

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E**  
**BIOLOGIA MOLECULAR**



**BIOPROSPECÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PARA EFEITOS  
BENÉFICOS EM MUDAS DE MARACUJAZEIRO AMARELO  
(*Passiflora edulis*).**

**ROBERTA MARIA SANTOS ORNELLAS**

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

ROBERTA MARIA SANTOS ORNELLAS

**BIOPROSPECÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PARA EFEITOS BENÉFICOS EM MUDAS DE MARACUJAZEIRO AMARELO (*Passiflora edulis*).**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**Área de concentração:** Genética e Biologia Molecular

**ILHÉUS – BAHIA – BRASIL**

**Agosto de 2011**

O74

Ornellas, Roberta Maria Santos.

Bioprospecção de rizobactérias para efeitos benéficos em mudas de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis*) / Roberta Maria Santos Ornellas. – Ilhéus, BA: UESC, 2011.

xii, 87 f. : il. ; anexos.

Orientador: Leandro Lopes Loguercio.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.

Referências bibliográficas: f. 76-85.

1. Maracujá – Doenças e pragas.
2. *Passiflora edulis*.
3. Microorganismos.
4. Rizobactérias. I. Título.

CDD 634.425

ROBERTA MARIA SANTOS ORNELLAS

**BIOPROSPECÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PARA EFEITOS BENÉFICOS EM MUDAS DE MARACUJAZEIRO AMARELO (*Passiflora edulis*).**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética e Biologia Molecular

APROVADA: 31 de agosto de 2011

---

Prof. Dr. Jorge Teodoro de Souza  
(UFRB)

---

Prof. Dr. Eduardo Gross  
(UESC)

---

Dr<sup>a</sup>. Monita Abreu Tarazzi  
(UESC)

---

Prof. Dr. Leandro Lopes Loguercio  
(UESC – Orientador)

## DEDICATÓRIA

A minha família e amigos pelo carinho e apoio.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Adão Ornellas e Nilzete Ornellas, pelo amor e dedicação.

Aos meus irmãos Pedro e Fábio, pelo carinho e cumplicidade.

Ao meu orientador e amigo Professor Dr. Leandro Lopes Loguercio, pelos grandes ensinamentos, pela confiança, carinho e apoio que foram essenciais no período dessa jornada.

Ao Professor Dr. Antonio Carlos de Oliveira (UESB, Vitória da Conquista), co-orientador deste trabalho: meu parceiro/mestre e grande incentivador de toda minha jornada acadêmica, onde sempre encontrei apoio nos trabalhos realizados.

Ao Professor Dr. Eduardo Gross pela colaboração, sugestões durante o desenvolvimento da pesquisa.

À Dra Monita Tarazzi; pela colaboração, carinho e mensagens de otimismo.

A minha querida amiga Jackline Sá, grande incentivadora, me apoiando sempre em todos os momentos de minha vida.

As amigas Lidi, Irá, Jú e Sarah, pelos momentos prazerosos em laboratórios. Pelo carinho, companheirismo e incentivo para continuarmos e vencermos juntas mais uma fase de nossas vidas.

Aos Laboratórios de Química e Fertilidade do Solo e Monitoramento Ambiental pela oportunidade e espaço onde comecei a desenvolver meus trabalhos.

Ao Laboratório de Microbiologia da Agroindústria e sua equipe pela oportunidade de desenvolver parte de meus trabalhos e pelo apoio, colaboração de todos.

Aos laboratórios do Centro de Biotecnologia e Genética pelo suporte técnico de equipamentos e espaço, onde desenvolvi parte de meus trabalhos de pesquisa.

À Fabrícia, secretária do Programa de Genética e Biologia Molecular.

Ao Curso de Pós-Graduação e a Universidade Estadual de Santa Cruz pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa que permitiu o trabalho ser realizado.

## ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>EXTRATO</b> .....	<b>x</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>16</b>
2.1. MARACUJAZEIRO 'AMARELO' – <i>Passiflora edulis</i> .....	16
2.1.1. Aspectos gerais e botânicos .....	16
2.1.2. Sistema radicular de passiflora .....	18
2.1.3. Aspectos sócio-econômicos .....	18
2.1.4. Contexto fitopatológico .....	19
2.2. TÉCNICAS DE MANEJO DE DOENÇAS EM PLANTAS .....	21
2.3. RIZOSFERA E OS MICRORGANISMOS ASSOCIADOS .....	22
2.4. RIZOBACTÉRIAS .....	23
2.4.1. Mecanismos de ação benéfica direta .....	24
2.4.1.1. <i>Obtenção de nutrientes (Absorção/Fixação de elementos)</i> .....	24
2.4.1.2. <i>Indução da produção de fitorreguladores</i> .....	25
2.4.2. Mecanismos de ação indireta .....	26
2.4.2.1. <i>Ação antagônica sobre fitopatôgenos</i> .....	26
2.4.2.2. <i>Indução de resistência sistêmica</i> .....	27
2.5. RIZOBACTÉRIAS EM PASSIFLORA .....	28
2.5. TEORIA HOLOGENÔMICA .....	29
2.5.1. Holobionte e evolução .....	29
2.5.2. Hologenoma e ação das forças evolutivas .....	30
2.6. MÉTODOS FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS DE TAXONOMIA MICROBIANA .....	31
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	<b>32</b>
3.1. OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DE ISOLADOS RIZOBACTERIANOS .....	32
3.2. ANÁLISES FENOTÍPICAS .....	33
3.2.1. Caracterização morfológica estrutural .....	33
3.2.2. Caracterização funcional .....	34
3.2.2.1. <i>Teste de solubilização de fosfato</i> .....	34
3.2.2.2. <i>Bio-Ensaio de antagonismo in vitro ao fungo Fusarium solani</i> .....	35
3.2.2.3. <i>Bio-Ensaio de Promoção de crescimento</i> .....	35
3.2.2.4. <i>Bio-Ensaio de Tolerância à seca</i> .....	37
3.2.3. Análises moleculares .....	38
3.2.3.1. <i>Extração do DNA genômico</i> .....	38
3.2.3.2. <i>Amplificação do DNA por primers correspondentes ao gene 16s rRNA38</i> .....	39
3.2.3.3. <i>Eletroforese em gel</i> .....	39
3.2.3.4. <i>Sequenciamento</i> .....	39
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>
4.1. ISOLAMENTO DE RIZOBACTÉRIAS .....	41

4.2. ANÁLISES FENOTÍPICAS .....	41
4.2.1. Caracterização morfológica estrutural .....	42
4.2.2. Caracterização morfológica com possível função .....	44
4.2.3. Caracterização funcional .....	46
4.2.3.1. <i>Teste de solubilização de fosfato</i> .....	46
4.2.3.3. <i>Promoção de crescimento de mudas inoculadas com rizobactérias</i> ...	49
4.2.3.3. <i>Ensaio de Tolerância à seca</i> .....	53
4.2.3.4. <i>Análise integrada dos parâmetros funcionais</i> .....	57
4.3. ANÁLISES MOLECULARES .....	58
4.3.1. Identificação taxonômica via seqüenciamento .....	58
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>60</b>
5.1. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA ESTRUTURAL .....	60
5.2. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL.....	62
5.2.1. Teste de solubilização de fosfato .....	63
5.2.2. Teste de antagonismo <i>in vitro</i> contra <i>Fusarium solani</i> .....	65
5.2.3. Promoção de crescimento de mudas de <i>P. edulis</i> inoculadas com rizobactérias .....	67
5.2.4. Tolerância à seca .....	70
5.2.5. Diversidade funcional .....	73
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>75</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>76</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>85</b>



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Análise dos componentes principais e *biplot* para características morfológicas de rizobactérias isoladas de maracujazeiro ‘amarelo’ de regiões de produção da Bahia. (a) Livramento de Nossa Senhora (LNS); (b) Canavieiras (CAN). Os isolados foram identificados com as siglas das respectivas regiões, seguidas das letras ‘A’ e ‘B’ para os dois locais distintos de coleta em cada uma, mais a numeração específica que identifica o isolado.

**Figura 2.** Diagramas de Vern para isolados de rizobactérias de maracujazeiro ‘amarelo’, de regiões produtoras da Bahia, com características morfológicas de Gram negativo e presença de fluorescência. (a) Livramento de Nossa Senhora (LNS); (b) Canavieiras (CAN). O número total de isolados classificados para cada região aparece à direita de cada diagrama. Para identificação dos isolados individuais, ver legenda da Figura 1.

**Figura 3.** Ilustração de resultados do bioensaio de solubilização de fosfato *in vitro*, após sete dias incubação. Os isolados (em duplicata por placa) estão identificados à esquerda e acima; setas indicam os halos de solubilização.

**Figura 4.** Ilustração do procedimento de avaliação de antagonismo de rizobactérias contra *Fusarium solani*. (a) Controle, contendo somente *F. solani*; (b) pareamento entre culturas, com *F. solani* ao centro e o isolado de rizobactéria (LNS-A-1) em 4 pontos ao redor; (c) C: Barreira de inibição produzido pelo isolado LNS-1

**Figura 5.** Diagrama de Venn. Análise integrada dos parâmetros funcionais de Antagonismo *in vitro*, promoção de crescimento, tolerância à seca e solubilização de fosfato.

**Figura 6.** Diagrama de Vern para análise integradora dos isolados de rizobactérias que apresentaram funções de antagonismo *in vitro*, promoção de crescimento, tolerância à seca e solubilização de fosfato. Os isolados apresentados no texto correspondem aos números indicados nas intersecções dos respectivos conjuntos

**Figura 7.** Amplificação de 16S rDNA a partir de *primers* específicos em 15 isolados rizobacterianos isolados da rizosfera de maracujazeiro amarelo. ‘pm’ – padrão de peso molecular, 1 – LNS-A-20, 2 – LNS-A-17, 3 – LNS-A-37, 4 – LNS-A-4, 5 – LNS-A-9, 6– LNS-A-1, 7 – LNS-A-2, 8 – LNS-B-110, 9 – LNS-A-111, 10 – LNS-B-113, 3 – CAN-A-51, 11 – CAN-B-100, 12 – CAN-B-103, 13 – CAN-B-104, 14 – CAN-B-105, 15 – controle negativo. Os isolados que foram sequenciados correspondem às canaletas 6 e 11.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Tabela 1: Sumário dos isolados rizobacterianos provenientes das cidades de Livramento de Nossa Senhora (LNS) e Canavieiras (CAN)

**Tabela 2.** Teste de antagonismo *in vitro* com o fungo *Fusarium solani*, avaliando-se o decréscimo do diâmetro da colônia do fungo pela ação das rizobactérias.

**Tabela 3.** Ensaio de promoção de crescimento<sup>1</sup> de mudas de maracujazeiro amarelo inoculadas com 86 isolados bacterianos de rizosfera

**Tabela 4.** Padrões de tolerância branda à seca de mudas de maracujazeiro amarelo, inoculadas via semente com um de cada dos 86 isolados de rizobactérias sob estudo, após 7 dias de ausência de irrigação.

**Tabela 5.** Padrões de tolerância extrema à seca de mudas de maracujazeiro amarelo, inoculadas via semente com um de cada dos 86 isolados de rizobactérias sob estudo, após um segundo período de 18 dias de ausência de irrigação.

**Tabela 6.** Teste de Tolerância à seca. Segunda etapa: Resistência extrema. Médias do 'índice temporal de mortalidade por déficit hídrico' (ITMDH)

## EXTRATO

ORNELLAS, Roberta Maria Santos, M.Sc. Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA, agosto de 2011. **Bioprospecção de rizobactérias para efeitos benéficos em mudas de maracujazeiro ‘amarelo’ (*Passiflora edulis*)**. Orientador: Leandro Lopes Loguercio. Co-orientador: Antonio Carlos de Oliveira

O maracujazeiro ‘amarelo’ (*Passiflora edulis* Sims) é uma planta de ambientes tropicais, cujo cultivo é de grande importância econômica para o Brasil. Em sendo uma cultura perene parte do sistema de produção passa pela obtenção de mudas para plantio no campo. A aplicação e colonização de microrganismos benéficos em plantas pode promover o crescimento vegetal e, ou tolerância a estresses (ex: doenças, seca, etc.). Neste cenário, e considerando os diversos tipos de efeitos positivos que podem ocorrer na produção de mudas, a utilização de bactérias da rizosfera de plantas, conhecidas como rizobactérias, constitui-se numa alternativa bastante promissora para promover o desenvolvimento saudável de mudas e melhorar a relação benefícios/custos de produção. Com o objetivo de estudar a diversidade de isolados bacterianos provenientes do solo de campos de produção de *P. edulis* e suas possíveis influências no desenvolvimento de mudas obtidas de sementes, foi realizado o isolamento e caracterização de rizobactérias provenientes de dois diferentes municípios do Estado da Bahia – Livramento de Nossa Senhora (LNS) e Canavieiras (CAN). Foram isoladas 86 rizobactérias no total de ambas as regiões, sendo todas caracterizadas morfológicamente por métodos clássicos. Análise exploratória de componentes principais, envolvendo oito características fenotípicas, e *biplot* revelaram uma grande diversidade estrutural dentre as bactérias de ambas as regiões. Além dos aspectos estruturais, avaliou-se aspectos funcionais dos isolados na coleção de rizobactérias, com intuito de bioprospecção por potenciais efeitos benéficos às plântulas. Os aspectos avaliados foram (i) solubilização de fosfato *in vitro*, (ii) crescimento e desenvolvimento vegetativo inicial de mudas seminais de maracujazeiro ‘amarelo’, (iii) potencial de indução de resistência dessas plântulas ao estresse hídrico, e (iv) antagonismo *in vitro* dessas

rizobactérias em relação ao fungo patogênico *Fusarium solani*, causador da ‘podridão-do-pé’ em maracujazeiro. Desses isolados, dez obtiveram resultados estatisticamente significativos para testes *in vitro* de solubilização de fosfato, sete apresentaram antagonismo *in vitro* ao fungo patogênico *F. solani*, oito apresentaram melhores valores para promoção de crescimento pelo parâmetro altura das mudas e 13 promoveram aumento do peso seco da parte aérea. Os isolados LNS-A-17, -20, -21, -22, -126 e CAN-A-57 foram identificados como rizobactérias promotoras de crescimento para os parâmetros de comprimento e peso seco da parte aérea. Além disso, dentre esses isolados que apresentaram promoção de crescimento em mudas, o isolado LNS-A-17 também apresentou antagonismo *in vitro* e os isolados LNS-A-16 e CAN-B-97 também solubilizaram fosfato *in vitro*. Em relação ao potencial de indução de resistência ao estresse hídrico, três isolados (CAN-A-57, -61 e -74) induziram a um período maior de sobrevivência, sendo que neste grupo inclui-se um isolado (CAN-A-61) que também promoveu crescimento de mudas e um que também apresentou antagonismo *in vitro*. Uma análise integrada dos resultados indicou um total de seis isolados (7% do total) apresentando-se como bifuncionais (duas características avaliadas ocorrendo simultaneamente). Adicionalmente, iniciou-se o processo de identificação taxonômica da coleção por meio de seqüenciamento dos genes 16S rRNA, amplificados por *primers* específicos a partir de DNA extraído por choque térmico. Foi possível obter amplificação para somente 10 isolados, sendo sete destes em quantidades suficientes para os procedimentos de sequenciamento. Resultados iniciais e parciais deste sequenciamento permitiram a identificação de dois isolados dessa rizosfera, que foram classificados como *Bacillus methylotrophicus* e *Acinetobacter sp.* Os resultados gerais deste trabalho sugerem ter sido encontrados rizobactérias com diferentes funções para potencial aplicação na melhoria da produção de mudas e eventual aumento de tolerância a estresse hídrico em maracujazeiro ‘amarelo’. Discute-se as principais consequências e perspectivas práticas desses resultados, utilizando-se como referenciais teóricos a visão clássica de ecologia microbiana, bem como a teoria hologenômica da evolução.

**Palavras-chave:** *Passiflora edulis*, diversidade microbiana, rizobactérias, promoção de crescimento, tolerância à seca, solubilização de fosfato, produção de mudas.

## ABSTRACT

ORNELLAS, Roberta Maria Santos, M.Sc. State University of Santa Cruz, Ilhéus-BA, August 2011. **Bioprospection of rizobacteria for beneficial effects on 'yellow' passion fruit (*Passiflora edulis*) seedlings.** Supervisor: Leandro Lopes Loguercio. Co-supervisor: Antonio Carlos de Oliveira.

The 'yellow' passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) is a tropical plant, whose cultivation is of great economic importance for Brazil. Since it is a perennial crop, part of the production system includes the production of seedlings for planting in the field. The application of beneficial microorganisms and plant colonization by them can promote plant growth and, or stress tolerance (e.g., diseases, drought, etc.). In this scenario, and considering the various types of positive effects on seedling production, the use of bacteria from the rhizosphere of plants, known as rhizobacteria, is a promising alternative to promote the development of healthy seedlings and improve the benefits / costs relationship. In order to study the diversity of bacterial isolates from soil originated from production fields of *P. edulis* and their possible influences on the development of passion fruit seedlings, we performed the isolation and characterization of rhizobacteria from two different districts of the Bahia State – Livramento de Nossa Senhora (LNS) and Canavieiras (CAN). A total of 86 rhizobacteria were isolated from both regions and were morphologically characterized by classical methods. Exploratory PCA analysis, involving eight phenotypic characteristics, and the resulting biplot revealed a great structural diversity among bacteria in both regions.. In addition to the structural aspects, some functional aspects of the isolated rhizobacteria collection were evaluated, with the purpose of bioprospecting potential beneficial effects on seedlings. These functional aspects evaluated were (i) *in vitro* phosphate solubilization, (ii) vegetative growth and development of 'yellow' passion fruit seedlings, (iii) potential to induce resistance of seedlings to water stress, and (iv) *in vitro* antagonism of these rhizobacteria against the pathogenic fungus *Fusarium solani*, which causes 'stem-rot' in passion fruit. From

these isolates, ten showed statistically significant results for the *in vitro* phosphate solubilization tests, seven showed *in vitro* antagonism to the pathogenic fungus *F. solani*, eight showed higher values for growth promotion based on the height parameter, and 13 increased seedlings shoots dry weight. The LNS-A-17, -20, -21, -22, -126 and CAN -A-57 isolates were identified as rhizobacteria promoting growth based on the shoots height and dry weight parameters. Moreover, among those isolates that showed enhanced growth in seedlings, LNS-A-17 isolate also showed *in vitro* antagonism, and LNS-A-16 and CAN-B-97 isolates also solubilized phosphate *in vitro*. Regarding the potential for induction of resistance to water stress, three isolates (CAN-A-57, -61 and -74) induced a longer period of survival; this group included an isolate that also promoted growth of seedlings and another that also showed *in vitro* antagonism. An integrated analysis of the results showed a total of six isolates (7% of total) as being bifunctional (two characteristics occurring simultaneously). Additionally, we began the process of taxonomic identification of the isolates collection by sequencing of 16S rRNA gene, amplified by specific primers from bacterial DNA extracted by heat shock procedures. Amplification could be obtained for only 10 isolates, seven of these in sufficient quantities for sequencing procedures. Initial and partial sequencing results allowed the identification of two rhizosphere isolates, which were classified as *Bacillus methylotrophicus* and *Acinetobacter* sp. The general results of this work suggest that rhizobacteria with different functions have been found, which have the potential for application in the improvement of seedling production and increase in tolerance to water stress in yellow passion fruit. The main outcomes and practical perspectives of these results are discussed, using the classical view of microbial ecology, as well as the theory of evolution hologenome as theoretical references.

**Key words:** *Passiflora edulis*, microbial diversity, rhizobacteria, growth promotion, stress tolerance, phosphate solubilization, seedlings production.

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente no Brasil há uma preocupação na conservação de sistemas agroflorestais, baseando-se no uso de processos de baixo impacto ambiental que buscam modelar as áreas de produção agrícola nos moldes de ecossistemas naturais. Características relevantes destes sistemas incluem a manutenção de ciclos biogeoquímicos, preservação de espécies nativas em bancos ativos de germoplasma, reciclagem de nutrientes, proteção de solos, conservação da água, etc.

O maracujazeiro 'amarelo' é uma planta típica de regiões tropicais e sua produção apresenta grande importância econômica para o Brasil, que é o maior produtor, exportador e consumidor da fruta. O estado da Bahia apresenta condições de clima e de solo favoráveis à fruticultura, principalmente para o cultivo de maracujazeiro 'amarelo' (*Passiflora edulis* Sims), o que o torna, atualmente, no maior produtor de maracujá do Brasil. Contudo, esse cultivo apresenta perdas significativas causadas por doenças, principalmente pelo fungo *Fusarium solani*, que reduz a produção e conseqüentemente perda de lucratividade ao produtor. Métodos tradicionais de controle da fusariose no maracujazeiro dependem de químicos (agrotóxicos), os quais podem causar contaminações ao homem e a outros organismos não-alvo presentes no meio ambiente, promovendo desequilíbrios ecológicos (ANDERBRHAN et al., 1984). Por sua vez, podas fitosanitárias que causam lesão no vegetal, podem produzir aberturas para entrada de outros fitopatógenos (COSTA et al., 2009).

Devido a necessidade de expansão da comercialização do fruto no mercado nacional e internacional, é necessário produzir mudas com qualidade e de crescimento mais acelerado (MELETTI et al., 2002). Por isso, faz-se necessário a busca de alternativas de manejo para desenvolvimento dessa cultura. E, neste contexto, o controle biológico surge como uma abordagem importante de método menos agressivo ao meio ambiente para a redução de fitopatógenos (BETTIOL & GHINI, 1995). Diante disso, a utilização de bactérias que beneficiam o desenvolvimento vegetal tem-se constituído numa alternativa bastante promissora,

estando associada à qualidade ambiental, com um papel fundamental na manutenção de seus ecossistemas. Por várias décadas já se vêm estudando o efeito de bactérias do solo com objetivo de observar seus efeitos no desenvolvimento vegetal. De um modo geral, as bactérias colonizam a planta e estabelecem uma associação benéfica que favorece o crescimento vegetativo da mesma através de diversos mecanismos (BENITEZ et al., 2004). Algumas dessas bactérias têm como nicho ecológico a rizosfera, região que recebe influência direta das raízes (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Nesta região há intensa atividade metabólica das populações bacterianas que são genericamente denominadas de 'rizobactérias'.

Neste contexto bastante estudado de endossimbiose entre plantas e microrganismos, uma teoria recente vem promovendo uma quebra de paradigma vigente ao considerar a planta e a diversidade dos microrganismos associados como uma unidade evolutiva, o 'holobionte'. Neste, o 'hologenoma' constitui-se no somatório dos genes do hospedeiro (animal ou planta) e de sua microbiota, que passam pelos processos evolutivos de resposta ao meio ambiente de forma unificada (ZILBER-ROSENBERG; ROSENBERG, 2008). Portanto, diante da diversidade funcional de rizobactérias que habitam o rizoplano, como potenciais membros da porção microbiota dos hologenomas das plantas, é importante buscar isolados que possam se destacar no desenvolvimento vegetal, por meio da promoção de crescimento e, ou tolerância a estresses (por ex., hídrico e doenças), com o objetivo de dar sustentabilidade à produção de plantas saudáveis para aplicação agrônômica.

Diante disso, os objetivos desse trabalho foram: (i) isolar e caracterizar rizobactérias provenientes de diferentes regiões do Estado da Bahia; (ii) avaliar o efeito das rizobactérias isoladas no crescimento e desenvolvimento inicial de plântulas de maracujazeiro amarelo; (iii) avaliar o efeito dessas rizobactérias quanto ao potencial de indução de resistência ao estresse hídrico em plântulas de maracujazeiro amarelo; (iv) estudar o efeito de antagonismo dessas rizobactérias em relação ao fungo patogênico *Fusarium solani*; (v) estudar a capacidade dessas rizobactérias de solubilizar fosfato *in vitro*; e (vi) identificar taxonomicamente essas rizobactérias por meio de seqüenciamento dos genes 16S rRNA. O isolamento de bactérias do solo de rizosfera de maracujazeiro se faz necessário para que se possa



estudar seu potencial uso em estratégias de produção agrícola mais sustentáveis, por meio da seleção por isolados com características funcionais diferentes e úteis a cada contexto agronômico.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. MARACUJAZEIRO 'AMARELO' – *Passiflora edulis*

#### 2.1.1. Aspectos gerais e botânicos

O maracujazeiro é uma planta que pertence à família Passifloraceae, da ordem Passiflorales. No gênero *Passiflora* existe mais de 600 espécies, das quais 150 são originárias do Brasil (VASCONCELOS et al., 2005). Dentre essas espécies a *Passiflora edulis* Sims, do grupo de variedades/seleções conhecido por maracujazeiro 'amarelo', é a mais difundida e cultivada comercialmente no Brasil (GONÇALVES & SOUZA, 2006).

