isoladas da rizosfera de plantas é capaz de induzir crescimento.

Este é o primeiro estudo envolvendo actinomicetos e a cultura do cacaueteiro, sua densidade populacional na rizosfera, diversidade genética e avaliação da promoção de crescimento em mudas. Assim, outros estudos devem ser conduzidos para complementar o que foi iniciado neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON A.S.; WELLINGTON, E.M.H. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 797–814, 2001.
- CHEN, Y.; MEI, R.; LIU, L.; KLOEPPER, J. W. The use of yield increasing bacteria (YIB) as plant growth-promoting rhizobacteria in Chinese agriculture In: UTKHEDE, R.S.; GUPTA, V.K. (Eds.) **Management of soil born disease**. Ludhiana: Kalyani Publishers, 1996.
- KIM, B.J. et al. Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 1714–1720. 1999.
- LUGTENBERG, B.J.J.; DEKKERS, L.; BLOEMBERG, G.V. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 39, p. 461-490, 2001.
- PEREIRA, J.C. **Interações entre as populações de actinomicetos e outros organismos na rizosfera**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. 15 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 118).
- SOUSA, C.S. et al. Estreptomicetos no controle da meloidoginose em mudas de tomateiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 12, p. 1759-1766, dez 2006.
- VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v. 255, p. 571-586, 2003.
- WELLER, D.M. Biological control of soilborne plant pathogens in rhizosphere with bacteria. **Annual Review of Phytopathology**. Palo Alto, v. 26, p. 79407, 1998.

ANEXO

Meios de cultura e soluções**Extrato de Solo (1000 mL)**

- Glicose.....	1 g
- K ₂ HPO ₄	0,5 g
- KNO ₃	0,1 g
- MgSO ₄ .7H ₂ O.....	7 g
- Agar.....	20 g
- Extrato de Solo*.....	500 mL
- H ₂ O destilada.....	500 mL

*Extrato de Solo:

- Solo estéril.....	100 g
- H ₂ O destilada.....	500 mL

Agar Nutriente (1000 mL)

- Extrato de carne.....	3 g
- Peptona.....	5 g
- Agar.....	15 g
- H ₂ O destilada.....	1000 mL

Arginine-Glycerol-Mineral Salt Ágar - AGS (1000 mL)

- Arginina HCl.....	0,5 g
- Glicerol.....	6,25 g
- K ₂ HPO ₄	0,5 g
- NaCl.....	0,5 g
- MgSO ₄ 7H ₂ O.....	0,25 g
- Fe(SO ₄) ₃ 6H ₂ O.....	5 mg
- CuSO ₄ 5H ₂ O.....	0,05 mg
- ZnSO ₄ 7H ₂ O.....	0,05 mg
- MnSO ₄ H ₂ O.....	0,05 mg
- Agar.....	15 g
- H ₂ O destilada.....	1000 mL

Amido Caseína (1000 mL)

- Amido Solúvel.....	10 g
- Caseína.....	0,3 g
- KNO ₃	2 g
- NaCl.....	2 g
- K ₂ HPO ₄	2 g
- MgSO ₄ 7H ₂ O.....	0,05 g
- CaCl ₂	0,002 g
- FeSO ₄ 7H ₂ O.....	0,002 g
- Agar.....	15 g
- H ₂ O destilada.....	1000 mL

Mínimo de Sais (1000 mL)

- Xilana, Celulose ou Quitina.....	1 g
- NaNO ₃	0,5 g
- K ₂ HPO ₄	1 g
- MgSO ₄ 7H ₂ O.....	0,5 g
- FeSO ₄ 7H ₂ O.....	0,01 g
- Extrato de Levedura.....	1 g
- Agar.....	15 g
- H ₂ O destilada.....	1000 mL

Triptocaseína de Soja – TSA (1000 mL)

- Peptona.....	5 g
- Triptona.....	15 g
- NaCl.....	5 g
- Agar.....	12 g
- H ₂ O destilada.....	1000 mL

Solução de Salkowski

- FeCl ₃ .6H ₂ O 0,5 M.....	1 mL
- HClO ₄ 35 %.....	50 mL