O maracujazeiro 'amarelo' é botanicamente caracterizado como sendo uma trepadeira sub-lenhosa, glabra de caule cilíndrico, vigoroso e com sistema radicular axial (SOUSA, 2000; ALEXANDRE et al., 2009). As folhas são alternadas e, quando jovens, a maioria delas têm forma ovalada. Quando adultas, a planta possui folhas trilobadas de margem serrada, com face superior lustrosa. Apresenta gavinhas nas axilas das folhas, servindo como suporte para a planta. As flores são hermafroditas, grandes, vistosas, com coloração branca e com franja roxa (PIRES, 2007). Os filamentos em quatro ou cinco séries, são de cor púrpura na base e brancos no ápice. Possuem pétalas e sépalas brancas, oblongas (CUNHA et al., 2004). Apresentam androginóforo colunar bem desenvolvido, de onde saem geralmente cinco estames, de cujos ápices saem os estigmas e as anteras com os grãos de pólen (MELETTI & MAIA, 1999). O fruto apresenta uma baga globosa ou ovóide, amarelo esverdeado ou amarelo quando maduro, com pericarpo pouco espesso, contendo numerosas sementes ovais, reticuladas, pretas e com polpas mucilaginosas e ácidas (LIMA & BORGES, 2004; FARINAZZO & SALIMENA, 2007).

O maracujazeiro 'amarelo' é uma espécie alógama e auto-incompatível que depende de polinização cruzada para fecundação. O pólen de uma planta é incapaz de fertilizar suas próprias flores ou flores que possuem constituição genética similar

(BRUCKNER et al, 2000). Além disso, os grãos de pólen são pesados e viscosos, dificultando a polinização pelo vento e necessitando assim de agente polinizador. Para a polinização e fertilização da planta, é necessária a presença de diferentes genótipos e de insetos polinizadores ou de polinização manual (MATSUMOTO & SÃO JOSÉ, 1991). A frutificação se dá a partir das flores que brotam nos ramos. As flores se abrem por volta do meio dia, estando disponíveis para serem polinizadas. Não havendo a polinização, as flores murcham e caem (BRUCKNER & SILVA, 2001). Em ocorrendo a polinização e a fecundação, a flor se fecha e será desenvolvido o fruto (TEIXEIRA, 1994). Na polinização dessa planta, a frutificação e tamanho do fruto são influenciados pela quantidade de pólen depositado no estigma durante esse processo (AKAMINE & GIROLAMI, 1959). A propagação do maracujazeiro pode ser via sexuada ou generativa (via semente) ou assexuada ou vegetativa através de estaquia ou enxertia (OLIVEIRA, 2000).

Por ser uma planta de regiões tropicais, o maracujazeiro 'amarelo' se adapta melhor em locais com temperaturas médias mensais entre 21°C e 32°C na maior parte do ano. Também, em regiões com uma grande intensidade luminosa, com dias longos em torno de 11 horas diárias de luz. Esses fatores associados a outros garantem um vigoroso crescimento vegetativo, muita frutificação e frutos de alta qualidade (RUGGIERO et al.,1996;VASCONCELLOS & FILHO, 2000).

Além disso, o maracujazeiro é muito exigente quanto às condições hídricas, por possuir um desenvolvimento contínuo. Uma deficiência hídrica prolongada pode provocar paralisação das atividades vegetativas, atraso no florescimento, queda de flores e frutos, com redução significativa de produtividade e qualidade dos frutos. Em casos mais intensos pode ocorrer queda de folhas (MENZEL et al.; 1986; CARVALHO et al.; 2000). O excesso de chuva também é prejudicial ao desenvolvimento da cultura. A ocorrência de chuvas no período de floração pode provocar rompimento dos grãos de pólen pelo contato com a umidade, reduzindo a formação de frutos (VALE, 2010).

### **2.1.2. Sistema radicular de passiflora**

O sistema radicular de maracujazeiros é constituído de raízes finas e superficiais, já que 60% das mesmas são encontradas em maior volume a 30 e 45 cm da superfície do solo (SOUZA & MELLETTI, 1997; SOUSA, 2000), em um raio de 60 cm a partir do tronco (MANICA, 1981). O sistema radicular se desenvolve em diversos tipos de solo, mas, de forma geral, é necessário que o solo seja profundo, razoavelmente fértil e bem drenado (BORGES & LIMA, 2003). Além disso, é importante que o solo tenha uma disponibilidade adequada de oxigênio, para o bom desenvolvimento do sistema radicular. Quando ocorre essa falta de oxigênio, as raízes perdem o fortalecimento e podem apodrecer de forma mais rápida. Um dos motivos dessa má aeração é a compactação ou encharcamento do solo (LIMA & BORGES, 2002), sendo que este último também pode favorecer a incidência de doenças, principalmente a podridão-do-pé, conhecida como 'fusariose' (MANICA, 1981).

O desenvolvimento do sistema radicular de maracujazeiro ocorre em diferentes etapas de crescimento. Com aproximadamente oito meses, o desenvolvimento é lento com pouca produção de matéria seca, devido a baixa absorção de nutrientes. Deste período até o 10º mês o desenvolvimento do sistema radicular acelera, pois há uma maior absorção de nutrientes (K, Ca e N) e micronutrientes (Mn e Fe) permitindo assim a expansão do mesmo (HAGG et al., 1973; BARBOSA, 2006).

### **2.1.3. Aspectos sócio-econômicos**

A cultura do maracujazeiro 'amarelo' é de grande importância agrícola para o estado da Bahia, principalmente pelas suas características favoráveis à exploração em sistemas de manejo ambientalmente sustentável (PIRES et al, 2008). Dentre as três espécies pertencentes ao gênero *Passiflora* que são economicamente importantes, a produção de maracujazeiro 'amarelo' (*P. edulis* Sims) vem destacando-se pelo seu potencial no mercado brasileiro e internacional (GONÇALVES & SOUZA, 2006). Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de

maracujá 'amarelo' que representa 95% dos pomares, devido à qualidade dos seus frutos, vigor, produtividade e rendimento em suco (FERREIRA, 2005). É também, o maior exportador de suco concentrado e polpa. Juntamente com a Colômbia, Equador e Peru, responde por 90% do mercado mundial (AGRIANUAL, 2009). O Nordeste tem área colhida de 37.037 ha, uma quantidade produzida de 529.102 t de frutos e rendimento médio de 14,28 t ha<sup>-1</sup>, correspondendo a 63% da produção nacional de maracujá amarelo (IBGE, 2010). O Estado da Bahia é o maior produtor brasileiro, correspondendo a 34% de toda a produção nacional (PIRES et al., 2008), seguido de São Paulo, Sergipe, Espírito Santo, Pará, Ceará e Minas Gerais. Cerca de 65% da produção de maracujá 'amarelo' é destinada ao consumo natural e 35% destinada à indústria (ROSSI, 1998).

A cultura do maracujazeiro tem uma grande relevância social, pois é cultivado na maioria das vezes em pequenas propriedades, proporcionando geração de renda e emprego, sobretudo na forma de agricultura familiar (VIANA et al., 2003a). Destaca-se também por sua utilidade farmacológica na extração de substâncias químicas (DHAWAN et al., 2004), na cosmetologia e na área ornamental (LIMA, 1993).

#### **2.1.4. Contexto fitopatológico**

Perdas econômicas e ambientais significativas são causadas por doenças que, no caso do maracujazeiro, aparecem como os principais fatores que ameaçam a produtividade, podendo até inviabilizar seu cultivo em determinadas regiões. Além disso, provocam prejuízos expressivos que levam os produtores a usar defensivos agrícolas de forma indiscriminada. Doenças causadas por bactérias, vírus e fungos têm sido limitantes em relação à manutenção de sanidade dos produtos comercializados (JUNQUEIRA et al.; 2003).

Das moléstias bacterianas, tem se destacado a mancha bacteriana, acarretada pela *Xanthomonas axonopodis* pv. *Passiflorae*. Os sintomas iniciais se desenvolvem principalmente nas folhas mais internas, apresentando-se na forma de lesões irregulares pequenas, encharcadas, oleosas e translúcidas, localizadas próximo às nervuras, com presença de halo amarelado. Posteriormente, as lesões tornam-se

marrons e deprimidas, formando grandes áreas necrosadas causando seca total da folha. Nos frutos, as manchas são geralmente circulares, de borda definida, e podem coalescer. São doenças geralmente superficiais, mas podem chegar a atingir as sementes, inviabilizando o consumo do fruto (PIO-RIBEIRO & MARIANO, 1997).

A virose do endurecimento de frutos do maracujazeiro (VEFM), doença causada pelo vírus *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), se caracteriza por sintomas de mosaico foliar com intensidade variada, deformação foliar com embolhamento e má-formação dos frutos que, nos casos mais severos, apresentam-se deformados e com pericarpo endurecido, sem valor comercial, reduzindo assim produtividade e o ciclo da cultura (BARBOSA & BRAGANÇA, 2008). Esta doença é transmitida por várias espécies de afídeos e pode ser facilmente transmitida mecanicamente, via extrato foliar tamponado, e por enxertia (FONSECA, 2008).

Dentre todas essas moléstias, as doenças que são causadas por fungos têm significativo impacto na cultura do maracujazeiro. O fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz. & Sacc, causador da antracnose, é um dos principais problemas pós-colheita da cultura do maracujazeiro (SANTOS-FILHO et al., 2004). Atinge a maior parte dos frutos do maracujá, comprometendo também toda a parte aérea da planta por levar ao secamento e conseqüente desfolha de ramos (VIANA & COSTA, 2003b). Apresentam inicialmente pequenas manchas escuras nas folhas que evoluem para necroses. Nos ramos ocorre formação de cancrios que levam à morte dos ponteiros (VIANA & COSTA, 2003; ALMEIDA, 2005).

Já a moléstia causada pelo fungo *Fusarium solani* (Mart.) Sacc caracteriza-se pelo surgimento de uma leve murcha dos ponteiros como sintomas iniciais visíveis, juntamente com alteração na coloração das folhas. Com o desenvolvimento da doença, ocorre murcha, desfolha e morte da planta decorrentes do anelamento necrótico do colo da planta (KIMATI, 2005). É transmitida de um pomar para o outro por meio de mudas contaminadas e, entre plantas, por meio do contato entre raízes e pela água de irrigação (VIANA et al.; 2003a).

Os prejuízos econômicos provocados por essas moléstias não vem sendo minorados de forma eficaz e ambientalmente favorável pelos métodos tradicionais de controle (RIBEIRO et al., 2006). Diversas medidas vêm sendo estudadas com o objetivo de reduzir a severidade de doenças em vários patossistemas. O incremento dos custos do controle químico, a perda de eficiência de alguns desses produtos e

os problemas ambientais advindos destas práticas, indicam a necessidade da busca de alternativas para o controle de fitopatógenos.

## **2.2. TÉCNICAS DE MANEJO DE DOENÇAS EM PLANTAS**

Para o manejo de doenças, vários métodos têm sido utilizados, tais como poda fitossanitária de tecidos afetados, aplicação de fungicidas químicos e utilização de cultivares resistentes.

O uso de fungicidas isoladamente, em alguns casos, não é eficiente e seu uso continuado e generalizado tem causado poluição do solo e da água (COSTA et al., 2006). Além disso, é freqüente um mau manejo equivocado dos esquemas de aplicações desses fungicidas, com o uso indiscriminado dos mesmos como único método de controle empregado. Isto pode afetar a qualidade organoléptica de frutas *in natura* por deixar resíduos químicos dos compostos aplicados, tornando-os inapropriados para o consumo (ANDERBRHAN et al., 1995; CENCI, 2006).

O uso de cultivares resistentes é uma medida duradoura, porém não definitiva, devido a potenciais variações nas espécies fúngicas que podem quebrar essa resistência. Além disso, tal método é dispendioso e demanda longo tempo para retomada da produção (ANDERBRHAN et al., 1995), especialmente nos casos de espécies arbóreas.

Devido às implicações ambientais e limitações práticas desses métodos, ênfase tem sido dada ao Manejo Integrado de Doenças (MID) (COSTA et al., 2006), que tende a trazer maior estabilidade a produção, melhor qualidade dos produtos agrícolas, menor agressão ao meio ambiente e melhor conservação de áreas agricultáveis (JUNQUEIRA, 2003). Neste cenário, o Controle Biológico (CB) tem papel proeminente, juntamente com os demais métodos citados (BETTIOL & GHINI, 1995), constituindo-se numa alternativa de controle bastante promissora que tem aumentado seu espaço no mercado a cada ano. Contudo, apesar de sua utilização trazer diversos benefícios, tais como redução de custos e da degradação ambiental, e preservação da saúde humana e animal, sua utilização ainda é pequena, com pouco mais de 1% do mercado de pesticidas (VALICENTE & BARRETO, 1999).

Agentes de biocontrole (ABs) atuam por diversos mecanismos que resultam em

antagonismo a fitopatógenos, especialmente aos fúngicos: micoparasitismo, competição, antibiose, indução de resistência sistêmica, ou combinações destes (BENITEZ et al., 2004; LUZ, 1996). Interessantemente, uma característica praticamente comum a todos esses mecanismos é a secreção de proteínas no meio externo às células do antagonista, as quais cumprem funções diversas, de acordo com o mecanismo envolvido (degradação de estruturas do patógeno, inibição de crescimento, toxicidade, seqüestro de elementos nutricionais essenciais, sinalização e indução de respostas do hospedeiro, etc). Parte importante, portanto, do entendimento biológico e caracterização funcional desses ABs passa por estudos nesta esfera, com vistas ao aproveitamento máximo de seu potencial.

### **2.3. RIZOSFERA E OS MICRORGANISMOS ASSOCIADOS**

O solo é considerado como o mais importante reservatório para explorar microrganismos e apresenta uma comunidade heterogênea, complexa e dinâmica (MELO et al.; 2002). Ele possui uma diversidade microbiana que não se pode desprezar do ponto de vista biológico, pois os microrganismos que aí vivem realizam atividades fundamentais para manutenção e sobrevivência de comunidades vegetais e animais. As comunidades de microrganismos que habitam solo têm como principais atividades a decomposição de matéria orgânica, produção de húmus, ciclagem de nutrientes, produção de compostos complexos, decomposição de xenobióticos, controle biológico de pragas e doenças, entre outros (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). A diversidade entre os microrganismos pode ser medida através dos níveis taxonômicos (família, gênero, etc) ou por determinadas características morfológicas, bioquímicas, fisiológicas e simbióticas.

A maior atividade biológica do solo geralmente situa-se na camada conhecida como rizosfera, região de influência das raízes que são colonizadas por microrganismos. Essa região é rica em substratos orgânicos, havendo troca de energias, nutrientes e sinais moleculares e apresenta uma diversificação metabólica de comunidades biológicas diferentes do solo ao redor (ROMEIRO, 2007). Dos microrganismos que habitam a rizosfera, as bactérias são as mais abundantes (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). A interação entre bactérias que ocupam a região da



rizosfera e a planta envolve uma transição contínua, que atravessa as células das raízes e vai para a parte aérea do vegetal (KLOEPPER et al.; 1992). A região do córtex radicular da planta é vista como parte do ambiente solo-raiz, no qual algumas bactérias da rizosfera podem penetrar e colonizar os tecidos radiculares, trazendo benefícios a outros órgãos da planta (STURZ & NOWAK, 2000).

#### 2.4. RIZOBACTÉRIAS

Rizobactérias são bactérias que habitam a rizosfera com capacidade de colonizar as raízes das plantas na presença da microbiota natural do solo (LUZ, 1996). Essas bactérias fazem dessas regiões nichos ecológicos específicos, onde se nutrem de exsudatos e lisados liberados pelas plantas e onde também se abrigam e se protegem do antagonismo da microbiota circundante (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Em associação com as plantas, as rizobactérias podem ter efeito deletério, nulo ou benéfico. Rizobactérias que estabelecem um efeito benéfico no desenvolvimento de plantas através da promoção de crescimento vegetativo são chamadas de rizobactérias promotoras de crescimento ou PGPRs (*Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*) (LUZ, 1996; ROMEIRO, 2005). Entretanto, existem algumas rizobactérias conhecidas como microrganismos deletérios da rizosfera ou DRMO (*Deleterious Rhizosphere Microorganisms*) que podem ser prejudiciais para o hospedeiro, colonizando as raízes e impedindo seu desenvolvimento (SCHIPPERS, 1987). A seu modo, outras rizobactérias podem apresentar neutralidade em determinadas situações (COIMBRA et al., 2005). Dentre as PGPRs encontradas no rizoplano, destacam-se as do gênero *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia* e *Acetobacter*.

Os efeitos benéficos alcançados pela utilização de rizobactérias podem se dar de forma direta, através de estímulos para o crescimento da planta, quando na ausência de microrganismos patogênicos, ou de forma indireta, através de proteção contra patógenos (WELLER, 1988).

### 2.4.1. Mecanismos de ação benéfica direta

Os mecanismos de ação direta ocorrem quando das rizobactérias resultam diferentes compostos disponíveis para assimilação e uso pela planta, à semelhança de certos nutrientes (LUZ, 1996; ROMEIRO, 2005). Rizobactérias podem, ainda de forma direta, elevar as taxas de germinação das sementes e também do crescimento radicular, melhorando assim o desenvolvimento da parte aérea que, conseqüentemente, melhora o desenvolvimento da planta (BARKA et al., 2000). Essas ações diretas decorrem da solubilização de fosfato, aumento da disponibilidade de nutrientes, fixação e absorção de elementos de crescimento (nitrogênio, fósforo e ferro) (ZEHNDER et al., 2001), produção de fitorreguladores vegetais (auxinas, citocininas e giberelinas), e inibição da síntese do etileno (CATTELAN, 1999).

#### 2.4.1.1. Obtenção de nutrientes (Absorção/Fixação de elementos)

As PGPRs aumentam a disponibilidade de nutrientes para plantas por solubilização e outras atividades cíclicas, a partir da matéria orgânica existente no ambiente. Utilizando essa matéria orgânica como substrato, liberam no ambiente aminoácidos, vitaminas e íons de elementos essenciais. Na natureza, a fixação de nitrogênio livre (N) é realizada por bactérias, algumas não associativas e outras simbióticas. A fixação de nitrogênio gasoso (N<sub>2</sub>) da atmosfera e redução para amônia (NH<sub>3</sub>) se dá pela ação do complexo enzimático 'nitrogenase'. Algumas PGPRs têm capacidade de fixar N para a planta que as abrigam simbiótica- ou assimbioticamente, convertendo-os em amônia em condições onde há falta de disponibilidade de nitrogênio mineral (FERNANDES et al.; 2001; ROMEIRO, 2007). Bactérias do gênero *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* e *Rhizobium*, entre outros, demonstram papel relevante como fixadoras de nitrogênio através de nódulos das raízes de certas plantas (HANSEN, 1994).

Outro mecanismo direto pelo qual as PGPRs podem promover o crescimento da planta é na produção de sideróforos como alternativa para transferir ferro (Fe) para o vegetal (ROMEIRO, 2007). O ferro é um elemento importante e encontra-se

na maioria das vezes na forma insolúvel que não é absorvida pelas plantas. De forma geral, as raízes sintetizam e liberam na rizosfera compostos orgânicos como quelantes e fitossideróforos. Estes se ligam ao  $Fe^{+3}$ , forma oxidada encontrada no solo e colocam em contato com o rizoplasma, onde é reduzido para  $Fe^{+2}$ , forma em que a planta absorve mais facilmente este nutriente (VESSEY, 2003). Muitas bactérias produzem sideróforos que se associam ao  $Fe^{+3}$ , disponibilizando-o de forma ativa às plantas (SIDDIQUI & SHAUKAT, 2002).

O fósforo (P) é um macronutriente essencial para crescimento de vegetais e existe em grande quantidade no solo. Mas nem sempre esse macronutriente está de forma disponível para as plantas. A maior parte do fósforo no solo encontra-se insolúvel e as plantas só conseguem absorver na forma de fosfato monobásico ( $H_2PO_4^-$ ) ou dibásico ( $HPO_4^{2-}$ ) (MICHEREFF & BARRO, 2001). As rizobactérias produzem ácidos inorgânicos e orgânicos como o glucônico, acético, láctico, etc. Esse tipo de bactéria também sintetiza enzimas do tipo 'fosfatase', exercendo ação solubilizadora direta sobre os fosfatos inorgânicos. Entre os gêneros rizobacterianos que apresentam esta capacidade estão as *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Rhizobium* e *Agrobacterium* (CATTELAN et al.; 1999; RODRIGUEZ et al., 2000; GARG et al., 2001).

#### 2.4.1.2. Indução da produção de fitorreguladores

Há rizobactérias que interagem com a planta e são capazes de sintetizar fitorreguladores e análogos de auxinas, citocininas e giberelinas. Essas substâncias desempenham funções que são importantes no crescimento de plantas, como o desenvolvimento da parte aérea, aumento do crescimento das raízes e número de pêlos foliares (LUZ, 1996; CATTELAN, 1999).

As auxinas produzidas por muitas PGPRs participam em processos fisiológicos relacionados a crescimento, tais como emissão de raízes laterais e adventícias, divisão e alongamento celular. O fitorregulador ácido indol-acético (AIA) é a auxina mais ativa na planta. PGPRs que produzem esse regulador de crescimento, aumentando a absorção de nutrientes; pertencem aos gêneros *Azospirillum*, *Enterobacter* e *Rhizobium* (ANTOUN et al.; 1998; MIRZA et al.; 2001).

As citocininas também são fitorreguladores que estão relacionadas com o ciclo da célula vegetal e a expansão de alguns tecidos de plantas (ROMEIRO, 2001). Rizobactérias como *Pseudomonas fluorescens* e *Rhizobium leguminosarum* sintetizam esse fitorregulador. Já a giberelina participa no desenvolvimento das plantas através de alterações de morfologia e alongamento de caules, sendo o mais conhecido o ácido giberélico. A produção desse último fitorregulador é observada em rizobactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* (*B. pumillus* e *B. licheniformis*) (GUTIERREZ et al.; 2001).

Outro mecanismo importante pelo qual as PGPRs promovem o desenvolvimento da planta é através da inibição da síntese do etileno. O precursor da rota dessa biossíntese nas plantas é o ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilato). O etileno também é um fitorregulador envolvido no crescimento da plantas, mas pode trazer benefícios ou efeitos deletérios, dependendo das concentrações e estágio do desenvolvimento da planta (BRUNETTA, 2006). Caso a quantidade de etileno estiver alta após a germinação, há inibição do crescimento radicular. Por isso, é necessário que as PGPRs inibam a síntese desse fitorregulador através da produção de ACC-desaminase, que decomporia ACC, bloqueando a síntese de etileno na rizosfera (ROMEIRO, 2007).

#### **2.4.2. Mecanismos de ação indireta**

Já o modo indireto de benefício à planta dá-se exatamente pela ação como agente de biocontrole. Em algumas situações, é possível que as PGPR também auxiliem no controle biológico clássico (ROMEIRO, 1999), através dos mecanismos de antibiose, parasitismo, competição, hipovirulência, predação ou indução de resistência do hospedeiro (BETTIOL & GHINI, 1995).

##### **2.4.2.1. Ação antagônica sobre fitopatôgenos**

A antibiose consiste na produção de metabólitos secundários de ação antimicrobiana. Estirpes fluorescentes de *Pseudomonas* e espécies de *Bacillus* apresentam capacidade de suprimir microrganismos fitopatogênicos através da secreção de metabólitos extracelulares, inibitórios mesmo em baixas concentrações. Os metabólitos envolvidos na supressão de fitopatógenos são descritos, na sua grande maioria, como antibióticos voláteis ou não voláteis (SIDDIQUI, 2006). No âmbito do CB, especificamente, foram observados mecanismos de ação envolvendo competição por substrato e nutrientes, produção e secreção de antibióticos de natureza bactericida, fungicida, micostática e nematocida (LUZ, 1996; FREITAS & PIZZINATTO, 1991), sideróforos, enzimas hidrolíticas e outras moléculas com efeito de antagonismo (BRUNETTA, 2006).

#### **2.4.2.2. Indução de resistência sistêmica**

A ação antagonica de rizobactérias também está vinculada à indução de resistência sistêmica, ou 'ISR' (*induced systemic resistance*), na qual moléculas liberadas pelas rizobactérias atuam como elicitoras de vias bioquímicas, provavelmente de jasminatos ou etileno (ROMEIRO, 2005; VALLAD & GOODMAN, 2004) que, por sua vez, alteram a expressão gênica ativando genes de resistência da planta. Possíveis substâncias secretadas pelas rizobactérias que atuam como elicitoras podem ser o lipossacarídeo da parede celular das rizobactérias (LPS), sideróforos ou ácido salicílico (VALLAD & GOODMAN, 2004).

A ISR é um método de ativação dos mecanismos de defesa latentes da planta, através de tratamentos envolvendo eliciadores, formando barreiras estruturais (*e.g.*, acúmulo de lignina em tecidos adjacentes ao local de penetração do microrganismo) e químicas [síntese de fitoalexinas e proteínas relacionadas a patogenicidade (PR-proteínas, como peroxidases, quitinases e glucanases)] (ROMEIRO, 2002; GUZZO, 2007; SILVA, PASCHOLATI & BEDENDO, 2007), o que resulta no impedimento, atraso e/ou redução da infecção pelo patógeno, levando assim a redução de suas atividades em plantas hospedeiras (SOBRINHO, FERREIRA & CAVALCANTI, 2005).

A ISR é caracterizada, ainda, pela expressão de genes atrelados a sinalização

bioquímica da planta a pontos distantes do sítio onde o sinal de reconhecimento do patógeno foi originado, promovendo aumento na atividade de rotas metabólicas envolvidas na percepção da presença de patógenos pela planta como um todo (MACAGNAN, 2007). Já se encontra descrita uma grande quantidade de rizobactérias que atuam com indutores de resistência (ROMEIRO, 2005), sendo exemplos relevantes aquelas descritas nos patossistemas *Fusarium* spp./Cravo (VAN PEER et al., 1991) e *Colletotrichum* spp./pepino (WEI et al., 1991).

## 2.5. RIZOBACTÉRIAS EM PASSIFLORA

Algumas pesquisas já foram conduzidas com a seleção de rizobactérias da rizosfera pertencentes ao gênero *Passiflora* para estudos de diversidade morfológica e fenotípica. Esses trabalhos vêm sendo desenvolvidos com intuito de selecionar rizobactérias que tenham efeito benéfico de promoção de crescimento e de proteção a fitopatógenos. Esses estudos já mostraram que bactérias coletadas da rizosfera de *Passiflora edulis* possuem uma grande diversidade morfológica (MENEZES et al., 2007a). Além disso, algumas dessas rizobactérias apresentaram potencial na promoção de crescimento de mudas de maracujazeiro amarelo e antagonismo *in vitro* aos fungos *Colletotrichum gloeosporioides*, causador da antracnose em pós-colheita de frutos de maracujá, e ao *Fusarium solani* e *F. oxysporum* f. sp. *passiflorae*, causador da podridão do pé em maracujazeiro amarelo (MENEZES et al.; 2007b; SILVA et al.; 2008; VIEIRA et al., 2009).

Rizosferas de *Passiflora cincinnata* e *P. trinta*, também demonstraram em estudo uma diversidade de características morfológicas (VIEIRA et al., 2010a). Através dessa estratégia, pôde-se selecionar rizobactérias com efeito significativo *in vitro* quanto ao potencial antagônico à doença causadora da mancha bacteriana: *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (VIEIRA et al., 2010b). Na literatura são observados casos de sucesso no controle de patógenos *in vitro* utilizando rizobactérias. Mas, ainda há poucos relatos da ação de bactérias da rizosfera em plantas de maracujazeiros quanto aos prováveis benefícios que as mesmas podem trazer para esse vegetal.

## 2.5. TEORIA HOLOGENÔMICA

### 2.5.1. Holobionte e evolução

Simbiose é associação de diferentes espécies de organismos, que pode ser permanente ou duradoura (PARACER et al.; 2000). Provavelmente, eucariontes surgiram a partir de procariontes e mantiveram-se em estreita relação com eles desde então. Portanto, não é surpreendente que as superfícies e interiores de animais e plantas sempre contenham uma grande abundância e variedade de microrganismos (DOUGLAS, 1998).

Os microrganismos têm a capacidade de, quando estiverem em uma relação simbiótica, influenciar de maneira benéfica o metabolismo e a fisiologia dos hospedeiros em troca de proteção e nutrição (SELOSSE, 2004). Diante desse conhecimento, surgiu recentemente a 'Teoria Hologenômica da Evolução', que considera o 'holobionte' (animal ou planta com todos seus microrganismos associados) como uma unidade. O 'hologenoma' (somatório da informação genética do hospedeiro e sua porção microbiana associada) é proposto como esta unidade básica sobre a qual atuam as forças evolutivas. Esta teoria tem buscado o entendimento, sob um ponto de vista integrado/sistêmico, das diversas interações genéticas e metabólicas que a microbiota simbiótica exerce sobre seus hospedeiros (ZILBER-ROSENBERG & ROSENBERG, 2008).

A Teoria Hologenômica surgiu a partir de estudos relacionados ao branqueamento da espécie de coral *Oculina patagonica*, como resultado da infecção por *Vibrio shiloi* que ocorre em todo o verão quando a temperatura do mar ultrapassa a 25C°. Após anos de estudos sobre os mecanismos de infecção, observou-se que os corais tornaram-se resistentes à infecção pelo patógeno *V. shiloi* (ZILBER-ROSENBERG & ROSENBERG, 2008). As tentativas de explicar esta resistência levaram a hipótese do 'Coral Probiótico', que postula que os corais podem adaptar-se ao seu ambiente, incluindo a resistência a patógenos, alterando a composição de suas bactérias simbióticas (RESHEF et al.; 2006). Em outras palavras, em se alterando a constituição genética do holobionte tem-se resposta aos estímulos ambientais.

### **2.5.2. Hologenoma e ação das forças evolutivas**

A teoria Hologenômica é baseada em quatro generalizações-chaves: (i) todas as espécies multicelulares estabelecem relações simbióticas/mutualísticas com microrganismos; (ii) microrganismos simbiontes são transmitidos fielmente entre gerações; (iii) a associação entre o hospedeiro e simbionte afeta a adequação do holobionte dentro de seu ambiente e (iv) a variação do hologenoma pode ser provocada por mudanças genéticas tanto nas células do hospedeiro quanto em sua microbiota, por meio da alteração na composição relativa de seus microrganismos.

A teoria preconiza que, sob estresse ambiental, a estrutura/composição da comunidade microbiana interna e externa associadas podem mudar rapidamente, permitindo melhor adaptação do holobionte ao meio. Estas generalizações sugerem, portanto, que o patrimônio genético de diversos microrganismos simbiontes pode desempenhar um papel crucial na evolução dos organismos superiores.

É proposto pela teoria que, durante os períodos de rápidas mudanças no ambiente e, conseqüentemente, da fisiologia da planta, a dinâmica de diversidade da comunidade microbiana simbionte pode ajudar o holobionte a sobreviver e se multiplicar, dando o tempo necessário para o genoma nuclear do hospedeiro evoluir. Além disso, a teoria hologenômica incorpora aspectos de Lamarckismo dentro de um contexto Darwinista, quando vislumbra a possibilidade de evolução do holobionte também por métodos adaptativos ao seu ambiente, com a probabilidade de passar características adquiridas (isto é, novas composições da microbiota) à próxima geração (ROSENBERG et al.; 2009).

Os microrganismos em simbiose/mutualismo com animais e plantas podem ter sido/ser elementos essenciais de resposta diante dos impactos dessas mudanças e parte integrante do processo evolutivo dos eucariontes (holobiontes). As principais conseqüências desta teoria referem-se à mudança de concepção dos problemas científicos/experimentais a serem abordados, bem como à forma de interpretação/discussão dos resultados.



## 2.6. MÉTODOS FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS DE TAXONOMIA MICROBIANA

Métodos fenotípicos tradicionais são utilizados em protocolos de identificação de alguns microrganismos, compreendendo dados morfológicos, estruturais, fisiológicos e bioquímicos, o que possibilita a geração de informações diversificadas. Esses métodos incluem análise de forma, coloração, elevação, textura e bordas de colônias; teste de Gram; crescimento em diferentes fontes de C, de N, valores de pH, luz, etc. Estes métodos são considerados clássicos em microbiologia, permitindo a utilização de diversos isolados com características fenotípicas semelhantes, e possibilitando a descrição de novos gêneros e espécies bacterianas. Além disso, auxiliam no estudo comparativo do comportamento dos diferentes grupos, podendo utilizar dendrogramas baseados em análises de agrupamento a partir das várias informações fenotípicas de importância para taxonomia (VANDAMME et al.; 1996). Análises fenotípicas podem ser utilizadas como critérios de agrupamento para seleção de isolados representativos, que poderão seguir posteriormente para análises por métodos genotípicos.

Já os métodos taxonômicos genotípicos são análises baseadas nas moléculas de DNA e RNA. São ferramentas úteis para o conhecimento da diversidade de organismos, acrescentando informações que não são possíveis de serem fornecidas pelos métodos fenotípicos tradicionais. Avanços na biologia molecular têm contribuído de forma significativa nesse sentido, principalmente na taxonomia e em estudos de biodiversidade microbiana, permitindo a identificação e classificação mais rápida e confiável de microrganismos.

A caracterização genotípica utiliza-se de tecnologias que são baseadas em PCR (*Polymerase Chain Reaction*), seqüenciamento de genes de interesse, hibridização de sondas oligonucleotídicas e clonagem (MELO, 2002). No caso das bactérias, o sequenciamento de genes que codificam para as subunidades 16S, 23S e 5S do RNA ribossomal é o método mais empregado para estudos de diversidade. Estes genes de rRNAs são preferencialmente escolhidos porque estão presentes em todos os organismos, possuem funções altamente específicas que são estabilizadas ao longo da evolução, e não sofrem influência por mudanças no meio ambiente (ROSADO & DUARTE, 2002).

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DE ISOLADOS RIZOBACTERIANOS

Amostras de solos de rizosfera de maracujazeiro 'amarelo' foram coletadas de campos de produção pertencentes aos municípios de Livramento de Nossa Senhora (LNS) e Canavieiras (CAN), no Estado da Bahia. Tais amostras foram procedentes de plantas de maracujazeiros sadias e, ou que apresentavam alta incidência de ataque de patógenos. Em cada município, foram coletadas amostras de solo e raízes nos dois locais, totalizando quatro locais de coleta. Em cada local foram retirados amostras de cinco plantas escolhidas aleatoriamente. Os isolados rizobacterianos coletados em LNS pertencem ao banco de isolados que foram originalmente desenvolvidos na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – *campus* Vitória da Conquista.

Para o isolamento de rizobactérias, 10 g de solo de rizosfera e de rizoplano provenientes das plantas de maracujazeiro amarelos foram colocadas em Erlenmeyer de 250 mL<sup>-1</sup>, contendo 90 mL<sup>-1</sup> de solução salina (0,85% de NaCl) estéril e submetidas à agitação em agitador magnético por 15 min. Após isso, 1 mL das suspensões bacterianas foram pipetados em tubos de ensaio, contendo 9 mL<sup>-1</sup> de solução salina, até a diluição de 10<sup>-7</sup>. Adicionalmente, foram depositados 100 µL das amostras obtidas em cada uma das quatro últimas diluições em uma placa de Petri contendo meio de cultura TSA (5 g de peptona; 15 g de triptona; 5 g de NaCl; 15 g de ágar em 1000 mL<sup>-1</sup> de água destilada), conforme descrito em Romeiro (2007). Essas amostras foram espalhadas com alça de Drigalski sobre a superfície do meio.

As placas foram mantidas em incubadora B.O.D. a 26 °C para obtenção de culturas puras, com base na determinação do fator de diluição que permitiu o crescimento de colônias isoladas. Após o crescimento (48 h), foram selecionadas

colônias individualizadas, apresentando aspectos morfológicos distintos, sendo repicadas com auxílio de alça de platina para placas de Petri com meio TSA (ROMEIRO, 2007), através de estrias compostas para comprovar a purificação das culturas de rizobactérias. A partir do isolamento das rizobactérias foram realizados os testes fenotípicos e moleculares.

As rizobactérias isoladas (86 ao todo) foram cultivadas e preservadas em tubos com meio TSA (ROMEIRO, 2001) e em *Eppendorfs* com meio TSB e glicerina a 30%, sendo armazenadas a -80°C (MARIANO & ASSIS, 2005) para o uso contínuo nos ensaios realizados.

## **3.2. ANÁLISES FENOTÍPICAS**

### **3.2.1. Caracterização morfológica estrutural**

Após a purificação das culturas obtidas no processo de isolamento, foi feita a caracterização fenotípica das colônias, tendo como base as variáveis morfológicas de 'cromogênese' (amarelo, amarelo claro, amarelo esverdeado, laranja, branca, creme, etc.), 'brilho' (opaca ou brilhante), 'elevação' (plana, elevada, convexa ou umbilicada), 'borda' (perfeita, ondulada, lobada, denteada ou rizóide), 'opacidade/transparência' (transparente, translúcida, opaca ou brilhante), e 'superfície' (lisa, rugosa ou papilada). A variável 'fluorescência' (fluorescente ou não fluorescente) foi avaliada submetendo as colônias à luz com comprimento de onda próximo a luz negra em uma caixa fechada. Para caracterização quanto à coloração de Gram (positiva ou negativa), utilizou-se o teste de solubilidade em hidróxido de potássio (KOH). Neste teste uma gota de KOH foi depositada em uma lâmina de microscopia sendo misturada uma pequena quantidade de cultura de bactéria. Após homogeneização foi observado se a preparação tornou-se viscosa ou aquosa. Segundo Romeiro (2007), se o material aderir à alça de platina ficando pendente a cultura da bactéria é considerada como Gram-negativa, já que há dissolução das paredes da bactéria, sendo liberado DNA que deixa o material viscoso. O mesmo não ocorre para as bactérias Gram-positivas que possuem parede celular menos permeável e com maior teor de peptídeo-glicano (ROMEIRO, 1995).

A partir da caracterização morfológica, uma análise dos componentes principais (PCA) foi construída tomando por base a análise de dados dos oito aspectos analisados nessa caracterização. Com vistas a testar a hipótese de prospecção aleatória de isolados rizobacterianos, tendo por base a posição espacial que os mesmos apresentaram nos quatro quadrantes da PCA (formalmente a  $H_0$ , em oposição a  $H_1$ , em que a distribuição da frequência dos isolados difere entre os quadrantes), entre as duas localidades de coleta de rizobactérias; empregou-se o teste Qui-Quadrado de Contingência 4x2 (quadrantes da PCA *versus* localidades), com Correção de Yates ( $\alpha = 0,05$ ), por intermédio do software Bioestat 5.0 (AYRES et al, 2007).

### **3.2.2. Caracterização funcional**

#### **3.2.2.1. Teste de solubilização de fosfato**

Para testar a capacidade de solubilização de fosfato de cada isolado de rizobactéria, estes foram repicados em placas de Petri contendo meio NBRIP para microrganismos solubilizadores de P (NAUTIYAL et al., 1999): 10 g de glicose; 5g de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ; 5g de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,25 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,2 g de KCl; 0,1 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 1,5% de ágar e pH 7,0 para volume total igual a 1 L. As placas foram incubadas em câmara B.O.D. a 27 °C por 7 dias. Após esse período, a solubilização do fosfato foi detectada pela formação de halo claro em torno das colônias crescidas dos isolados. As rizobactérias utilizadas foram cultivadas em meio TSA como pré-inóculo, crescidas por 48h em placa de petri com TSA. O experimento foi realizado com duas repetições para cada isolado rizobacteriano. Com vistas a testar a hipótese  $H_0$  de igual frequência de isolados rizobacterianos capazes de solubilização de fosfato, entre as duas localidades de coleta de rizobactérias (em oposição a  $H_1$ , em que a distribuição da frequência dos isolados capazes de solubilizar fosfato difere entre os dois locais de coleta), empregou-se o teste de Qui-Quadrado de Contingência 2x2 (capacidade de solubilizar *versus* localidades], com Correção de Yates ( $\alpha = 0,05$ ), por intermédio do software Bioestat 5.0 (AYRES et al, 2007).

### **3.2.2.2. Bio-Ensaio de antagonismo in vitro ao fungo *Fusarium solani***

Este bioensaio buscou testar isolados de rizobactérias como potenciais inibidores no desenvolvimento do fungo patogênico à cultura do maracujazeiro amarelo. No centro de cada placa de Petri, contendo meio batata-dextrose-ágar (BDA), foi colocado um disco de micélio do *Fusarium solani*, fornecido pela EMBRAPA. Este fungo havia sido cultivado em meio BDA por sete dias em B.O.D. à 24 °C. Após a deposição dos discos, as placas foram incubadas em B.O.D. a 24 °C por 3 dias para o início do desenvolvimento do fungo. Depois os isolados bacterianos foram repicados com alça de platina em quatro pontos equidistantes da placa ao redor do disco de micélio inicialmente crescido. Foi distribuído apenas um isolado por placa, e as mesmas foram incubadas em B.O.D. a 25 °C por 5 dias. O ensaio montado teve 3 repetições por tratamento, sendo cada repetição constituída de uma placa de Petri. Após 7 dias foram medidos o diâmetro do patógeno e as análises de variância foram feitas no programa SAMS-AGRI, cujas médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5 % de significância. Com vistas a testar a hipótese  $H_0$  de igual frequência de isolados rizobacterianos capazes de antagonismo *in vitro* ao *F. solani*, entre as duas localidades de coleta de rizobactérias (em oposição a  $H_1$ , em que a distribuição da frequência dos isolados capazes de antagonizar o fungo difere entre os dois locais de coleta), empregou-se o teste Qui-Quadrado de Contingência 2x2 (capacidade de antagonizar *F. solani* versus localidades), com Correção de Yates ( $\alpha = 0,05$ ), pelo Bioestat 5.0 (AYRES et al; 2007).

### **3.2.2.3. Bio-Ensaio de Promoção de crescimento**

Este bio-ensaio buscou selecionar rizobactérias promotoras de crescimento de plantas em condições de casa-de-vegetação, comparando os resultados médios relativos de crescimento de plantas inoculadas com cada isolado, em relação a um lote de plantas oriundas de sementes que não foram inoculadas com rizobactérias previamente selecionadas

A inoculação de bactérias nas sementes foi obtida através de repicagem dos

isolados bacterianos em tubos falcon de 15ml com 5 mL de meio TSB, submetidos à agitação contínua a 250 rpm em agitador rotativo por 24h a 26 °C. Depois foi centrifugado por 10 min a 5000 rpm e retirado o sobrenadante. O pellete foi re-suspenso em solução salina de NaCl 0, 85% autoclavada até o volume de 3mL. A densidade ótica de cada suspensão foi ajustada para 0,2 de absorbância em 540 nm.

Para inoculação de bactérias, um lote de sementes de maracujazeiro 'amarelo' (empresa Isla) foi desinfestado, com etanol a 70% por 30 s e posteriormente em solução de hipoclorito de sódio a 1% por 3 min sendo, em seguida, lavadas por três vezes em água destilada. As sementes foram imersas por 45 min nas suspensões bacterianas [1 tratamento (isolado) por cada grupo de repetições de sementes] e, após esse período, postas para germinar em copos plásticos, contendo 250 g de substrato (50% húmus e 50% terra) esterilizado. Para o grupo controle, sementes foram tratadas somente com solução salina de NaCl 0, 85% autoclavada e mantidas nas mesmas condições que as sementes inoculadas com rizobactérias. Após esse período, as sementes, tanto do grupo de testes quanto dos controles, foram plantadas. Colocou-se quatro sementes por vaso, sendo mantida uma planta após a emergência.

Este ensaio foi instalado sob delineamento inteiramente casualizado composto por 87 tratamentos, onde cada tratamento é um isolado de rizobactéria oriundo de plantas de *P. edulis*, com cinco repetições (1 repetição = 1 semente). Para o tratamento controle foi empregado um grupo de cinco plantas.

As avaliações do experimento foram periodicamente conduzidas com vistas a mensurar as seguintes variáveis aos 60 dias de emergência: (i) número de folhas, (ii) comprimento da parte aérea da planta, medida da superfície do solo até o meristema apical de cada planta, (iii) comprimento da parte radicular, (iv) peso seco da parte aérea da planta, (v) peso seco do sistema radicular. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas no programa SAMS-AGRI via teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Para testar a hipótese  $H_0$  de igual frequência de isolados rizobacterianos entre as duas localidades de coleta de rizobactérias (em oposição a  $H_1$ , em que a distribuição da frequência dos isolados PGPR difere entre os dois locais de coleta), empregou-se o teste Qui-Quadrado de

Contingência 2x2 (capacidade de promover crescimento *versus* localidades), com Correção de Yates ( $\alpha = 0,05$ ), pelo Bioestat 5.0 (AYRES et al, 2007).

#### **3.2.2.4. Bio-Ensaio de Tolerância à seca**

Este ensaio buscou selecionar rizobactérias quanto ao potencial de indução de resistência ao estresse hídrico em plântulas de maracujazeiro amarelo. A metodologia para a inoculação de bactérias nas sementes e montagem do experimento é a mesma utilizada no item 3.2.2.3. As avaliações do experimento foram periodicamente conduzidas com vistas a analisar as plantas a partir de 30 dias após a semeadura. Neste período as mudas já apresentavam no mínimo cerca de três folhas. Após esse período as plantas passaram por duas etapas. A primeira etapa foi caracterizada por uma tolerância branda, onde as mudas passaram por ausência de irrigação por um período de sete dias. Essas plantas foram avaliadas no 5ª e 7ª dia de ausência de irrigação através de notas (1 a 2) dadas aos estados fisiológicos das mesmas: 1 (muda vigorosa) e 2 (muda murcha). Após esse período de sete dias, as mudas foram irrigadas com 5 mL<sup>-1</sup> de água por cinco dias. A segunda etapa, caracterizada por uma resistência extrema, as mudas passaram novamente pelo processo de ausência de irrigação, até o período da morte das mesmas. As mudas foram analisadas de três e três até o 18º dia, quando ocorreu a última morte; com vistas a analisar o estado fisiológico dessas mudas através de notas (1 a 4), onde 1 = muda vigorosa, 2 = muda murcha, 3 = muda amarelada e 4 = desfolha (quando era considerado a morte das mudas). Empregando-se somente a última nota (4) dessa escala, mensurou-se a variável 'índice temporal de mortalidade por déficit hídrico' (ITMDH), a qual é calculada, para cada repetição (*i.e.*, planta) como sendo a razão entre o número de dias em que a planta em questão morreu por estresse hídrico e o número máximo de dias. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas no programa SAMS-AGRI via teste Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Com vistas a testar a hipótese  $H_0$  de igual frequência de isolados rizobacterianos como promotores de tolerância à déficit hídrico, entre as duas localidades de coleta de rizobactérias (em oposição a  $H_1$ , em que a distribuição da

frequência dos isolados indutores de tolerância à seca difere entre os dois locais de coleta), empregou-se o teste Qui-Quadrado de Contingência 2x2 (capacidade de tolerância à seca *versus* localidades), com Correção de Yates ( $\alpha = 0,05$ ), por intermédio do software Bioestat 5.0 (AYRES et al, 2007).

### **3.2.3. Análises moleculares**

#### **3.2.3.1. Extração do DNA genômico**

Para a extração do DNA genômico, os isolados de rizobactérias foram crescidos em placas de Petri com meio TSA por 24 h em B.O.D. à 26 °C. Após crescimento, retirou-se uma alçada do isolado e colocou-se em tubo ependorf de 200 µL contendo 100 µL de água MilliQ e agitou-se no vortex. Em seguida, o tubo contendo a suspensão de rizobactérias foi colocado no termociclador por 10 min à 95 °C. Depois foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 s em microcentrífuga, sendo que o DNA no sobrenadante foi coletado, diluído 20 vezes em água MilliQ e preservado a -20 °C (SILVA, 2007, protocolo adaptado).

#### **3.2.3.2. Amplificação do DNA por primers correspondentes ao gene 16s rRNA**

A amplificação para a identificação molecular do fragmento do gene 16s rRNA presente nos isolados rizobacterianos foi realizada com os *primers* '8F' (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e '1429R' (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). As amplificações de PCR foram obtidas em um volume total de 25 µL por reação, usando 2,5 µL de tampão para PCR 10 X, 0,5 µL de dNTP 10 mM, 5 pmoles de cada *primer*, 1,5 µL de MgCl 50 mM, 0,3 µL de Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e 1 µL de DNA genômico. As amplificações de PCR foram realizadas em um termociclador e consistiram de uma desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, 34 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento de *primer* a 56 °C por 1 min, alongamento a 72 °C por 2 min e uma extensão final de 72 °C por 15 min.



### 3.2.3.3. Eletroforese em gel

A separação dos produtos amplificados pela PCR foi feita em géis de agarose, na concentração de 1,0%, com eletroforese de 45 min a 100V, utilizando o marcador *ladder* de DNA de 1 kb em tampão TAE [40 mM de Tris (pH 7,6), 20 mM de ácido acético, 1 mM de EDTA]. Foi adicionado e homogeneizado o brometo de etídio ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) na agarose antes de verter na cuba de eletroforese. Alíquotas de  $5 \mu\text{L}$  dos produtos de amplificação foram misturados com  $1 \mu\text{L}$  de tampão de amostra (glicerol 50%, EDTA 100 mM pH 8,0, azul de bromofenol 0,25%) e aplicados no gel. Os géis após a eletroforese foram visualizados através de luz ultravioleta, identificados e registrados através de um sistema de fotodocumentação, para a visualização das bandas.

### 3.2.3.4. Sequenciamento

Após a reação com as amostras, os produtos da PCR foram preparados para o sequenciamento. Para isso foi necessário quantificar o DNA, através de uma diluição de 10X em água milli-Q. A leitura da absorbância foi realizada em um espectrofotômetro, onde se utilizou o comprimento de onda 280 nm para a determinação de possíveis contaminações do mesmo (proteína e/ou fenol). Logo depois, analisaram-se os resultados de DNA na leitura da absorbância da relação 260/280 nm. A partir desses resultados, as amostras foram diluídas de acordo com a quantidade de DNA (30 a 60ng) exigido pela empresa de seqüenciamento. Foram então adicionadas  $6 \mu\text{l}$  de DNA na concentração estabelecida em tubo de microcentrífuga de 0,5 ml, acrescentando-se  $4,5 \text{ pmol}$  dos primers 8F e 1429R.

O sequenciamento das amostras foi realizado pela empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre-RS) utilizando o sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* de capilares com 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). Os DNA-moldes (30 a 60 ng) foram marcados utilizando-se  $4,5 \text{ pmol}$  do *primer* (8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1429R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')) e  $3 \mu\text{L}$  do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100* (Applied

Biosystems) em um volume final de 10  $\mu$ L. As reações de marcação foram realizadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 s, 55 °C por 5 s e 60 °C por 4 min. Uma vez marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol a 75% e lavagem com etanol a 60%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10  $\mu$ L de formamida Hi-Fi (Applied Biosystems), desnaturados a 95 °C por 5 min, resfriados em gelo por mais 5 min e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection* v 1.0.1 (Applied Biosystems) com os parâmetros *Dye Set* "Z"; *Mobility File* "DT3100POP6{BDv3}v1. mob"; *BioLIMS Project* "3100\_Project1"; *Run Module 1* "StdSeq50\_POP6\_50cm\_cfv\_100"; e *Analysis Module 1* "BC-3100SR\_Seq\_FASTA. saz".

## 4. RESULTADOS

### 4.1. ISOLAMENTO DE RIZOBACTÉRIAS

A metodologia adotada de inspeção visual simples para isolamento de bactérias cultiváveis da rizosfera e rizoplano de maracujazeiro amarelo possibilitou a obtenção de 86 rizobactérias, coletadas de dois locais distintos, com mesmos históricos de produção comercial de maracujá, mas distintas condições de incidência de moléstias fúngicas: municípios de Livramento de Nossa Senhora (LNS) e de Canavieiras (CAN). Do total coletado e cultivado *in vitro*, 53,5% pertenceu a LNS (Tabela 1). Após o procedimento de isolamento, as rizobactérias passaram pelo processo de análises fenotípicas baseadas nas diferentes características morfológicas e fisiológicas.

**Tabela 1:** Sumário dos isolados rizobacterianos provenientes das Cidades de Livramento de Nossa Senhora (LNS) e Canavieiras (CAN)

Local de coleta	Número de isolados	Incidência fusariose
LNS – A	29	alta
LNS – B	17	baixa <sup>1</sup>
CAN – A	12	alta
CAN – B	28	alta
<i>Total</i>	<i>86</i>	

<sup>1</sup> As plantas de maracujazeiro que foram abordadas neste grupo para a obtenção do solo de rizosfera e isolamento das bactérias (incluindo rizoplano) caracterizaram-se por estarem vigorosas e saudáveis em meio a outras atingidas pela doença.

### 4.2. ANÁLISES FENOTÍPICAS

O processo clássico de caracterização morfológica geral buscou estudar a diversidade dos isolados rizobacterianos com base nos seus aspectos fenotípicos,

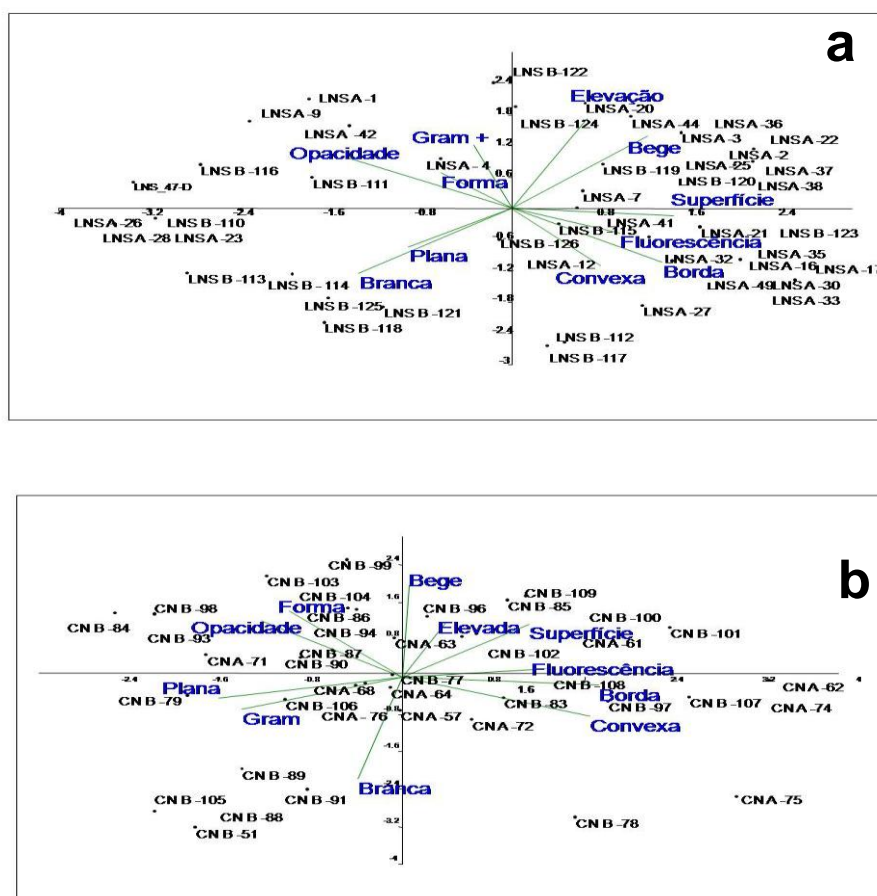
através de características observáveis que compõem a estrutura e comportamento desses isolados nas condições de cultivo *in vitro*, buscando-se inferir possíveis funções dos mesmos no contexto de isolamento.

#### **4.2.1. Caracterização morfológica estrutural**

As colônias de rizobactérias isoladas apresentaram uma grande variedade de características morfológicas quanto aos oitos aspectos considerados: forma, cor, opacidade, transparência, elevação, superfície, borda, Gram e fluorescência. Conforme indicado na Tabela 1, os isolados foram denominados por siglas (LNS e CAN), seguidas de letras (A e B) para indicar os respectivos locais de coleta, e numeração específica para cada um. Essas características morfológicas verificadas para os microrganismos foram apresentadas no item 8 (Apêndice).

A partir dos dados da caracterização morfológica, foi realizada uma análise de componentes principais (PCA), com objetivo de verificar se a diversidade fenotípica encontrada para os isolados de bactérias cultiváveis da rizosfera de maracujazeiro amarelo correspondeu adequadamente à metodologia não-seletiva de isolamento, ou se houve alguma tendência de concentração dos fenótipos em torno de somente algumas características morfológicas observadas. A partir da análise gráfica do tipo *biplot*, os resultados mostraram uma distribuição efetivamente homogênea dos isolados nos quatro quadrantes (Figura 1), com razoável 'espalhamento' dos isolados com base nas características morfológicas avaliadas, sem nenhum padrão específico de agrupamento quando se considera as duas regiões de coleta (LNS e CAN). Tal diversidade de bactérias cultiváveis nessas duas regiões indicou, portanto, que a metodologia adotada para o isolamento de rizobactérias (selecionar colônias com aspectos visuais bem distintos entre si) foi eficiente em capturar a maior diversidade possível de bactérias cultiváveis desse nicho. Apesar do espalhamento gráfico verificado para os isolados, duas características morfoculturais observadas foram diferentes em cada região. Na região de LNS a cor branca e o teste de Gram com resultado negativo foram mais frequentes, ao passo que na região de CAN observou-se mais a cor bege e obteve-se mais Gram positivos (dados não mostrados).

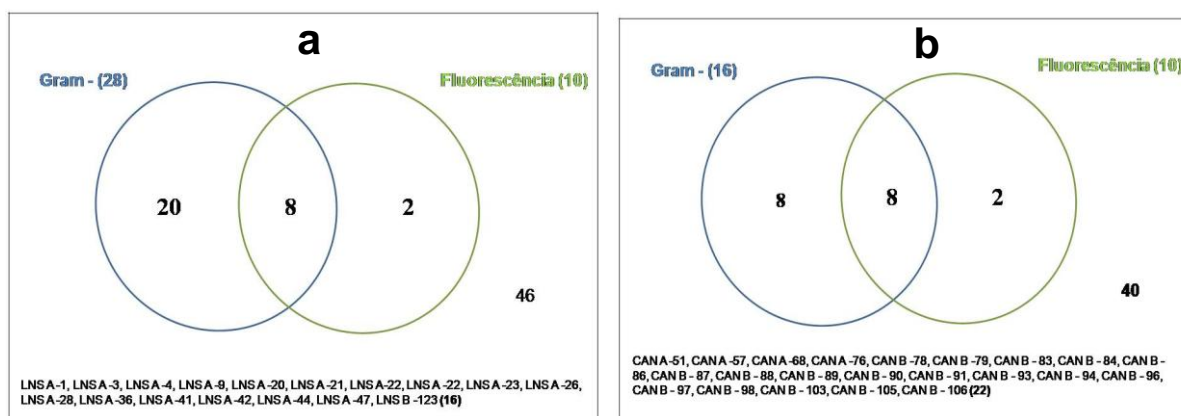
A partir dos resultados da análise de PCA, utilizou-se o teste de Qui-Quadrado de Contingência 4x2 (quadrantes da PCA *versus* localidades) para testar a distribuição da freqüência dos isolados de bactérias em cada quadrante entre as duas localidades de coleta. Este teste apresentou um valor de  $p$  com Correção de Yates de 0,44. Disto se conclui que a  $H_0$  de não diferença entre os quadrantes para as localidades foi aceita, indicando que a metodologia de seleção dos isolados foi homogênea quanto aos tipos de morfológicos prospectados em ambas as localidades (LNS e CAN).



**Figura 1:** Análise de componentes principais e *biplot* para características morfológicas de rizobactérias isoladas do rizoplano de maracujazeiro amarelo em campos de produção da Bahia. (a) Livramento de Nossa Senhora (LNS); (b) Canavieiras (CAN). Os isolados foram identificados com as siglas das respectivas regiões, seguidas das letras 'A' e 'B' para os dois locais distintos de coleta em cada uma, mais a numeração específica que identifica o isolado.

#### 4.2.2. Caracterização morfológica com possível função

A maioria dos gêneros de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (*Plant Growth-Promotion Rhizobacteria* ou PGPRs), ou com ação de biocontrole de fitopatógenos, contém espécies de bactérias Gram-negativas e fluorescentes. Estas são, portanto, duas importantes características morfológicas que tendem a estar presentes em microrganismos com essas funções biológicas importantes (KLOEPFER, 1993). Assim, bactérias que apresentam essas características morfológicas geralmente são consideradas como uma fonte relevante de bons isolados para bioprospecção dessas funções de interesse agrônômico. Neste estudo, a distribuição destas características entre os isolados foram analisadas através do método 'Diagrama de Venn' (Figura 2). Este diagrama mostra os isolados de rizobactérias que apresentaram ambas as características, isoladamente ou simultaneamente (intersecção entre os círculos).



**Figura 2:** Diagramas de Venn para isolados de rizobactérias de maracujazeiro 'amarelo', de campos de produção no estado da Bahia, com características morfológicas de Gram negativo e presença de fluorescência. (a) Livramento de Nossa Senhora (LNS); (b) Canavieiras (CAN). O número total de isolados classificados para cada região aparece à direita de cada diagrama. Para identificação dos isolados individuais, ver legenda da Figura 1.

Das 28 rizobactérias oriundas de Livramento de N. Senhora caracterizadas como Gram negativas, os isolados LNS-A-17, -30, -32, -33, -35, -37, -38 e -49 apresentaram também características de fluorescência (Figura 1a). Do total de isolados dessa região, 34,78% não apresentaram nenhuma dessas duas características (identificados abaixo do diagrama em 'a'). Dentre os isolados de

Livramento que apresentaram ambas as características, vale destacar os -17, -32, -35, -37, que também mostraram resultados significativos para os parâmetros funcionais de solubilização de fosfato, antagonismo *in vitro* a *Fusarium solani* e promoção de crescimento (ver a seguir), ou seja, 50% dos isolados Gram negativos e fluorescentes (Figura 1a) também apresentaram outras características funcionais de interesse. Já para a região de Canavieiras, das 16 rizobactérias Gram negativas obtidas, os isolados CAN-A-61, -62, -74, -75 e CAN-B-77, -101, -102, e -104 também apresentaram a característica de fluorescência. Do total de isolados dessa região, 55,0% não apresentaram nenhuma dessas duas características (abaixo do diagrama em 'b'). Dentre os isolados da região de Canavieiras que apresentaram ambas as características, merecem destaque o CAN-A -61 e -74, pois também mostraram resultados significativos para os parâmetros funcionais de antagonismo *in vitro* e tolerância à seca (a seguir). Portanto, 25% dos isolados Gram negativos e fluorescentes (Figura 1b) também apresentaram outras características funcionais de interesse.

Dos isolados que apresentaram somente uma das características (Gram negativos ou fluorescentes), em ambas as regiões, também se obteve resultados significativos para alguns deles em relação aos parâmetros de solubilização de fosfato, antagonismo *in vitro*, promoção de crescimento e tolerância à seca. Em Livramento, cinco dos 20 isolados que são apenas Gram negativos (LNS-B-117, -118, -119, -125, e -126) também foram significativos para promoção de crescimento, e os isolados LNS-A-2 e -12 somente fluorescentes foram simultaneamente significativos para antagonismo *in vitro* e promoção de crescimento. Por outro lado, dos 16 isolados de rizobactérias de Canavieiras que são apenas Gram negativos, apenas o CAN-B-100 apresentou significância quanto ao parâmetro solubilização de fosfato. Conforme será discutido nas seções a seguir, esses efeitos são todos importantes nas caracterizações funcionais dos isolados estudados.

### 4.2.3. Caracterização funcional

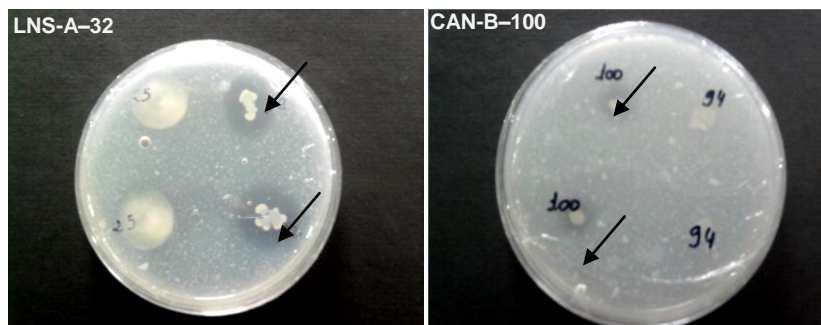
Buscou-se verificar os efeitos dos isolados bacterianos sob estudo em relação a quatro parâmetros de relevância agrônômica, sendo estas características fenotípicas (dos microrganismos ou da planta) que normalmente estão associadas à promoção de crescimento vegetativo da planta e, ou à proteção contra fitopatógenos. Esses parâmetros incluem solubilização de fosfato, antagonismo *in vitro* (cultura-dupla), biometria e biomassa das plântulas e tolerância à seca.

#### 4.2.3.1. Teste de solubilização de fosfato

A capacidade das rizobactérias isoladas em solubilizar fosfato foi verificada por meio de cultivo *in vitro* em meio NBRIP (*National Botanical Research Institute's Phosphate*) (NAUTIYAL, 1999) Após sete dias de incubação, observou-se a solubilização de fosfato através da formação de halo claro ao redor das colônias (Figura 3). Dos 86 isolados rizobacterianos, 10 (11,6%) foram capazes de solubilizar fosfato nessas condições. Dentre estes, seis foram isolados de Livramento (LNS-A-16, -32, -37, -44; LNS-B-113, -122) e quatro de Canavieiras (CAN-A-76; CAN-B-84, -97 e -100). Como será possível observar adiante, dentre essas bactérias que solubilizaram fosfato no meio NBRIP, os isolados LNS-A-16 e CAN-B-97 também apresentaram resultado significativo para promoção de crescimento. Além disso, os isolados LNS-A-32 e -37 estão representados no Diagrama de Venn para a presença das características Gram negativo e fluorescência, como acima citado (item 1.2.2).

Para identificar a frequência de isolados rizobacterianos capazes de solubilização de fosfato entre as duas localidades de coleta de rizobactérias foi utilizado o teste Qui-Quadrado de Contingência 2x2 (capacidade de solubilizar *versus* localidades). O resultado para o valor de  $p$  com Correção de Yates foi de 0,91, aceitando-se a  $H_0$  de não diferença entre localidades para essa característica. Disto se conclui que as diferenças nas frequência de isolados rizobacterianos solubilizadores de fosfato entre LNS e CAN se devem ao acaso.

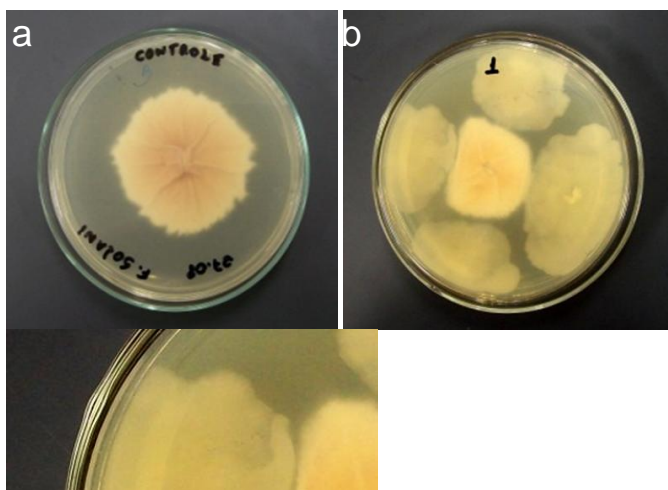




**Figura 3:** Ilustração de resultados do bioensaio de solubilização de fosfato *in vitro*, após 7 dias incubação. Os isolados (em duplicata por placa) estão identificados à esquerda e acima; setas indicam os halos de solubilização.

#### 4.2.3.2. Teste de antagonismo *in vitro* com o fungo *Fusarium solani*

Quanto ao antagonismo em condições controladas de cultura dupla (isolado-patógeno) contra o fungo causador da ‘podridão-do-pé’ em maracujazeiro, testou-se metade dos 86 isolados estudados (ver no item 3.1.3 de Metodologia). A escolha por esses isolados baseou-se em uma análise preliminar de um dendrograma de similaridade, feito a partir das características morfológicas (dados não mostrados), onde buscou-se selecionar representantes dos grupos formados. De todos os 43 isolados testados em cultura dupla, apenas 7 rizobactérias (LNS-A-1, -2, -3, -4, -7, -17 e CAN-A-61), inibiram o crescimento micelial do patógeno *Fusarium solani* em meio BDA, conforme ilustrado na Figura 4. Em todos os casos de inibição do crescimento do fungo, ocorreu um contato direto deste com as colônias de rizobactérias, que mostraram um aparente bloqueio físico ao fungo, não sendo formado nenhum halo de inibição ou de separação entre eles. Dentre esses isolados que inibiram o fungo, as bactérias LNS-A-1 e -4 causaram os menores diâmetros de crescimento do mesmo (Tabela 2). Dentre esses isolados, conforme indicado anteriormente (item 4.2.2), o LNS-A-17 e CAN-A-61 também apresentaram as características de serem Gram negativos e fluorescêntes, enquanto o isolado LNS-A-2 somente de fluorescência.



**Tabela 2:** Teste de antagonismo *in vitro* com o fungo *Fusarium solani*, avaliando-se o decréscimo do diâmetro da colônia do fungo pela ação das rizobactérias.

Isolados	Diâmetro <sup>1</sup> (cm)	Scott-Knott
<i>Controle</i>	4.6	a
<b>LNS A</b>		
1	2.13	c
2	2.33	b
3	2.46	b
4	1.96	c
7	2.43	b
17	2.26	b
<b>CAN A</b>		
61	2.26	b

<sup>1</sup> Os tratamentos foram feitos em triplicata, sendo medido o diâmetro da colônia central do fungo; os dados na Tabela correspondem à média de diâmetros das três repetições de cada tratamento

Com o objetivo de testar a frequência de isolados rizobacterianos capazes de antagonismo *in vitro* ao *F. solani* entre as duas localidades de coleta de rizobactérias, foi utilizado o teste Qui-Quadrado de Contingência 2x2 (capacidade de antagonizar *F. solani* vs localidades). O valor de *p* obtido com Correção de Yates foi

de 0,16. Disto se conclui que as diferenças nas frequências de isolados rizobacterianos antagonistas a *F. solani* entre LNS e CAN se devem ao acaso, aceitando-se  $H_0$ .

#### 4.2.3.3. Promoção de crescimento de mudas inoculadas com rizobactérias

Considerando que um dos importantes efeitos benéficos das rizobactérias está associado à promoção de crescimento vegetativo, testou-se os 86 isolados rizobacterianos em experimentos dessa natureza, avaliando-se o número de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CA), o comprimento de raízes (CR), o peso seco da parte aérea (PSA) e o de raízes (PSR) (Tabela 3). Após inoculação individualizada dos 86 isolados de rizobactérias em sementes de *P. edulis*, sendo estas plantadas em solo autoclavado e cultivadas por ~2 meses, observou-se que os valores encontrados para NF, CR e PSR foram todos estatisticamente de mesma magnitude ou inferiores ao controle sem inoculação. Porém, 15 desses isolados aparentemente favoreceram o crescimento vegetativo da muda, ao se observar as demais variáveis de comprimento (CA) e, ou peso seco da parte aérea (PSA). Os resultados mostraram que os isolados LNS-A-12, -16 apresentaram maiores valores somente quanto ao parâmetro CA, os isolados LNS-A-35; LNS-B-117, -118, -119, -125 e CAN-B-78, -97 apresentaram maiores valores somente quanto ao PSA, e os isolados LNS-A-17, -20, -21, -22, LNS-B-126 e CAN-A-57 aqueles com melhor efeito em ambos os parâmetros. Considerando que uma maior quantidade e, ou volume de raízes tendem a ser diretamente proporcionais a uma maior biomassa na parte aérea, é importante observar que alguns desses valores significativamente maiores que o controle para CA e PSA ocorreram mesmo com os respectivos valores de PSR sendo significativamente menores que o controle. De todos os isolados testados, 16,3% apresentaram efeitos deletérios para as mudas inoculadas. Este grupo foi composto pelos isolados LNS-A-1, -4, -7, -9, -27, LNS-B-114, -115, -122, CAN-A-61, -62, -64, CAN-B-71, -88, e -103, que apresentaram médias significativamente inferiores para todas variáveis em relação ao controle (Tabela 3). Neste grupo encontram-se quatro (57,1%) dos sete isolados que mostraram efeito de antagonismo *in vitro* (item 4.2.3.2), mas somente um que

apresentou fluorescência e Gram negativo (CAN-A-61) e nenhum dos que mostraram solubilização de fosfato (item 4.2.3.1). Por outro lado, dentre os isolados positivos para parâmetros associados à promoção de crescimento (CA e PSA), os isolados LNS-A-17 e -35 foram aqueles que se destacaram no diagrama de Venn (Figura 2) para as duas características analisadas, LNS-B-117, -118, -119, -125 e -126 somente para a característica Gram negativo, e LNS-A-12 somente para fluorescência.

**Tabela 3:** Ensaio de promoção de crescimento<sup>1</sup> de mudas de maracujazeiro amarelo inoculadas com 86 isolados bacterianos de rizosfera.

<b>Isolados</b>	<b>NF</b>	<b>CA</b>	<b>CR</b>	<b>PSA</b>	<b>PSR</b>
<i>CTRL</i>	6.4 <b>a</b>	13.3 <b>c</b>	10.4 <b>a</b>	1.054 <b>b</b>	0.646 <b>a</b>
<b>Livramento</b>					
<b>LNS A</b>					
1	5.6 b	11.5 d	10 b	0.794 c	0.392 b
2	6 a	12.3 c	9 c	0.866 c	0.408 b
3	5.2 b	11.9 c	10 b	0.902 c	0.362 b
4	5.6 b	11.1 d	9 c	0.89 c	0.286 b
7	5.2 b	10.4 d	8.3 c	0.532 d	0.33 b
9	4.2 b	10.1 d	8.3 c	0.356 d	0.208 b
12	6.8 a	19.8 a	10.8 a	0.994 b	0.39 <b>b</b>
16	6.6 a	17.8 a	10.9 a	1.076 b	0.6 a
17	6.4 a	18.7 a	9 c	1.276 a	0.414 <b>b</b>
20	7 a	16.6 b	8.2 c	1.442 a	0.566 a
21	7 a	15.7 b	8.5 c	1.512 a	0.728 a
22	6.6 a	18.56 a	9.8 b	1.408 a	0.646 a
23	5.6 b	11.4 d	9.8 b	1.08 b	0.368 b
25	5.6 b	12.5 c	9.6 b	0.912 c	0.344 b
27	5.2 b	11.4 d	10 b	0.758 c	0.43 b
26	6.4 a	12.9 c	11.5 a	0.994 b	0.718 a
28	5.6 b	12.4 c	10.7 a	0.982 b	0.396 b
30	5.6 b	11.8 c	10.9 a	0.698 d	0.39 b
32	6 a	12.4 c	11.2 a	0.616 d	0.338 b
33	6 a	12.8 c	10.8 a	1.044 b	0.82 a
35	5 b	12.5 c	10.7 a	1.318 a	0.576 a
36	5.4 b	12.4 c	11.3 a	0.86 c	0.582 a
37	6 a	13.8 c	11.3 a	1.152 b	0.752 a
38	5 b	11.9 c	10.2 a	0.962 b	0.442 b
41	5.8 a	11.9 c	10.4 a	0.818 c	0.462 b
42	5.6 b	12.2 c	11.2 a	1.008 b	0.466 b

Isolados	NF	CA	CR	PSA	PSR
44	3.8 b	12.1 c	8 c	0.638 d	0.32 b
47	6 a	10.9 d	10.1 b	0.636 d	0.348 b
49	5.4 b	11.7 c	10.6 a	0.65 d	0.39 b
<b>LNS B</b>					
110	5.2 b	11.1 d	10.5 a	1.076 b	0.6 a
111	5.4 b	11.1 d	10.6 a	1.062 b	0.432 b
112	6 a	13.2 c	11.3 a	0.94 c	0.458 b
113	6.8 a	14 c	11.3 a	1.022 b	0.6 a
114	5.6 b	11.2 d	9.8 b	0.8 c	0.444 b
115	4.6 b	9.1 d	10.1 b	0.93 c	0.458 b
116	5.2 b	11.6 d	10.3 a	0.992 b	0.426 b
117	6.6 a	13.9 c	11.9 a	1.202 a	0.414 b
118	6.2 a	12.3 c	11.2 a	1.378 a	0.658 a
119	5.6 b	12.1 c	10.8 a	1.404 a	0.68 a
120	5.4 b	11.3 d	10.5 a	1.162 b	0.436 b
121	4.2 b	12.5 c	8.4 c	0.826 c	0.37 b
122	5.4 b	10.9 d	9.8 b	0.89 c	0.42 b
123	6 a	13.2 c	10.8 a	1.114 b	0.614 a
124	5.6 b	11.8 c	10.9 a	1.144 b	0.546 a
125	5.8 a	12.1 c	10.1 b	1.246 a	0.384 b
126	6.4 a	16.8 b	9.8 b	1.222 a	0.65 a
<b>Canavieiras</b>					
<b>CAN A</b>					
51	5.6 b	12.8 c	9.9 b	1.13 b	0.454 b
57	6.4 a	15.5 b	9.6 b	1.322 a	0.488 b
61	5.4 b	11.1 d	9.9 b	0.922 c	0.686 a
62	5.2 b	10.5 d	8.7 c	0.462 d	0.228 b
63	6 a	12.3 c	9.5 b	0.81 c	0.364 b
64	5.2 b	10.6 d	9.4 b	0.558 d	0.362 b
68	5.4 b	10.8 d	9.9 b	0.812 c	0.562 a
71	4.2 b	9.4 d	9 c	0.468 d	0.37 b
72	5.4 b	11.6 d	9.6 b	1.034 b	0.704 a
74	5.6 b	12.3 c	10.1 b	0.824 c	0.42 b
75	6.8 a	12.9 c	11.6 a	0.646 d	0.362 b
76	6.8 a	13.1 c	11.1 a	0.644 d	0.354 b
<b>CAN B</b>					
77	5.4 b	12.4 c	9.8 b	1.028 b	0.81 a
78	5.6 b	11.7 c	10.8 a	1.222 a	0.592 a
79	5 b	10.2 d	10.1 b	1.01 b	0.52 b
83	5 b	10.6 d	10.9 a	1.146 b	0.776 a
84	5.6 b	11.3 d	10.3 a	0.888 c	0.56 a
85	5.4 b	10.7 d	10.2 a	1.11 b	0.708 a

Isolados	NF	CA	CR	PSA	PSR
86	5.2 b	11.8 c	10.8 a	0.988 b	0.444 b
87	5.2 b	10.6 d	10.3 a	0.796 c	0.442 b
88	4.8 b	10.6 d	9.7 b	0.908 c	0.496 b
89	5.6 b	11.2 d	10.2 a	1.016 b	0.5 b
90	4.8 b	11 d	10.8 a	1.018 b	0.392 b
91	5 b	10.8 d	10.8 a	0.728 c	0.392 b
93	5.2 b	10.9 d	10.1 b	0.642 d	0.354 b
94	5 b	11.6 d	10.5 a	0.834 c	0.596 a
96	5.6 b	11.5 d	10.4 a	1.078 b	0.73 a
97	4.6 b	9.9 d	9.7 b	1.208 a	0.568 a
98	5.6 b	11.4 d	10.9 a	0.804 c	0.514 b
99	5.4 b	12.4 c	9.9 b	1.124 b	0.72 a
100	5.2 b	10.7 d	10.8 a	0.936 c	0.486 b
101	5 b	10.4 d	11.1 a	0.804 c	0.452 b
102	6 a	11.8 c	10.4 a	0.86 c	0.494 b
103	5.6 b	10.5 d	9.9 b	0.818 c	0.468 b
104	6.2 a	11.5 d	10 b	1.072 b	0.468 b
105	6 a	12.5 c	10.6 a	0.96 b	0.43 b
106	6 a	12.1 c	10.6 a	0.856 c	0.402 b
107	6 a	11.8 c	10.6 a	1.028 b	0.366 b
108	5 b	12.9 c	9.7 b	0.928 c	0.414 b
109	4.8 b	11.4 d	10.7 a	0.922 c	0.592 a
CV %	17,301	15.316	11.5	27.446	31.925
F <sup>2</sup>	2.281	5.566	2.47	3.901	3.783

<sup>1</sup> As variáveis analisadas, ao final de **60** dias decorridos da sementeira, foram nº de folhas (NF), comprimento da parte aérea (CA) e de raízes (CR), e peso seco da parte aérea (PSA) e de raízes (PSR). O experimento foi repetido uma vez, com resultados semelhantes.

<sup>2</sup> Valores dos respectivos testes *F* encontrados para a análise da variância (ANOVA); os dados da Tabela são médias de 5 repetições por tratamento; médias seguidas de mesma letra (na coluna) não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de significância.

\* Código de cores para os resultados de **CA** e **PSA** que indicam promoção de crescimento para os respectivos isolados: em **verde** – ambas variáveis foram significativamente maiores, e **PSR** não diferiu do controle; em **amarelo** – ambas foram significativamente maiores e **PSR** foi significativamente menor que o controle; em **laranja** e **vermelho** – somente a variável **CA** foi significativamente maior, sendo **PSR** não diferente e menor que o controle, respectivamente; em **azul** e **rosa** – somente a variável **PSA** foi significativamente maior, sendo **PSR** não diferente e menor que o controle, respectivamente.

Para testar se houve diferenças na frequência de isolados tipados como PGPRs entre as duas localidades de coleta de rizobactérias foi utilizado o teste de Qui-Quadrado de Contingência 2x2 (capacidade de promover crescimento vs localidade). Os resultados obtidos para o valor de  $p$  com Correção de Yates foi de 0,047. Portanto, as diferenças nas frequências de isolados rizobacterianos promotores de crescimento entre LNS e CAN não se devem ao acaso. Ou seja, bactérias com essa característica funcional podem ser encontradas com mais frequência em uma das regiões de coleta.

#### **4.2.3.3. Ensaio de Tolerância à seca**

Indução de tolerância a estresses bióticos e, ou abióticos constitui-se num dos efeitos decorrentes da ação de endofíticos e rizobactérias em plantas (SILVEIRA & FREITAS, 2007). Buscando verificar se algum dos isolados sob estudo apresentaria tal efeito em mudas de maracujazeiro oriundas de sementes inoculadas, instalou-se um experimento de estresse hídrico com as 86 rizobactérias inoculadas individualmente em sementes de *P. edulis*. Neste ensaio procuramos identificar as alterações que poderiam ocorrer nas plantas quando colocadas em situações de ausência de irrigação. Dois tipos de reação foram testados: o primeiro considerado como 'tolerância branda', resultante de um estresse inicial de curto prazo, e o outro como 'resistência extrema', resultante de um estresse adicional e prolongado, até a morte das plântulas.

Na primeira etapa de tolerância à seca, provocou-se um estresse de ausência hídrica branda para as plantas por um período curto de sete dias, iniciado após 35 dias de rega regular e condições normais de crescimento. Os resultados obtidos para cada isolado permitiram a formação de cinco grupos distintos (A – E), conforme mostrado na Tabela 4, representando diferentes padrões de comportamentos de tolerância à seca branda. O grupo C composto de plantas tratadas com os isolados CAN-B-103 e LNS-B-120, e o grupo E com os isolados CAN-A-57 e -61 representam plântulas que foram mais tolerantes à seca ao longo de 7 dias, por terem se mantido mais vigorosas até o final do período. Por outro lado, o grupo B destacou-se como aquele de maior sensibilidade a esse período de ausência de

irrigação (Tabela 4). O grupo mais numeroso de tratamentos, compreendendo 75,6% dos isolados, correspondeu ao fenótipo do controle, indicando não haver efeito de tolerância à seca.

**Tabela 4:** Padrões de tolerância à seca<sup>1</sup> branda de mudas de maracujazeiro amarelo, inoculadas via semente com um de cada dos 86 isolados de rizobactérias sob estudo, após 7 dias de ausência de irrigação.

Plantas/ Isolados <sup>2</sup>	5 dias	7 dias	isolados	nº
Grupo A	1,5	2	LNS-A-25	1
Grupo B	2	2	LNS-A-7, -47, -49; CAN-A-62, -64, -68, -75; CAN-B-78, -79, -104, -105, -106, -107, -109, -116, -118	16
Grupo C	1,5	1,5	LNS-B-120, CAN-B-103	2
Grupo D	1	2	CTRL; LNS-A-1, -2, -3, -4, -9, -12, -16, -17, - 20, -21, -22, -23, -26, -27, -28, -30, -32, -33, - 35, -36, -37, -38, -41, -42, -44; LNS-B -110, -111, -112, -113, -114, -115, -117, -119, - 121, -122, -123, -124, -125, -126; CAN-A- 51, -63, -71, -72, -74, -76; CAN-B-77, -83, - 84, -85, -86, -87, -88, -89, -90, -91, -93, -94, -96, -97, -98, -99, -100, -101, -102, -108	65
Grupo E	1	1	CAN-A-57, -61	2

<sup>1</sup> Cinco mudas (repetições) por tratamento (isolado), incluindo o controle (sem inoculação) foram avaliadas após 5 e 7 dias de ausência de rega, iniciada após 30 dias de cultivo em condições normais, desde a semeadura. Uma escala simples de duas notas foi arbitrada para esta avaliação: 1 = normal, 2 = murcha; os dados da Tabela representam a média de notas para as repetições por tratamento.

<sup>2</sup> Os distintos padrões observados de reação ao estresse hídrico imposto por 7 dias permitiram agrupar todos os tratamentos em cinco grupos, com a seguinte ordem decrescente de tolerância branda entre grupos: E > C > D > A > B.

Após esse período de 7 dias de ausência hídrica, as plantas foram irrigadas por 5 dias para recuperação de seu estado fisiológico, quando tornaram a apresentar aparência normal. Em seguida, as plantas foram submetidas a um segundo momento de estresse hídrico, por um período maior, visando avaliar o que se considerou como 'resistência extrema'. As plantas foram analisadas até 18º dia de ausência de irrigação, período esse onde todas as plantas foram consideradas mortas. Foram verificadas as médias das notas das mudas para cada tratamento em cada tempo de avaliação e, a partir desses resultados, foi possível identificar 6



grupos de tratamentos com distintos padrões de comportamento das plantas (A' – F', Tabela 5). Os grupos E' (CAN-A-57) e F' (CAN-A-61 e -74) representam aquelas plantas que apresentaram melhores resultados quanto à tolerância à seca no período de 18 dias, pois apresentaram-se normais até o 6º dia, e até os 12 dias ainda permaneceram verdes, vindo a amarelecer somente aos 15 dias, quando as mudas dos demais tratamentos já estavam desfolhadas/mortas. Por outro lado, o grupo D' mostrou o comportamento de plantas mais sensíveis à seca, pois já no 3º dia de ausência de irrigação as plantas já se apresentaram murchas, e no 9º dia foi o único grupo de tratamentos em que as plantas já estavam amarelecidas.

É importante salientar que todas as rizobactérias que apresentaram a característica de promover uma maior tolerância ao estresse hídrico prolongado foram isolados da região de Canavieiras (Tabela 5). Novamente, o grupo mais numeroso, contendo 72,1% dos isolados, apresentou o mesmo padrão de comportamento do controle, indicando ausência de efeito de resposta ao estresse hídrico. Um resultado importante observado foi o comportamento das plantas inoculadas com isolados LNS-A-1, -2, -3, -4, -9, -12, -16, -17, -20, -21, -22, -23, -25, -26, -27, -28, -30, -32, -33, -35, -37, -38, -41, -42; LNS-B-110, -111, -112, -113, -114, -115, -117, -119, -121, -122, -123, -124, -126; CAN-A-51, -63, -71, -72, -76; CAN-B-77, -83, -84, -85, -86, -87, -88, -89, -90, -91, -93, -94, -96, -97, -98, -99, -100, -101, -102, -108: enquanto que no primeiro ensaio (tolerância branda) as mesmas estavam inseridas dentro dos grupos A e D, que apresentaram característica de murcha ao 7º dia de avaliação, no segundo momento de avaliação (resistência extrema), ao 6ª dia de ausência de irrigação, essas mesmas plantas localizaram-se dentro do grupo B' que apresentou característica de vigor normal. Além disso, dentre os isolados que apresentaram resposta significativa quanto à tolerância à seca, as bactérias CAN-A -61 e -74 destacaram-se no diagrama de Venn como Gram negativo e fluorescência.

**Tabela 5:** Padrões de tolerância extrema à seca<sup>1</sup> de mudas de maracujazeiro amarelo, inoculadas via semente com um de cada dos 86 isolados de rizobactérias sob estudo, após um segundo período de 18 dias de ausência de irrigação.

Plantas/ Isolados	Tempo (dias)						isolados	nº
	3	6	9	12	15	18		
Grupo A'	1,5	2,5	2,5	3	4	4	LNS-A-7, -25, -47 CTRL; LNS-A-1, -2, -3, -4, -9, -12, -16, -17, -20, -21, -22, -23, -25, -26, -27, -28, -30, -32, -33, -35, -37, -38, -41, -42; LNS-B-110, -111, -112, -113, -114, -115, -117, -119, -121, -122, -123, -124, -126; CAN-A-51, -63, -71, -72, -76; CAN-B-77, -83, -84, -85, -86, -87, -88, -89, -90, -91, -93, -94, -96, -97, -98, -99, -100, -101, -102, -108	3
Grupo B'	1	1	2	3	4	4	LNS-B-103, -104, -105, -106, -109, -116, -118, -120; CAN-A-62, -64, -68, -75; CAN-B-103, -104, -105, -106, -109	62
Grupo C'	1,5	2	2	3	4	4	LNS-A-36, -49; CAN-B-79, -107	17
Grupo D'	2	2	3	3	4	4	CAN-A-57	4
Grupo E'	1	1,5	2	2,5	3	4	CAN-A-61, -74	1
Grupo F'	1	1	2	2	3	4		2

<sup>1</sup> As mesmas mudas e controle do experimento anterior foram avaliadas após 18 dias de ausência de rega, precedidos por um intervalo de 5 dias de rega normalizada desde o final do estresse hídrico de 7 dias (ver rodapé Tabela 4). Uma escala de quatro notas foi arbitrada para a avaliação visual do aspecto geral das mudas (associadas a um código de cores para facilitar a visualização dos grupos): 1 = vigor normal (**verde**), 2 = murcha (**azul**), 3 = amarelecimento (**amarelo**) e 4 = desfolhamento/morte (**vermelho**). Os dados da Tabela representam a média de notas para as repetições por tratamento.

<sup>2</sup> Os distintos padrões de reação observados ao estresse hídrico imposto por 18 dias permitiram agrupar todos os tratamentos em seis grupos, com a seguinte ordem decrescente de tolerância extrema entre grupos: F' > E' > B' > C' > A' > D'.

Através da mensuração da variável 'índice temporal de mortalidade por déficit hídrico' (ITMDH) obteve-se as médias por meio de análise de variância comprovando assim que os mesmo isolados (CAN-A-57, -61 e -74) analisados anteriormente se destacaram estatisticamente em relação à média do controle (Tabela 6). Especificamente no caso de -57 e -61, vale ressaltar que os mesmos forneceram o mesmo padrão de maior tolerância à seca, em ambos os casos (branda e extrema – Tabelas 4 e 5).

Para analisar a frequência de isolados identificados como promotores de tolerância à déficit hídrico entre as duas localidades de coleta de rizobactérias, foi feito o teste Qui-Quadrado de Contingência 2x2 (incapacidade de promover

tolerância a déficit hídrico vs localidade), apresentando valor de  $p$  com Correção de Yates de 0,21. Disto se conclui que, apesar dos 3 isolados mais promissores como fornecedores de tolerância à seca terem sido originados de CAN, as diferenças nas frequências de isolados rizobacterianos promotores de tolerância à seca (branda e extrema), entre LNS e CAN, se devem ao acaso.

**Tabela 6:** Teste de Tolerância à seca. Segunda etapa: Resistência extrema. Médias do 'índice temporal de mortalidade por déficit hídrico' (ITMDH)

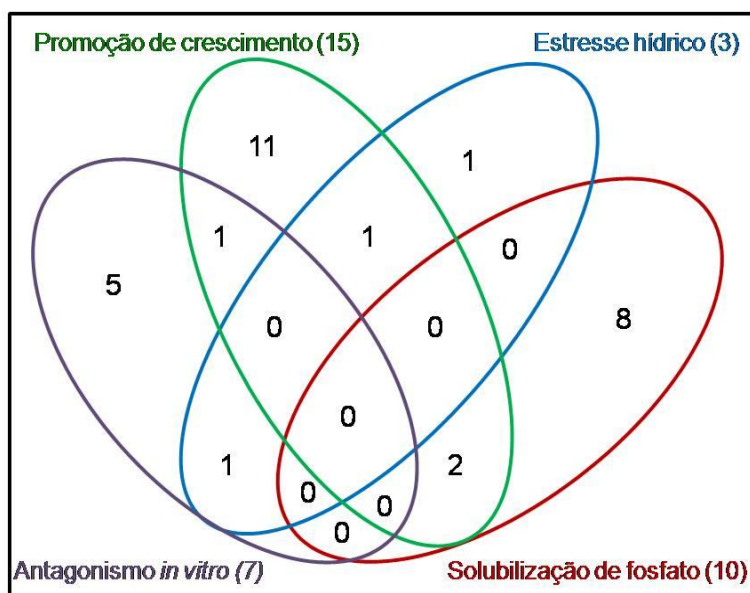
* Isolados	Média	Scott-Knott
Controle	0,83	c
<b>CAN A</b>		
57	0,96	b
61	1	a
74	1	a
<b>CAN B</b>		
100	0,83	c
<b>LNS A</b>		
7	0,76	d
<b>LNS B</b>		
44	0,83	c
CV (%)	1,82	
F (1%)	1,45	

\* Resultado com representação de alguns tratamentos.

#### 4.2.3.4. Análise integrada dos parâmetros funcionais

Observando o resultado das quatro análises fenotípicas (antagonismo *in vitro*, promoção de crescimento, tolerância à seca e solubilização de fosfato), algumas rizobactérias mostraram maior versatilidade funcional em relação aos demais isolados. Através da análise pelo diagrama de Venn (Figura 5) pôde-se verificar que alguns isolados rizobacterianos apresentaram mais de uma funcionalidade em relação aos testes realizados. Nenhum dos 86 isolados apresentaram três ou quatro funções simultaneamente. Dentre aqueles que se destacaram nas quatro análises de modo individual, alguns apresentaram duas características funcionais

simultaneamente. Por exemplo, o isolado LNS-A-17 apresentou resultados significativos para ambos os parâmetros de antagonismo e promoção de crescimento (comprimento e peso seco da parte aérea, o isolado CAN-A-57 destacou-se para ambos os parâmetros de promoção de crescimento e tolerância à seca branda e extrema, o isolado CAN-A-61 apresentou as características de antagonismo e de tolerância à seca, e os isolados LNS-A-16 e CAN-B-97 foram significativos para os parâmetros de solubilização de fosfato e promoção de crescimento, sendo o primeiro em relação ao comprimento e o segundo em relação ao peso seco da parte aérea.



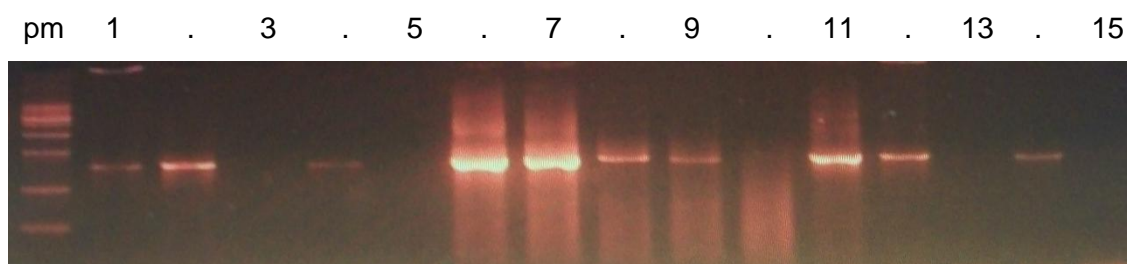
**Figura 6:** Diagrama de Venn para análise integradora dos isolados de rizobactérias que apresentaram funções de antagonismo *in vitro*, promoção de crescimento, tolerância à seca e solubilização de fosfato. Os isolados apresentados no texto correspondem aos números indicados nas intersecções dos respectivos conjuntos.

### 4.3. ANÁLISES MOLECULARES

#### 4.3.1. Identificação taxonômica via seqüenciamento

Uma vez encontrados isolados promissores em relação a alguma aplicação funcional, bem como se considerando a necessidade de melhor entender a composição e riqueza das amostras coletadas para além das caracterizações morfológicas, iniciou-se o trabalho de extração de DNA, amplificação e sequenciamento dos isolados. A extração de DNA pelo método do choque térmico e

sua utilização nas reações de amplificação foi realizado para 35 isolados, buscando-se definir os aspectos técnicos do procedimento. A amplificação do DNA das rizobactérias com oligonucleotídeos específicos para a sequência 16s rDNA, porém, foi possível somente com 10 isolados (Figura 7), sendo que quantidades suficientes para o sequenciamento foi possível com sete isolados rizobacterianos. Das 14 amostras enviadas para seqüenciamento (*forward* e *reverse*), somente 4 seqüências de dois isolados retornaram até o momento. Por meio do programa BlastN ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), os fragmentos de 16s rDNA obtidos no seqüenciamento para estes dois isolados foram comparados com as seqüências depositadas no *GenBank* para a determinação do gênero e espécie. A partir disso, os isolados LNS-A-1 e CAN-B-100 foram classificados como *Bacillus methylotrophicus* e *Acinetobacter* sp., respectivamente. Os demais isolados que aguardam resultado do sequenciamento são LNS-A-17,-20,-36; CAN-B-74, -84, incluindo aqueles que demonstraram significâncias funcionais nas quatro análises fenotípicas realizadas (item 4.2.3). Estudos técnicos estão sendo continuados no sentido de permitir extração de DNA e amplificação de todos os 86 isolados para um estudo mais detalhado e aprofundado da diversidade rizobacteriana cultivável de maracujazeiro amarelo, isolados dos municípios de Livramento de Nossa Senhora e Canavieiras.



**Figura 7:** Amplificação de 16s rDNA a partir de *primers* específicos em 15 isolados rizobacterianos isolados da rizosfera de maracujazeiro amarelo. 'pm' – padrão de peso molecular, 1 – LNS-A-20, 2 – LNS-A-17, 3 – LNS-A-37, 4 – LNS-A-4, 5 – LNS-A-9, 6 – LNS-A-1, 7 – LNS-A-2, 8 – LNS-B-110, 9 – LNS-A-111, 10 – LNS-B-113, 3 – CAN-A-51, 11 – CAN-B-100, 12 – CAN-B-103, 13 – CAN-B-104, 14 – CAN-B-105, 15 – controle negativo. Os isolados que foram seqüenciados correspondem às canaletas 6 e 11.

## **5. DISCUSSÃO**

Através do isolamento de bactérias associadas à rizosfera do maracujazeiro 'amarelo' em diferentes áreas de produção comercial da fruta, selecionou-se uma variedade de bactérias cultiváveis, buscando-se estudar seu potencial em beneficiar o crescimento e desenvolvimento sadio desse vegetal. Estudos trabalhando com isolamento de bactérias da rizosfera em outras espécies mostraram a diversidade das mesmas em culturas e demonstraram a efetividade dessa abordagem no sentido de identificar isolados promissores para aplicações agronômicas com efeitos benéficos às plantas (ROMEIRO, 2007, SILVEIRA & FREITAS, 2007).

Os métodos fenotípicos são importantes como uma primeira avaliação da diversidade de populações microbianas. Pode-se dizer que as características fenotípicas encontradas podem ser um reflexo das diferentes informações genéticas presentes na comunidade de rizobactérias. No caso desse estudo, esta caracterização serviu como critério inicial de agrupamento para permitir uma caracterização preliminar da diversidade coletada, bem como para selecionar isolados representativos de grupos formados para análises posteriores. Neste trabalho, focou-se em aspectos estruturais básicos e na análise de possíveis ações exercidas pelos microrganismos que puderam surtir efeitos benéficos visíveis no fenótipo da planta tratadas com estes microrganismos.

### **5.1. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA ESTRUTURAL**

A caracterização morfológica dos 86 isolados de bactérias obtidos da rizosfera de maracujazeiro 'amarelo' mostrou uma grande diversidade morfológica da comunidade bacteriana cultivável. É provável que isso seja decorrência de que a rizosfera é o ambiente onde normalmente encontra-se um maior número de

microrganismos, devido à presença dos diversos exsudatos radiculares liberados pelos vegetais (NEHL et al., 1996). Por esse motivo, as populações bacterianas tendem a ser mais abundantes e diversas no entorno das raízes do que em solos adjacentes (LUGTENBERG et al., 1999, MOREIRA & SIQUEIRA, 2006) ou até mesmo em qualquer outro órgão vegetal na condição de endofíticas (ELVIRA-RECUENCO et al., 2000). Para Raghothama (1999), os exsudatos radiculares enriquecem o solo com uma variedade de compostos orgânicos (açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos, vitaminas etc.) servindo de fontes de nutrientes para microrganismos. Devido à diversidade de populações bacterianas encontradas na rizosfera de maracujazeiro amarelo e às interações microrganismos-plantas que se criam, há grandes chances de se encontrar organismos com efeitos benéficos às plantas e desse modo com potencial de aplicação biotecnológica em aspectos agrônômicos.

A análise de PCA confirmou que o procedimento de isolamento utilizado permitiu a obtenção de uma grande diversidade de características morfológicas e fenotípicas (Figura 1). A coleta realizada em diferentes regiões foi importante porque provavelmente possibilitou alcançar uma gama maior de diferentes genótipos microbianos e, conseqüentemente uma maior variedade funcional, seja no âmbito do meio ambiente, seja nos efeitos na planta. A coleta realizada em duas regiões com características edafoclimáticas diferentes provavelmente contribuiu para essa maior diversidade de rizobactérias encontradas, do que teria ocorrido se a coleta fosse feita em uma região somente. Nota-se que, apesar de um razoável espalhamento dos isolados nos quatro quadrantes do *biplo*t, que revelou uma grande divergência fenotípica entre os isolados, as características morfológicas mais predominantes encontradas em Livramento de Nossa Senhora foram diferentes das características encontradas na comunidade da rizosfera de Canavieiras. Diferenças locais específicas na composição de plantas, tipo e fertilidade do solo, etc tendem a gerar essas diferenças de composição entre os locais de coleta.

Numa visão alternativa, de acordo com o entendimento da teoria hologenômica da evolução (ZILBER-ROSENBERG & ROSENBERG, 2009) a diversidade de bactérias na região rizosfera poderia referir-se a diversidade genética da porção microbiana do hologenoma com expressão específica na raiz. Ou seja, a rizosfera pode representar uma região de expansão do hologenoma do maracujazeiro, onde

microrganismos também endofíticos atuam. Portanto, a porção da diversidade microbiana da região da rizosfera que é também endofítica, ou associada ao rizoplano, tenderá a ter uma associação mais íntima e interativa com a planta, de modo que sua função na rizosfera pode representar interação do holobionte com ambiente solo. Espera-se encontrar efeitos benéficos na planta para microrganismos componentes dessa fração da diversidade microbiana coletada.

Bactérias do gênero *Pseudomonas* são consideradas entre as principais PGPRs isoladas da rizosfera que tem se mostrado como indutores do desenvolvimento vegetal (MARSCHNER et al., 2004; MARIANO et al., 2004). Estas bactérias são fluorescentes e Gram-negativas. Desse modo, considerou-se importante buscar especificamente estas características nos isolados estudados, visto que apresentar características morfológicas de Gram- negativo e fluorescência podem indicar capacidade de exercer efeitos benéficos para desenvolvimento vegetal. Pela análise de Venn (Figura 2) as rizobactérias LNS-A -17, -32, -35, -37; CAN-A -61, -74, que apresentaram ambas características, podem indicar que as mesmas seriam do gênero *Pseudomonas* e, ou poderiam ter efeitos de promoção do crescimento em maracujazeiro. Porém, como veremos adiante, nem todos estes efeitos redundaram em efeitos de promoção de crescimento, mas alguns demonstraram ação em outras características funcionais de interesse.

## 5.2. CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL

Uma das aplicações imediatas de um estudo de coleta de isolados e análise de diversidade microbiana é a bioprospecção por funções úteis ao homem, em diversos aspectos das atividades humanas- agricultura, indústria, saúde etc. No caso específico deste estudo, efeitos benéficos do crescimento e desenvolvimento vegetativo de mudas de maracujazeiro amarelo foram os objetivos que nortearam o trabalho. A seguir, discute-se quatro aspectos fenotípicos estudados que indicaram funções potencialmente úteis à produção de mudas de *P. edulis*. Alguns dos isolados demonstraram interessantes possibilidades de aplicação biotecnológicas nesse sentido.



### 5.2.1. Teste de solubilização de fosfato

Considerando que a absorção de fosfato acontece no solo, quando se busca uma função vinculada à solubilização de fosfato, o ambiente mais provável de se encontrar bactérias que exerçam essa função é na rizosfera. Bactérias solubilizadoras de fosfato possuem papel importante no ciclo natural do fósforo, sendo responsáveis pela hidrólise desse composto para a forma inorgânica e pela mineralização de fosfato orgânico, geralmente absorvido pelas plantas (ROMEIRO, 2007). Encontrar bactérias que realizam a função de solubilização de fosfato é importante, pois o fósforo é um macronutriente indispensável para o desenvolvimento vegetal, de modo que disponibilizá-lo para absorção pelas raízes traria vantagens fisiológicas para a planta. A partir disso, sugere-se que as 10 rizobactérias que solubilizaram fosfato no meio NBRIP podem ser isolados com potencial de disponibilizar esse nutriente para o maracujazeiro amarelo, deixando mais disponível para absorção das raízes e, conseqüentemente, com potencial de promoverem o melhor desenvolvimento da mesma.

Cabe lembrar que o ensaio de solubilização *in vitro* foi realizado em condições controladas sem nenhuma interferência ambiental, ou seja, as rizobactérias não ficaram sob ação dos diversos fatores existentes no solo, ou competindo com outros organismos. Apesar disso, os isolados LNS A-16 e CAN B-97 podem ser consideradas PGPRs, já que não somente solubilizaram fosfato *in vitro*, mas também promoveram *in vivo* o desenvolvimento da planta. Estes resultados sugerem que um dos mecanismos que estes isolados podem ter utilizado para o efeito da promoção de crescimento seria a solubilização de fosfato. Contudo, obviamente, outros estudos são necessários para verificar se é somente este, ou se outros mecanismos podem estar atuando na promoção de crescimento. Os resultados indicaram que estes isolados podem ser usados para posteriores estudos, visando aplicação para inoculantes comerciais para melhor desenvolvimento de mudas de maracujazeiro amarelo. Já para os isolados LNS A -32, -37, -44; LNS B -113, -122; CAN A -76; CAN B -84 e -100, apesar da solubilização *in vitro*, não se verificou nenhum efeito de desenvolvimento do vegetal *in vivo*. Uma possibilidade, talvez, é de que essa capacidade de solubilização de fósforo e promoção de crescimento vegetal seja afetado por fatores nutricionais e interação com outros microrganismos

do ambiente (VESSEY, 2003), de modo que somente a identificação desta característica *in vitro* não é suficiente como indicadores de promoção de crescimento.

Dos 10 isolados que solubilizaram fóstato *in vitro*, apenas o seqüenciamento do CAN-B-100 foi obtido até o momento. O sequenciamento do gene 16s rRNA deste isolado identificou como pertecente ao gênero *Acinetobacter*. Peix e colaboradores (2009) comprovaram a alta capacidade de duas bactérias isoladas da rizosfera de gramíneas pertencente ao gênero *Acinetobacter*, em solubilizar fóstato inorgânico *in vitro*, e promover crescimento em plantas de grão de bico e cevada. No nosso caso, isolado CAN-B-100 (*Acinetobacter* spp.), obtido da rizosfera de maracujazeiro amarelo não apresentou esse mesmo resultado *in vivo*. Não se testou o efeito desses isolados em outras espécies.

Polesi (2010) isolou bactérias do gênero *Acinetobacter* em microplantas de abacaxi consideradas axênicas, comprovando que existe uma comunidade endofítica intimamente associada à planta. Diante disso, pode-se deduzir que essa bactéria transita pelo vegetal, podendo ser endofítica e, ou rizosférica. Nestas circunstâncias, duas concepções podem ser trazidas à tona. Na visão clássica que considera a planta como ambiente do microrganismo, esse trânsito entre rizosfera e corpo da planta pode ser determinado pela disponibilidade de nutrientes, ou outras condições favoráveis à proliferação da bactéria, isto é, o microrganismo estaria mais presente nos locais (planta ou solo) em que as condições do entorno fossem mais vantajosas a ele.

Sob a luz da teoria hologenômica, por outro lado, podemos sugerir que bactérias que possuem a função de solubilização de fóstato podem pertencer à porção microbiana do hologenoma, atuando nos tecidos ou regiões da planta em que seriam necessárias. O fósforo é um dos componentes mais importantes para os seres vivos, porque faz parte das biomoléculas essenciais (nucleotídeos que compõe o DNA/RNA), são fontes de energia para célula, são usados na regulação da expressão de diversas enzimas. Assim bactérias que decompõem matéria orgânica (ácidos nucléicos, fosfolipídeos, fosfoproteínas etc.) liberando o radical fóstato, proporcionariam ao seu holobionte este nutriente fundamental. Visto dessa forma, esclarece-se a presença desse microrganismo como endofítico e rizosférico,

visto que em ambos contextos há fosfatos a serem liberados para utilização pela planta.

### **5.2.2. Teste de antagonismo *in vitro* contra *Fusarium solani***

O método de verificação de possível antagonismo bactéria-fungo *in vitro* buscou estudar a possibilidade de se encontrar isolados rizobacterianos com produção de compostos antibióticos, ou outro tipo de interação direta com o fungo causador da ‘podridão-do-pé’ em maracujazeiro amarelo. Esta caracterização preliminar teve o objetivo de verificar possíveis fenótipos que pudessem sugerir testes posteriores *in vivo* desses isolados como potenciais agentes de controle biológico. É reconhecido na literatura, porém, que muitas vezes o efeito antagônico *in vitro* não se reproduz *in vivo*, visto que no primeiro estão ausentes vários processos biológicos e metabólicos que ocorrem no solo e na planta, e que certamente interferem na ação final dessas rizobactérias (ROMEIRO, 2007). Apesar dos sete isolados identificados terem sugerido uma capacidade de controlar o desenvolvimento do *Fusarium solani*, deve-se considerar que certamente as condições em campo tenderão a expressar variações e mesmo resultados diferentes dos encontrados *in vitro*. O uso da metodologia de escrutínio preliminar *in vitro* por potenciais agentes de biocontrole é controverso. Alguns autores defendem este teste clássico de cultura-dupla *in vitro*, pois acreditam que detectar isolados com características de antagonismo nessas condições totalmente controladas facilitaria uma primeira seleção, já que geralmente se trabalha com grande número de isolados coletados da rizosfera (LUCON & MELO, 1999). Porém, diversos trabalhos têm mostrado não somente que isolados pré-selecionados *in vitro* não mantêm o efeito *in vivo*, mas também que outros que não apresentaram ação *in vitro*, conseguem efeitos de biocontrole *in vivo* (TROCOLI, 2010).

Dentre os isolados que apresentaram redução significativa no crescimento (diâmetro) da colônia do fungo, os resultados obtidos para todos (Figura 4) sugeriram que um eventual efeito de controle do *F. solani* deveria ocorrer por competição por espaço físico e, ou nutrientes. Entendeu-se dessa forma a partir da constatação de que ocorreu contato direto entre as colônias rizobacterianas e a

borda da colônia fúngica, sem aparecimento de nenhuma região (halo) de inibição de crescimento à distância. Considerando a descrição na literatura de que agentes de biocontrole bacterianos podem ser encontrados dentre aquelas bactérias Gram negativas e fluorescentes (VANCURA, 1980; FREITAS, 1994; ZAGO, 2000), cabe destacar o fenótipo duplo do isolado LNS-A-17, pois além de possível antagonista ao *Fusarium solani* (Tabela 2), apresentou-se como Gram negativo e fluorescente (Figura 2). Pesquisas envolvendo isolados fluorescentes de *Pseudomonas* apresentaram antagonismo *in vitro* contra *Phytophthora nicotianae*, *Fusarium oxysporum* e *Pythium aphanidermatum* (FREITAS & PIZZINATTO, 1991; BERNADES et al., 2010). O efeito encontrado nos isolados que inibiram *in vitro* o crescimento de *Fusarium solani* indicou uma possível competição por espaço. Este mesmo efeito foi visto no ensaio com rizobactérias do gênero *Pseudomonas* que impediram o crescimento do fungo *Fusarium* sp. criando uma barreira física, sugerindo assim, uma possível competição por nutrientes e, ou espaço (SOTTERO et al., 2006). No antagonismo por competição, há uma disputa por um ou mais fatores limitantes ao crescimento do patógeno (nutrientes, fatores de crescimento, O<sub>2</sub>, água, espaço etc.). Bactérias com respostas fenotípicas tais como crescimento rápido e secreção de enzimas extracelulares tendem a ser competidores eficientes (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Os resultados deste trabalho sugerem ser este o principal mecanismo de uma eventual ação antagonica contra *F. solani*, a ser confirmada nos experimentos de biocontrole *in vivo*.

Uma das bactérias identificadas como potencial antagonista ao *F. solani*, o isolado LNS-A-1, foi seqüenciado e identificado como *Bacillus methylotrophicus*. Madhaiyan (2010) isolou duas bactérias dessa mesma espécie da rizosfera de cultivo de arroz, as quais foram consideradas como uma nova espécie do gênero *Bacillus* que utiliza o metanol para promover o crescimento de plantas. Apesar do LNS-A-1 ter tido um efeito positivo no antagonismo *in vitro*, os resultados para este isolado em nossas condições mostraram um efeito prejudicial para o desenvolvimento da planta (Tabela 3). Seria interessante verificar se além do metanol, outros compostos orgânicos importantes para planta estariam sendo consumidos por este microrganismo, o que poderia sugerir uma direção para o entendimento desse efeito deletério.

Numa abordagem com base na teoria hologenômica, bactérias que apresentem efeitos de antagonismo contra patógenos de plantas podem corresponder àquelas da porção microbiana do hologenoma cujos genes têm a função de proteção ou de reação (controle) ao patógeno. A idéia aqui é a de que assim como existem genes de resistência a doenças que estão nas células (genes nucleares) das plantas, para os quais há um reconhecido histórico de melhoramento genético buscando resistência, também existiriam genes associados à microbiota endofítica e, ou exofítica (incluindo rizoplano) e, ou rizosférica que teriam também coevoluído para ajudar na proteção dessa planta. De acordo com essa teoria, bactérias da porção microbiana do hologenoma expressam genes que exercem efeito benéfico ao holobionte, sendo o controle da população de patógenos um desses efeitos. Evidências nesse sentido foram discutidas pelos autores dessa teoria (ZILBER-ROSENBERG; ROSENBERG, 2008).

### **5.2.3. Promoção de crescimento de mudas de *P. edulis* inoculadas com rizobactérias**

Considerando um dos objetivos deste trabalho – o escrutínio por isolados que pudessem apresentar algum efeito benéfico explorável para a produção de mudas de maracujazeiro –, entendeu-se como viável a utilização de solo autoclavado para os experimentos de cultivo dessas mudas. O pressuposto foi de que, apesar de não ser possível todo o cultivo em condições estéreis na casa de vegetação, a esterilização inicial do solo permitiria nula ou mínima competição com o isolado inoculado na semente por submersão. Nesta análise dos efeitos individualizados dos isolados a partir de solo autoclavado, obteve-se efeito funcional de algumas bactérias sobre as plântulas de maracujazeiro, em termos de favorecer o maior crescimento vegetativo da muda. Apesar de que efeitos significativos em relação às médias do controle foram identificados somente em dois dos cinco parâmetros de promoção de crescimento estudados (comprimento e peso seco da parte aérea), tais parâmetros foram considerados como suficientes para aceitar o efeito como positivo no crescimento (BETTIOL & CORRÊA, 2009). Portanto, dentro da proposta de identificar isolados individuais com efeitos detectáveis, considera-se que foi possível

identificar esses isolados no contexto das 86 rizobactérias sob estudo (Tabela 3); também, considerou-se que aqueles com efeito mais intenso foram os que apresentaram significância estatística para ambos CA e PSA simultaneamente.

Os resultados obtidos para um segundo grupo de isolados que apresentaram médias não significativamente diferentes em relação ao controle, principalmente em relação aos dois parâmetros acima discutidos (CA e PSA), sugeriram a ausência de efeito individual detectável para eles. É possível que estes isolados não tenham conseguido colonizar o sistema radicular adequadamente ou, mesmo que tenham conseguido, suas ações não estariam diretamente relacionadas ao crescimento, de modo a permitir aumento de tamanho ou biomassa. Além disso, é possível também que a microbiota endofítica carregada pelas sementes (ABREU-TARAZI et al, 2010) possa competir pelo espaço e não permitir adequada colonização da muda e, ou do rizoplane/rizosfera por muitos dos isolados inoculados individualmente; mesmo com solo autoclavado, com o tempo de cultivo, as bactérias endofíticas oriundas das sementes podem repovoar a rizosfera e, assim, por competição com os isolados inoculados, impedir a visualização de seus possíveis efeitos, ao menos no nível dos parâmetros estudados. O estabelecimento da bactéria na rizosfera é uma condição importante para que esse microrganismo possa interagir com a planta. Para isso é necessário que a bactéria se estabeleça na região das raízes, desenvolvendo-se e competindo em relação à comunidade nativa (WELLER, 1988; ROMEIRO, 2007). É importante, também, considerar que a reinoculação dos isolados de rizobactérias no solo autoclavado, buscando favorecer apenas um único microrganismo, praticamente elimina as condições naturais de interações entre a comunidade microbiana natural do solo e da rizosfera, que podem ser essenciais para a manifestação de efeitos benéficos à planta (CALLES et al, 2008). Esta ausência de interações, talvez, seja uma condição inapropriada para determinadas espécies de rizobactérias. Assim, nestes casos, os isolados inoculados apresentariam um comportamento 'nulo', não trazendo benefícios detectáveis para planta. São necessários outros ensaios específicos, com outras formas de avaliação do estabelecimento e colonização das mudas (rizoplane e tecidos internos) pelas rizobactérias, para se responder efetivamente a estes questionamentos.

Para aqueles tratamentos de inoculação com as rizobactérias que apresentaram médias inferiores às do controle, sugere-se que, de alguma forma, a

população do isolado pode ter influenciado negativamente a planta, por exemplo, prejudicando a rizogênese, a morfologia ou estrutura das raízes, interferindo na permeabilidade das células e no metabolismo radicular, inibindo a produção de determinados exsudatos, modificando a disponibilidade de nutrientes à planta (SILVEIRA & FREITAS, 2007), entre vários outros. Experimentos posteriores que trabalhem com inoculações combinadas de isolados, seguindo a perspectiva de que seria dinâmica microbiana no ambiente a causa de efeitos benéficos às plantas (CALLES et al, 2008), podem indicar que a presença destes isolados em combinações com outros seja relevante para detecção de efeitos benéficos.

Os isolados LNS-A-16 e CAN-B-97 apresentaram a capacidade de solubilização de fosfato *in vitro* e promoveram o crescimento vegetativo na parte aérea, apesar de que apenas em um dos dois parâmetros de parte aérea – CA ou PSA, respectivamente (Tabela 3). Isto sugere que a disponibilização de fosfato pode ser um dos mecanismos que essas bactérias utilizam para auxiliar o desenvolvimento da planta. Obviamente que os demais isolados que promoveram crescimento, inclusive de forma mais intensa que esses dois, e não demonstraram solubilizar fosfato *in vitro*, devem ter utilizado outros mecanismos não avaliados neste estudo. De modo semelhante, é importante salientar que a observação de isolados que solubilizaram fosfato *in vitro* e não promoveram crescimento detectável pelos parâmetros analisados, reforça que não há uma relação necessariamente direta entre esses dois parâmetros, no sentido de que um dos testes (solubilização de fosfato *in vitro*) permitiria pré-selecionar isolados para posterior avaliação de promoção de crescimento. Outros fatores como componentes nutricionais, umidade, pH e temperatura do solo também influenciam no desempenho dos microrganismos e da planta, certamente afetando a interação entre ambos e os resultados desta interação.

Com os resultados obtidos em relação ao ganho significativo de biomassa na parte aérea conferido por alguns dos 86 isolados rizobacterianos, experimentos posteriores de avaliação desses efeitos são necessários em condições de solo mais próximas daquelas encontradas nos sistemas de produção de mudas de maracujazeiro. A manutenção ou aumento desse efeito nessas condições indicará fortemente a real possibilidade de desenvolvimento biotecnológico em direção à produção de inoculantes de sementes de *P. edulis*, à base de rizobactérias do

próprio maracujazeiro, para tornar a produção de mudas para plantio comercial mais eficiente.

#### **5.2.4. Tolerância à seca**

O sistema de produção de mudas de diversas espécies arbóreas depende de uma manutenção eficiente da disponibilidade hídrica, o que nem sempre é possível, dependendo do ambiente e das características dos viveiros ou telados em que ocorre o desenvolvimento das mudas. Como aumento da tolerância a estresses bióticos e, ou abióticos é um dos diversos efeitos benéficos possíveis de se obter em plantas com inoculação de microrganismos, testou-se a possibilidade de se encontrar este efeito em entre os 86 isolados sob estudo. Utilizou-se o sistema de avaliação visual (notas arbitradas) do vigor apresentado pelas mudas, submetidas à ausência de irrigação, para se reconhecer os efeitos fenotípicos de maior tolerância como resultado da inoculação prévia de rizobactérias. A separação do efeito em dois momentos de avaliação (tolerância à 'seca branda' e à 'seca extrema') buscou verificar não somente se o tratamento com algum dos isolados apresentaria algum efeito de melhor performance da planta sob estresse hídrico, mas também a possibilidade de que um dos mecanismos para este efeito pudesse ser a 'tolerância sistêmica induzida', proposto por Yang et al (2008). Os resultados sugeriram que alguns tratamentos com rizobactérias de fato possibilitaram às mudas manter, relativamente ao controle, níveis semelhantes de vigor por mais tempo, tanto aos sete dias (Tabela 4) quanto até os 15 dias (Tabela 5) após supressão da irrigação. Yang e colaboradores (2008) indicam que as PGPRs induzem mudanças físicas e químicas em plantas, as quais resultam em um fenótipo de tolerância mais aprimorada para o estresse abiótico. Por exemplo, estudos com inoculação das PGPRs *Paenibacillus polymyxa* e *Achromobacter piechaudii* indicaram melhora na tolerância à seca em *Arabidopsis* e pimenta, respectivamente, sugerindo que o hormônio vegetal etileno, produzido endogenamente por estas bactérias (ou com sua síntese induzida por elas), pode estar regulando a homeostase da planta e, portanto, permitindo sua resposta de maior tolerância ao estresse hídrico (MAYAK et al., 2003). Existem outros mecanismos que podem ajudar a planta no período de



ausência hídrica, tais como o fechamento dos estômatos em períodos quentes do dia, ou movimentação das folhas para reduzir a ação do sol (TAIZ; ZEIGER, 2009). Também, aumento da capacidade de absorção de água por aprofundamento do sistema radicular permite à planta sobreviver a grandes períodos de ausência hídrica, mantendo sua turgescência por regulação osmótica (TURNER, 1979). Neste cenário, é possível que algumas das rizobactérias testadas possam ter induzido esses mecanismos de defesa da planta como resposta ao estresse hídrico imposto pela ausência de rega.

No segundo período de estresse hídrico mais prolongado (18 dias de ausência de irrigação, logo após 5 dias de recuperação dos níveis de umidade do solo após o primeiro período de sete dias de corte na água), o experimento foi conduzido até a morte das mudas. Este procedimento buscou avaliar, em escala temporal, as mudanças de vigor e coloração geral das mudas, além de verificar como ocorria a transição de efeitos entre os tratamentos, do primeiro para o segundo período de seca. De modo interessante, observou-se que, para o segundo período de seca, os isolados do grupo B' que se formou (Tabela 5) apresentaram mudas com vigor normal ao 6º dia de ausência de irrigação, enquanto que, na primeira etapa (tolerância à seca branda), apresentaram-se nitidamente murchos ao 7º dia (grupos A e D – Tabela 4), ou seja, comportamentos bem distintos em períodos quase iguais de estresse. Esses resultados sugerem que essas bactérias, apesar não terem surtido efeito na primeira etapa de supressão da rega, podem ter induzido a planta a uma tolerância sistêmica induzida neste primeiro período de seca, cujos efeitos só foram sentidos no segundo período de seca. Este efeito diferiu do de outros isolados, sugerindo mecanismos específicos de ação, pois alguns destes outros isolados na verdade apressaram a morte das mudas em relação ao controle, enquanto outros ainda, praticamente, não causaram nenhum efeito.

Algumas plantas desenvolveram mecanismos de resposta à seca, através da regulação da expressão de diversos genes, o que possibilita ao vegetal adaptar-se as diferentes condições ambientais (CRUZ, 2010). Mas muitas culturas vegetais parecem não possuir, em sua variabilidade genotípica natural (nuclear), genes cuja expressão e, ou regulação possam conferir suficiente tolerância à seca, em sendo esta além dos limites evolutivos de adaptação da espécie, variedade ou cultivar. Por isso vários estudos e programas de melhoramento genético de plantas vêm sendo

desenvolvidos nas últimas 5 – 6 décadas, procurando genes/genótipos que possam ter a característica de tolerância à seca nas diferentes culturas, em condições mais extremas. Desta forma, bactérias podem contribuir de forma significativa neste processo, através de seus genes e interações metabólicas e fisiológicas com a planta que tenham uma maior interferência nos fenótipos de resistência ao estresse hídrico. Apesar dos estudos com endofíticos terem ocorrido em tempo semelhante aos de melhoramento genético clássico (STONE, 2004), somente recentemente, e principalmente à luz da teoria hologenômica, é que esse aspecto da co-evolução da microbiota interna e externa das plantas, com interação mais íntima que se supunha (ZILBER-ROSENBERG; ROSENBERG, 2008), tem tomado corpo e estimulado a pesquisa por microrganismos com efeitos significativos no fenótipo final desejado para as culturas de interesse. Nesta ótica, a porção microbiana do hologenoma deve contribuir com genes e funções que auxiliam o holobionte (planta) a adaptar-se a condições extremas; esta ação ocorreria de forma estruturalmente ‘livre’ das células somáticas da planta, dependendo essencialmente da variação na composição e distribuição de células microbianas (via amplificação-redução de sua população, provavelmente após sinalização específica disparada pelos agentes de estresse). É sugerido que este seria um mecanismo de resposta adaptativa mais rápida do holobionte a situações extremas, porém não duradouras a ponto de gerar pressões evolutivas cuja resposta dependeria da variabilidade genética nuclear das gerações seguintes (ROSENBERG et al, 2008).

Conforme discutido anteriormente, quando se faz isolamento e reinoculação individualizada dos isolados, está-se buscando fazer uma análise a respeito da contribuição individual para uma dada função de interesse. Nesse sentido, do ponto de vista genético e biotecnológico, o objetivo é encontrar gene(s) microbiano(s) específico(s) que tenham maior percentual de interferência no fenótipo de interesse, no caso, resistência ao estresse hídrico. Apesar de lógica, esta abordagem, porém, apresenta limitações importantes a serem consideradas. Uma delas refere-se à perda de função ou efeito quando se suprime as interações naturais com outros microrganismos e o ambiente (CALLES et al, 2008). Essa perda causa a impossibilidade de se detectar a importância deste ou daquele isolado, cujo efeito só apareceria de forma integrada com seu entorno. Portanto, quando se encontra efeito de um isolado individualmente, sugere-se que a contribuição genética específica

desse isolado para o fenótipo deve ser de maior magnitude, pois mesmo fora de seu contexto, ainda assim o efeito é verificado. Alternativamente, a interação deste isolado com as células da planta e, ou com endofíticos trazidos com a semente (ver a seguir) pode ser de natureza favorável que permita visualizar o efeito. Outra limitação refere-se ao eventual repovoamento da região da rizosfera por endofíticos trazidos pelas sementes. Nestas circunstâncias, quando um microrganismo isolado é inoculado individualmente, e o solo/substrato é previamente esterilizado para eliminar a competição dos microrganismos e favorecer o estabelecimento do inoculado, pode ocorrer que o tempo de cultivo e de colonização do isolado permita que os eventuais endofíticos que vieram dentro da semente/plântula exerçam efeito de competição com o isolado na região da rizosfera; obviamente que isto terá um efeito de interferência na ação do isolado. Contudo, é importante considerar que para qualquer processo de aplicação de produtos comerciais à base de microrganismos, ou de seus produtos, é necessário o cultivo microbiano em larga escala (fermentações) e o desenvolvimento de formulações adequadas para assegurar viabilidade, estabilidade e tempo de prateleira para os isolados utilizados (LOPES, 2009). Por isso, a relevância dessa busca por efeitos individuais de isolados microbianos, visto que todo este processo de desenvolvimento biotecnológico tende a ser isolado-específico.

#### **5.2.5. Diversidade funcional**

As funções encontradas na coleção de 86 isolados de bactérias de rizosfera/rizoplano de maracujazeiro amarelo através dos quatro ensaios de caracterização funcional deste estudo – solubilização de fosfato, antagonismo *in vitro*, promoção de crescimento e tolerância à seca – proporcionaram uma abordagem de diferentes e prováveis benefícios que rizobactérias podem proporcionar no contexto agrônômico de produção de mudas de maracujá. A diversidade funcional encontrada baseou-se em análises essencialmente fenotípicas – fenótipos de bactérias nos ensaios *in vitro* e das plântulas nos ensaios *in vivo*. Considerando a possibilidade e vantagem prática que se teria em se encontrar isolados individuais que acumulassem mais de uma função útil, buscou-se analisar

os resultados de forma integrada. No diagrama de Venn da Figura 6 foi possível encontrar bactérias da rizosfera de maracujazeiro que exercem alguma multifuncionalidade em relação à planta, com até duas funções úteis identificadas. Com estes resultados, sugere-se a realização de estudos posteriores com essa coleção de isolados no sentido de se verificar a possibilidade de haver outras funções de interesse não estudadas (biocontrole *in vivo* a este e outros patógenos relevantes, fixação de N, absorção/quelação de metais, biodegradação de compostos tóxicos, etc.), tanto para aquelas rizobactérias que não apresentaram nenhuma ou somente uma função, quanto para os bifuncionais identificados no diagrama de Venn (Figura 6). Considerando o estudo em andamento de identificação taxonômica dos isolados por sequenciamento, uma vez que se obtenha indicações mais precisas sobre quais isolados pertencem a quais espécies, espera-se uma maior facilidade de se encontrar informações na literatura especializada a respeito de possíveis outras funções, bem como de possíveis mecanismos de ação para elas.

Assumindo que as bactérias deste estudo possuem, de fato, uma interação mais continuada com plantas de *P. Edulis* no ambiente rizosférico de onde foram coletados, a bifuncionalidade detectada para esses isolados, sob a ótica holobiôntica, pode ser entendida como efeitos pleiotrópicos de genes com funções específicas da porção microbiana do hologenoma; nesse caso, um único “gene” (micróbio) pode influenciar mais de uma característica do fenótipo. Com os resultados deste trabalho, infere-se que abordagens de pesquisa mais integradoras, envolvendo (i) experimentos em condições mais naturais de ambiente e de cultivo de mudas, (ii) efeitos conjuntos de inoculações combinadas de mais de um isolado em relação aos fenótipos de interesse para as plantas, (iii) estudos comparativos de diferentes combinações de isolados e de complexidade crescente dessas combinações, (iv) novos isolamentos e análise de diversidade comparativa entre ambientes de cultivo e, ou genótipos contrastantes em relação a características de interesse, (iv) isolamento e estudos funcionais de genes bacterianos, cujas funções biológicas e, ou produtos possam ser explorados agronomicamente, entre outros, tenderão a render novos e relevantes conhecimentos para o sistema de produção de mudas de maracujazeiro amarelo.

## 6. CONCLUSÕES

- Pelo método de isolamento empregado, foi possível isolar diversidade fenotípica (estrutural e funcional) de bactérias da rizosfera de maracujazeiro amarelo nas duas regiões estudadas de produção comercial de maracujá.
- Em condições de casa de vegetação, houve rizobactérias que promoveram o desenvolvimento inicial da parte aérea de mudas de maracujazeiro amarelo.
- Também em condições de casa de vegetação, houve bactérias com potencial de induzir maior resistência hídrica de plantas de maracujazeiro amarelo, em relação a outros isolados rizobacterianos, quando submetidas à ausência de irrigação por um período de 18 dias.
- Houve bactérias que apresentaram barreira física ao desenvolvimento *in vitro* do fungo patogênico *Fusarium solani*.
- A análise das seqüências do fragmento 16s rDNA, amplificados para dois dos isolados rizobacterianos estudados, permitiu identificá-los e diferenciá-los em nível taxonômico de espécie.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU-TARAZZI, M.F.; NAVARRETE, A.A.; ANDREOTE, F.D.; ALMEIRA, C.V.; TSAI, S.M.; ALMEIDA, M. Endophytic bacteria in long-term in vitro cultivated “axenic” pineapple microplants revealed by PCR–DGGE. *World J Microbiol Biotechnol.* DOI 10.1007/s11274-009-0191-3. 2010.

ANDERBRHAN, T. Studies on the epidemiology and control of witches' broom disease of cocoa in the Brazilian Amazon. In: 9th International Cocoa Research Conference. Lome, Togo, 12-18 February, pp 395-402, 1984.

AGRA, G.S.M. Use of rhizobacterias and mycorrhizal in the production of passion fruit seedlings. (Dissertação), p. 62. 2007.

AGRIANUAL 2009: Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira. São Paulo, 497p. 2009.

AKAMINE E.K.; GIROLAMI, G. Pollination and fruit set in the yellow passion fruit. Hawaii, Agricultural Experimental Station, (Tec. Bull, 39). 44p. 1959.

ALEXANDRE R.S.; BRUCKNER C.H.; LOPES J.C. Propagação do maracujazeiro: Aspectos morfológicos, fisiológicos e genéticos. Alegre: EDUFES. 208p. 2009.

ALMEIDA, L.C.C. Caracterização e Identificação específica de colletotrichum, Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Recife. 79 p. 2005.

AUNTOUN, H., BEAUCHAMP, C.J.; GOUSSARD, N.; CHABOT, R.; LALANDE, R. Potencial of *rhizobium* and *bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.) *Plant and Soil*, v. 204, p. 57-67, 1998.

AYRES, M.; AYRES JR., M.; AYRES, D.L.; DOS SANTOS, A.A.S. *BioEstat – Aplicações estatísticas nas áreas de ciências biomédicas*. Belém, Pará, Brazil: Fundação Mamirauá (<http://www.mamiraua.org.br>). 2007

BARBOSA, C.J.; BRAGANÇA, C.A.D. Endurecimento dos frutos do Maracujazeiro. Embrapa. 2008.

BARBOSA, P.R. Estudo da ação psicofarmacológica de extratos de *Passiflora alata* Dryander e *Passiflora edulis* Sims. (Dissertação). Criciúma. Santa Catarina. p. 38. 2006.

BARKA, E.A.; BELARBI, A.; HACHET, C.; NOWAK, J.; AUDRAN, J. C. Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera*

cocultures with plant growth-promoting rhizobacteria. FEMS Microbiology Letters, v. 186, p. 91-95, 2000.

BENITEZ, T.; RINCÓN, A.M.; LIMÓN, M.C.; CODÓN, A.C. Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains. Int Microbiol, v. 7, p. 249-60, 2004.

BETTIOL, W.; CORRÊA, E.B. Controle da podridão de raiz e promoção de crescimento em hidroponia com bactérias. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M.A.B. Biocontrole de Doenças de Plantas – uso e perspectivas. p.226-237. Embrapa. 2009.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle Biológico. In: Manual de Fitopatologia, Princípios e conceitos (BERGAMIN FILHO, A; KIMATI, H; AMORIM, L., eds). 3ª ed. São Paulo, Agronômica Ceres, v. 1, p. 717-27, 1995.

BENIZRI, E.; BAUDOIN, E.; GUCKERT, A. Root colonization by inoculated plant growth promoting rhizobacteria. Biocontrol Science and Technology, v.11, p.557-574, 2001.

BRUCKNER, C.H.; SILVA, M.M. Florescimento e Frutificação. In: BRUCKNER, C.H. e PIKANÇO, M.C. (eds.). Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado. Porto Alegre, p. 51-68. 2001.

BRUCKNER, C.H.; SILVA, M.M.; FALLEIRO, T.M.; ANDRADE, B.B; MOREIRA, A.E. Viabilidade do pólen de maracujazeiro sob diferentes condições de armazenamento. Revista Ceres, Viçosa, v. 47, n. 273, p.1-9, 2000.

BRUNETTA, J.M.S.C. Isolamento e seleção de rizobactérias para produção de mudas de *Pinus* spp. Tese de doutorado. Universidade Federal de Viçosa - Viçosa- MG. 57p. 2006.

CARVALHO, A.J.C., MARTINS, D.P., MONNERAT, P.H.; BERNARDO, S. Adubação nitrogenada e irrigação no maracujazeiro-amarelo. I. Produtividade e qualidade dos frutos. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 35, n. 6, p. 1101-1108, 2000.

CARVALHO-OKANO, R.M; VIEIRA, M.F. Morfologia externa e taxonomia. In: BRUCKNER, C.H & PIKANÇO, M.C. Maracujá: Tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado. Porto Alegre. 472p. 2001

CAVALCANTE, U.M.T., MAIA, L.C., NOGUEIRA, R.J.M.C.; SANTOS, V.F. Respostas fisiológicas em mudas de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.) inoculadas com fungos micorrízicos arbusculares e submetidas a estresse hídrico. Acta Botanica Brasilica 15(3): 379–390, 2001.

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

CENCI, S.A. Boas Práticas de Pós-colheita de Frutas e Hortaliças na Agricultura Familiar. In: Fenelon do Nascimento Neto. (Org.). Recomendações Básicas para a Aplicação das Boas Práticas Agropecuárias e de Fabricação na Agricultura Familiar. 1ª ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 67-80. 2006.

COSTA JCB, BEZERRA JL, VELOSO JLM, NIELLA GR, BASTOS CN. Controle Biológico da vassoura-de-bruxa do cacauzeiro. In: Venzon M., Paula Júnior T.J., Pallini A. (eds). Tecnologias alternativas para o controle de pragas e doenças. Viçosa-MG, Brazil: EPAMIG, p. 25-47, 2006.

- COSTA, A.F.S. COSTA, A.N.; VENTURA, J.A.; FANTON, C.J.; LIMA, I.M.; CAETANO, L.C.S.; SANTANA, E.N. Recomendações técnicas para o cultivo de maracujazeiro. Vitória, ES: INCAPER, 2008. 8p.
- CUNHA, M.A.P.; BARBOSA, L.; FARIA, G.A. Botânica. In: LIMA, A.; CUNHA, M.A.P. Maracujá: Produção e qualidade na passicultura. Cruz das Almas. Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 396p.
- DHAWAN, K.; DHAWAN, S. & SHARMA, A. Passiflora: a review update. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 94, p. 1–23. 2004.
- ELVIRA-RECUENCO, M.; van VUURDE, J.W.L. Natural incidence of endophytic bacteria in pea cultivars under field conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, v.46, p.1036-1041, 2000.
- FALEIRO, F.G.; JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 670p. 2005.
- FARINAZZO, N.M.; SALIMENA, F.R.G. Passifloraceae na Reserva Biológica da Represa do Grama, Descoberto, Minas Gerais, Brasil. *Rodriguésia*, v. 58, n. 4, p. 823- 833, 2007.
- FERREIRA, F.R. Recursos Genéticos de Passiflora. In: FALEIRO, F.G., JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA, M.F. (Ed.). Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados, cap. 2, p. 41- 51, 2005.
- FISCHER, I.H.; LOURENÇO, S.A.; MARTINS, M.C.; KIMATI, H.; AMORIM, L. Seleção de plantas resistentes e de fungicidas para o controle da podridão do colo do maracujazeiro causada por *Nectria hematococca*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 30, n. 3, p. 250-258, 2005.
- FONSECA, K.G. Retrocruzamento visando à obtenção de resistência do maracujazeiro-azedo à virose do endurecimento dos frutos, auxiliados por marcadores moleculares. Dissertação de Mestrado em Ciências Agrárias. Universidade de Brasília. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. 2008.
- FREITAS, S.S. Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs). In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. (Eds.). Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Brasília: EMBRAPA. p. 369-374. 1994.
- GARG, S.K.; BHATNAGAR, A.; KALLA, A.; NARULA, N. *In vitro* fixation, phosphate solubilization, survival and nutrient release by *Azotobacter* strains in aquatic system. *Bioresource Technology*, v.80, p.101-109, 2001.
- GONÇALVES, J.S; SOUZA, S.A.M. Fruta da paixão: panorama econômico do maracujá no Brasil. *Revista Informações Econômicas*, SP, v. 36, n.12, 2006.
- GUTIERREZ, M.F.J.; RAMOS S.B.; PROBENZA, A.; MEHOUACHI, J.; TADEO, F.R.; TALON, M. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumillus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum*, v. 111, p.206-211, 2001.
- HAAG, H.P., OLIVEIRA, G.D, BORDUCCHI, A.S; SARRUGE. Absorção de nutrientes por duas variedades de maracujá. *ESALQ* 30: 267-279. 1973.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE).



Produção. Disponível em <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/>. 2010.

JUNQUEIRA, N.T.V.; SBARMA, R.D.; JUNQUEIRA, K.P.; ANDRADE, L.R.M. Doenças constatadas na fase de pós-colheita. In: SANTOS FILHO, H.P.; JUNQUEIRA, N.T.V. (Eds). Maracujá: fitossanidade. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas. (Frutas do Brasil, 32). p. 32-36. 2003.

JUNQUEIRA, N. T. V. & BRAGA, M. F. (Ed.). Maracujá: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina: Embrapa Cerrados, cap. 2, p.41- 51, 2005.

JUNQUEIRA, N.T.V.; DOS ANJOS, J.R.N.; SILVA, A.P.O.; CHAVES, R.C.; GOMES, A.C. Reação às doenças e produtividade de onze cultivares de maracujá-azedo cultivadas sem agrotóxicos. Pesq Agropec Bras, v. 38, n. 8, 1005-10. 2003

KLOPPER, J.W.; TUZUN, S.; KUC, J. Proposed definitions related to induced disease resistance. Biocontrol Science e Technology, v.2, p. 347-349, 1992.

LIMA, A.A. Por que plantar maracujá? Cruz das Almas: EMBRAPA / CNPMF, 2p. 1993.

LIMA, A.A.; BORGES, A.L. Exigências edafoclimáticas. In: LIMA, A.A.; CUNHA, M.A.P. Maracujá: produção e qualidade na passicultura. Cruz das Almas, Embrapa, p. 37– 44. 2004.

LOPES, B.R.A Indústria no controle biológico: Produção e comercialização de microrganismos no Brasil. In: BETTIOL, W. MORANDI, M.A.B. Biocontrole de Doenças de Plantas – uso e perspectivas. Embrapa. p.16-26. 2009.

LUGTENBERG, B.J.J.; KRAVCHENKO, L.V.; SIMONS, M. Tomato seed and root exudate sugars: composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization. Environmental Microbiology, v.1, n.5, p. 439- 446, 1999.

LUZ, W.C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. In: W.C. da Luz, J.M.C. Fernandes, A.M. Prestes; E.C. Picinini (Eds.). Revisão Anual de Patologia de Plantas, 4. pp. 1-49. 1996.

MADHAIYAN, M.; POONGUZHALI, S.; KWON, S.-W.; SA, T.-M. *Bacillus methylotrophicus* sp. nov. a novel species of methanol utilizing, plant-growth promoting bacterium isolated from rice. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. (in press) – 2010.

MANICA, I. Fruticultura tropical: maracujá. In: Doenças e Pragas. 26. ed. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda., p. 105-121. 1981.

MARIANO, R.L.R; ASSIS, S.M.P. Preservação de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R.L.R; SILVEIRA, E.B.S. (Eds). Manual de práticas em fitobacteriologia. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, PE. 2005.

MATSUMOTO, S.N.; SÃO JOSÉ, A.R. Fatores que afetam a frutificação do maracujazeiro-amarelo. In: SÃO JOSÉ, A.R.; FERREIRA, F.R.; VAZ, R.L.A cultura do maracujá no Brasil. Jaboticabal: FUNEP. p. 109-123. 1991

MENEZES, S.P.; MARES, J.H.; SILVA, C.N.; ORNELLAS, R.M.S.; ROMEIRO,

R.S.; OLIVEIRA, A.C. Isolamento e caracterização fenotípica de rizobactérias de plantas de maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg). In: Anais do X Congresso de Pesquisa e Extensão (CONPEX) da UESB, Vitória da Conquista. (CD-ROM). 2007a.

MENEZES, S.P.; MARES, J.H.; PEREIRA, A.C.F.; SILVA, C.N.; ORNELLAS, R.M.S.; ROMEIRO, R.S.; OLIVEIRA, A.C. Isolamento e identificação preliminar de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas de maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg) e antagonistas ao fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) (Arq. 2007\_5D). In: Anais do I Workshop sobre Pesquisas com Passifloras na UESC, Ilhéus/BA. (CD-ROM). p. 82-82. 2007b.

MELETTI, L.M.M.; MAIA, M.L. Maracujá: produção e comercialização. Boletim Técnico do Instituto Agrônômico, Campinas, n. 181, p.151.1999.

MELETTI, L.M.M.; SOARES-SCOTT, M.D.; BERNACCI, L.C. Novas tecnologias melhoram a produção de mudas de maracujá. Revista O Agrônômico, IAC - Frutas, Campinas, v.54, n.1, 2002.

MELO, I.S. Recursos genéticos microbianos. In: Recursos genéticos & melhoramento. Microrganismos. Embrapa. p. 1-48. 2002.

MENZEL, C.M; SIMPSON, D.R.; DOWLING, A.J. Water relations in passionfruit: effect of moisture stress on growth, flowering and nutrient uptake. *Scientia Horticultura*, v.29, n. 3, p. 239-249, 1986.

MICHEREFF, S.J.; BARROS, R. Proteção de plantas na agricultura sustentável. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife. p. 1-368. 2001.

MIRZA, M.S.; AHMAD, W.; LATIF, F.; HAURAT, J.; BALLY, R.; NORMAND, P.; MALIK, K.A. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria on micro-propagated sugarcane *in vitro*. *Plant and soil*, v.237, p.47-54, 2001.

MOREIRA, F.M. S; SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e bioquímica do solo. p 17-21. 2006.

NAUTIYAL, C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, v. 170, p. 265-270, 1999.

NEHL, D.B.; ALLEN, S.J.; BROWN, J.F. Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. *Applied Soil Ecology*, v. 5, p. 1-10, 1996.

OLIVEIRA, J.A. Efeito dos substratos artificiais no enraizamento e no desenvolvimento do maracujazeiro-azedo e doce por estaquia. Dissertação de mestrado em agronomia. UnB. 54p. 2000.

PARACER, S.; AHMADJIAN, V. Symbiosis: An Introduction to Biological Associations. 2<sup>o</sup> ed. Oxford. New York. p. 3-4. 2000.

PAVAN, F.A.; GUSHIKEM, Y.; MAZZOCATO, A.C.; DIAS, S.L.P.; LIMA, E.C. Statistical design of experiments as a tool for optimizing the batch conditions to methylene blue biosorption on yellow passion fruit and mandarin peels. *Dyes and Pigments*, v. 72, p. 256-266. 2007.

PEIX, A., LANG E., VERBAG S., SPROER C., RIVAS R., SANTA-REGINA I., MATEOS P. F., MARTÍNEZ-MOLINA E., RODRÍGUEZ-BARRUECO C., VELLÁZQUEZ E. *Acinetobacter* strains IH9 and OCI1, two rhizospheric phosphate solubilizing isolates able to promote plant growth, constitute a new genomovar of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Systematic and Applied Microbiology*, 32, 334-341 p. 2009.

PIO-RIBEIRO, G.; MARIANO, R.L.R. Doenças do maracujazeiro. In: Kimati H., Amorim L., Bergamin Filho A., Camargo L.E.A., Rezende J.A.M. (Eds.) *Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas*. 3. Ed. São Paulo SP. Agronômica Ceres. pp. 525-534. 1997.

PIRES, M.M.; ARAUJO, L.V.; GOMES, A.S.; ROSADO, P.L.; MIDDLEJ, M.M.B.C.; SÃO JOSÉ, A.R. Maracujá na Bahia: produção e preço. In: XX Congresso Brasileiro de Fruticultura - Frutas para todos: estratégias, tecnologias e visão sustentável - Anais. Vitória: INCAPER. p. 1-4. 2008.

PIRES, M.C. Propagação de Maracujazeiro por estaquia e enxertia de estacas enraizadas. Universidade de Brasília. Dissertação de Mestrado, p. 27. 2007.

REGO, M.M.; BRUCKNER, C.H.; SILVA, E.A.M.; FINGER, F.L.; SIQUEIRA, D.L.; FERNANDES, A.A. Self-incompatibility in passion fruit: evidence of two locus genetic control. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 98, p.564-568, 1999.

RESHEF, L., KOREN, O., LOYA, Y., ZILBER-ROSENBERG, I.; ROSENBERG, E. The Coral Probiotic Hypothesis. *Environmental Microbiology* v.8, p. 2068–2073. 2006.

RIBEIRO, M.C.C.; MORAIS, M.J.A.; SOUSA, A. H.; LINHARES, P.C.F. & BARRO Jr., A.P. Produção de mudas de maracujá-amarelo com diferentes substratos e recipientes. *Caatinga*, v.18, n.3, p.155-158, 2006.

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

ROMEIRO, R.S. *Métodos em Bacteriologia de Plantas*, Editora UFV, Viçosa, MG, 279 p., 2001.

ROMEIRO, R.S. *Controle Biológico de Doenças de Plantas. Fundamentos*. Universidade Federal de Viçosa. 2007.

ROMEIRO, R.S. Rizobactérias promotoras do crescimento vegetal como indutores de resistência. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. *Indução de resistência de plantas a patógenos*. Piracicaba: FEALQ, p. 169-182. 2005.

ROMEIRO, R.S.; TAKATSU, A.; UESUGI, G.H.; MOURA, A. G.; SILVA, H.S.A. Um método simples para seleção de rizobactérias com capacidade de promover colonização de raízes e suas implicações na indução de resistência a enfermidades e na promoção de crescimento de plantas. In: Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Fitopatologia 32., Curitiba, 1999.

ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F. Utilização de eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura (TGGE) para estudar diversidade microbiana. In: *Recursos genéticos & melhoramento. Microrganismos*. Embrapa. p.97-127. 2002.

ROSENBERG, E.; Sharon, G.; ZILBER-ROSENBERG, I. The hologenome

theory of evolution contains Lamarckian aspects within a Darwinian framework. *Environmental Microbiology*, v. 11, p. 2959–2962. 2009.

RUGGIERO, C.; SÃO JOSÉ, A.R.; VOLPE, C.A.; OLIVEIRA, J.C.; DURIGAN, J.F.; BAUMGARTNER, J.G.; SILVA, J.R.; NAKAMURA, K., FERREIRA, M.E.; KAVATI, R.; PEREIRA, V.P. Maracujá para exportação: Aspectos técnicos da produção. Brasília: EMBRAPA-SPI, 64p. 1996.

SANTOS FILHO, M.A.P.; BARBOSA, L.V.; FARIA, G.A. Doenças do maracujazeiro. In: LIMA, A.A.; CUNHA, M.A.P. Maracujá: produção e qualidade na passicultura. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura. 2004.

SCHIPPERS, B.; BAKKER, A.W.; BAKKER, P.A.H.M. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annu. Rev. Phytopathol.* 25: 339-358. 1987.

SELOSSE, M.; BAUDOIN E.; VANDENKOORNHUYSE, P. Symbiotic microorganisms, a key for ecological success and protection of plants. *C.R. Biologies* 327, p. 639–648. 2004.

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

SILVA, R.F.; PASCHOLATI, S.F.; BEDENDO, I.P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. *Fitopatologia Brasileira*, v.32, p. 189-196, 2007.

SILVA, A.C.M. Diversidade genética, densidade populacional e potencial de promoção de crescimento de rizobactérias associadas ao cacauzeiro. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Cruz das Almas. p. 49. 2007.

SILVA, C.N.; PEREIRA, A.C.F.; MARES, J.H.; ALVES, A.B.S.; MENEZES, S. P. ; SANTOS, A. ; ROMEIRO, R. S. ; OLIVEIRA, A. C. Antagonismo *in vitro* de rizobactérias contra *Fusarium solani*, agente causal da podridão-do-pé em maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Deg) . In: Annals LIV Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticultural, v. 20. p. 224-224. Vitória/ES. 2008.

SOUSA, V.F. Níveis de irrigação e doses de potássio aplicados via fertirrigação por gotejamento no maracujazeiro amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* O. Deg). Piracicaba, 178p. Tese (doutorado) – Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo. 2000.

SOUZA, J.S.I.; MELETTI, L.M.M. Maracujá: espécies, variedades, cultivo. Piracicaba: FEALQ, 179p. 1997.

STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N.J. Aplicação e evolução dos métodos moleculares para o estudo da biodiversidade do rizóbio. Documento nº 93. Empraba. Seropédica – RJ. 1999.

STURZ, A.V.; CRISTIE, B.R.; NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. *Applied Soil Ecology*, v.15., p. 183-190, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 4. ed. Porto Alegre: E. Artmed. p. 819.

2009.

TEIXEIRA, C.G.; CASTRO, J.V.; TOCCHINI, R.P.; NISIDA, A.L.A.C.; HASHIZUME, T.; MEDINA, J.C.; TURATTI, J.M.; LEITE, R.S.S.; BLISKA, F.M.M.; GARCIA, A.E.B. Maracujá: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos. Série Frutas Tropicais ITAL, Campinas, n.9, 1994.

TEXEIRA, C.G. Multiplicação, p. 125. *In*: ITAL. Maracujá: cultura, matéria prima, processamento e aspectos econômicos. Campinas, Instituto de Tecnologia de Alimentos, 42 p. 1994.

VALE, L.S.R. Apostila de fruticultura – Ministério da educação secretaria de educação profissional e tecnológicas. Instituto federal Goiano-Campus Ceres, 2010.

VALICENTE, F.H.; BARRETO, M.R. Levantamento dos Inimigos Naturais da Lagarta do Cartucho do Milho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae), na Região de Cascavel, PR. An. Soc. Entomol. Brasil. v. 28, p. 333-337, 1999.

VALLAD, G. E., & GOODMAN, R. M. (2004). Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture. *Crop Sci*, 44(6), 1920-1934.

VANCURA, V. Fluorescent pseudomonads in the rhizosphere of plants e their relation to root exudates. *Folia Microbiol*, v. 25, p. 168-173, 1980.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; De VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*, Washington, v. 60, p. 407-438, 1996.

VARASSIN, I.G.; TRIGO, J.R.; SAZIMA, M. The role of nectar production, flower pigments and odour in the pollination of four species of *Passiflora* (Passifloraceae) in south-eastern Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 136, p. 139-152, 2001.

VASCONCELLOS, M.A.S.; FILHO, J.D. Ecofisiologia do maracujazeiro 2000, informe agropecuário, Belo Horizonte, v.21, n. 206, p.25-28, 2000.

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

VIANA, F.M.P.; COSTA, A.F. Doenças do maracujazeiro. *In*: FREIRE, F.C.O.; CARDOSO, J.E.; VIANA, F.M.P. Doenças de fruteiras tropicais de interesse agroindustrial. p. 269. Brasília: Embrapa Informação tecnológica, 2003.

VIANA, M.P.V.; FREIRE, F.C.O.; CARDOSO, J.E.; VIDAL, J.C. Principais Doenças do Maracujazeiro na Região Nordeste e seu Controle. Comunicado Técnico. Embrapa. ISSN 1679-6535. Fortaleza, CE, 2003.

VIEIRA, W.A.S.; ORNELLAS, R.M.S.; TOSTO, T.F.; OLIVEIRA, A.C. Antagonismo *in vitro* de rizobactérias de *Passiflora* spp. à *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. *In*: X Reunião Brasileira sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas, 2009, Recife. Anais da X Reunião Brasileira sobre Controle Biológico de Doenças de Plantas, 2009.

VIEIRA, W.A.S.; BONFIM-SILVA, V.; OLIVEIRA, A.C. Avaliação fenotípica da biodiversidade de rizobactérias de *Passiflora cincinnata* e *P. trintae*. *In*: Anais

do XVIII Encontro de Genética do Nordeste, 2010, Jequié/BA. 2010 a.

VIEIRA, W.A.S.; ORNELLAS, R.M.S.; LOGUERCIO, L.L.; OLIVEIRA, A.C. Antagonismo direto *in vitro* de rizobactérias de *Passiflora* spp. à *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae*. In: Anais do XXI Congresso Brasileiro de Fruticultura, Natal/RN. p. 10. 2010b.

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

ZAGO, V.C.P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N.G. *Pseudomonas* spp.–Bactérias Fluorescentes promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola. Documento n. 127, EMBRAPA Agrobiologia, 8 p.. 2000.

ZEHNDER, G.W.; MURPHY, J.F.; SIKORA, E.J.; KLOEPPER, J.W. Application of rhizobacteria for induced resistance. *European Journal of Plant Pathology*. v. 107, p. 39-50. 2001.

ZILBER-ROSENBERG, I.; ROSENBERG, E. From bacterial bleaching to the hologenome theory of evolution . *Proceedings of the 11th International Coral Reef Symposium*, Ft Lauderdale, Florida, p. 7-11 July 2008.

ZILBER-ROSENBERG, I.; ROSENBERG, E. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol Rev*, v.32, p.723-735, 2008.

## 8. ANEXOS

### Anexo 1

#### Características Morfológicas – Isolados da região de Livramento de Nossa Senhora (LNS).

Isolado	Forma	Cor	O/T*	Elevação	Superfície	Borda	Gram	Fluorescência
LNS A								
1	Irregular	Bege claro	Opaco	Umbilicada	Papilada	Lobada	positivo	Não
2	Circular	Bege claro	Brilhante	Elevada	Lisa	Perfeita	positivo	Sim
3	Circular	Bege claro	Brilhante	Elevada	Lisa	Perfeita	positivo	Não
4	Irregular	Bege claro	Opaco	Plana	Lisa	Perfeita	positivo	Não
7	Irregular	Amarelo claro	Brilhante	Elevada	Lisa	Perfeita	negativo	Não
9	Irregular	Bege claro	Opaco	Plana	Rugosa	Ondulada	positivo	Não
12	Irregular	Laranja	Brilhante	Plana	Lisa	Perfeita	positivo	Sim
16	Circular	Bege	Brilhante	Convexa	Lisa	Perfeita	negativo	Não
17	Circular	Bege	Brilhante	Convexa	Lisa	Perfeita	negativo	Sim
20	Circular	Bege claro	Opaco	Elevada	Lisa	Perfeita	positivo	Não
21	Circular	Bege	Brilhante	Convexa	Lisa	Perfeita	positivo	Não
22	Circular	Bege claro	Brilhante	Elevada	Lisa	Perfeita	positivo	Não
23	Circular	Branca	Opaco	Plana	Rugosa	Ondulada	positivo	Não
25	Circular	Bege claro	Brilhante	Elevada	Lisa	Perfeita	negativo	Não
27	Circular	Rosa forte	Brilhante	Convexa	Lisa	Perfeita	negativo	Não
26	Circular	Branca	Opaco	Plana	Rugosa	Ondulada	positivo	Não
28	Circular	Branca	Opaco	Plana	Rugosa	Ondulada	positivo	Não
30	Circular	Bege	Brilhante	Convexa	Lisa	Perfeita	negativo	Sim
32	Irregular	Bege escuro	Brilhante	Plana	Lisa	Perfeita	negativo	Sim
33	Circular	Bege	Brilhante	Convexa	Lisa	Perfeita	negativo	Sim
35	Circular	Bege Claro	Brilhante	Plana	Lisa	Perfeita	negativo	Sim
36	Circular	Bege Claro	Brilhante	Elevada	Lisa	Perfeita	positivo	Não
37	Irregular	Bege	Brilhante	Elevada	Lisa	Perfeita	negativo	Sim
38	Irregular	Bege	Brilhante	Elevada	Lisa	Perfeita	negativo	Sim
41	Circular	Bege	Brilhante	Plana	Lisa	Perfeita	positivo	Não
42	Irregular	Branco claro	Opaco	Plana	Lisa	Ondulada	positivo	Não
44	Irregular	Bege escuro	Brilhante	Elevada	Lisa	Ondulada	positivo	Não
47	Irregular	Branco	Opaco	Umbilicada	Rugosa	Ondulada	positivo	Não
49	Circular	Bege	Brilhante	Plana	Lisa	Perfeita	negativo	Sim
LNS B								
110	Irregular	Branco	Opaco	Umbilicada	Rugosa	Ondulada	negativo	Não
111	Rizóide	Bege	Opaco	Plana	Rugosa	Rizoide	negativo	Não
112	Circular	Branco	Brilhante	Convexa	Lisa	Perfeita	negativo	Não
113	Irregular	Branco	Opaco	Plana	Rugosa	Perfeita	negativo	Não
114	Irregular	Branco	Brilhante	Plana	Lisa	Ondulada	negativo	Não
115	Irregular	Bege	Brilhante	Plana	Lisa	Perfeita	negativo	Não
116	Irregular	branca	Opaco	Elevada	Umbilicaa	Ondulado	negativo	Não
117	Circular	Branco	Brilhante	Convexa	Lisa	Perfeita	negativo	Não
118	Circular	Branco	Brilhante	Plana	Rugosa	Perfeita	negativo	Não
119	Circular	Bege	Brilhante	Elevada	Rugosa	Perfeita	negativo	Não
120	Circular	Bege claro	Brilhante	Elevada	Lisa	Perfeita	negativo	Não
121	Irregular	Branco	Brilhante	Plana	Lisa	Perfeita	negativo	Não
122	Irregular	Bege	Opaco	Elevada	Lisa	Ondulada	negativo	Não
123	Circular	Bege claro	Brilhante	Convexa	Lisa	Perfeita	positivo	Não
124	Circular	Bege	Opaco	Elevada	Lisa	Ondulada	negativo	Não
125	Circular	Branco	Opaco	Plana	Lisa	Perfeita	negativo	Não
126	Circular	Bege	Brilhante	Plana	Rugosa	Perfeita	negativo	Não

**Siglas:**

- LNS A – Local de coleta 1
- LNS B – Local de coleta 2
- O/T – Opacidade/transparência



## Características Morfológicas – Isolados da região de Canavieiras (CAN).

Isolado	Forma	Cor	O/T*	Elevação	Superfície	Borda	Gram	Fluorescência
CAN A								
51	Rizóide	branca	brilhante	plana	rugosa	rizóide	positivo	Não
57	circular	bege claro	opaca	convexa	rugosa	ondulada	positivo	Não
61	circular	Bege claro	translúcida	plana	lisa	perfeita	negativo	Sim
62	circular	Bege claro	brilhante	convexa	lisa	perfeita	negativo	Sim
63	circular	amarelo claro	translúcida	plana	lisa	perfeita	negativo	Não
64	circular	amarelo	translúcida	plana	lisa	perfeita	negativo	Não
68	circular	bege claro	brilhante	plana	lisa	perfeita	positivo	Não
71	Irregular	bege claro	opaca	plana	rugosa	ondulada	positivo	Sim
72	circular	amarelo claro	brilhante	plana	lisa	perfeita	negativo	Não
74	circular	bege claro	brilhante	convexa	lisa	perfeita	negativo	Sim
75	circular	branco	brilhante	convexa	lisa	perfeita	negativo	Sim
76	circular	bege escuro	opaca	plana	rugosa	perfeita	positivo	Não
CAN B								
77	Irregular	Amarela	Brilhante	Plana	lisa	lobada	Negativo	Sim
78	Circular	Branca	brilhante	convexa	lisa	perfeita	Positiva	Não
79	Circular	Bege claro	opaca	plana	rugosa	ondulada	Positiva	Não
83	Circular	Amarelo	Brilhante	elevada	lisa	perfeita	Positiva	Não
84	Irregular	Bege	Translúcida	Plana	lisa	ondulada	Positiva	Não
85	Circular	Bege	Translúcida	elevada	lisa	perfeita	Negativo	Não
86	Circular	Bege claro	Translúcida	elevada	lisa	ondulada	Positiva	Não
87	Irregular	Bege	Brilhante	Plana	lisa	perfeita	Positiva	Não
88	Circular	Branca	Brilhante	Plana	rugosa	lobada	Positiva	Não
89	Circular	Branca	Translúcida	Plana	lisa	perfeita	Positiva	Não
90	Circular	Bege escuro	opaca	elevada	rugosa	ondulada	Positiva	Não
91	rizóide	Branca	Brilhante	elevada	rugosa	rizóide	Positiva	Não
93	Irregular	Bege claro	Translúcida	Plana	lisa	ondulada	Positiva	Não
94	Irregular	Bege	Brilhante	elevada	lisa	ondulada	Positiva	Não
96	Circular	Bege	Translúcida	elevada	lisa	perfeita	Positiva	Não
97	Circular	Bege	Brilhante	convexa	lisa	perfeita	Positiva	Não
98	Irregular	Bege	Translúcida	Plana	lisa	ondulada	Positiva	Não
99	Irregular	Bege	Translúcida	elevada	lisa	ondulada	Negativo	Não
100	Circular	Bege	Brilhante	elevada	lisa	perfeita	Negativo	Não
101	Circular	Bege escuro	Brilhante	elevada	lisa	perfeita	Negativo	Sim
102	Circular	Bege escuro	opaca	elevada	rugosa	ondulada	Negativo	Sim
103	Irregular	Bege claro	Translúcida	elevada	lisa	ondulada	Positiva	Não
104	Irregular	Bege	opaca	Plana	lisa	ondulada	Negativo	Sim
105	Circular	Branca	opaca	Plana	rugosa	ondulada	Positiva	Não
106	Circular	Bege claro	opaca	Plana	rugosa	perfeita	Positiva	Não
107	Circular	Bege	Brilhante	convexa	lisa	perfeita	Positiva	Sim
108	Circular	Rosa Forte	Brilhante	elevada	lisa	perfeita	Negativo	Não
109	Irregular	bege	Brilhante	elevada	lisa	perfeita	Negativo	Não

Siglas:

- CAN A – Local de coleta 1
- CAN B – Local de coleta 2
- O/T – Opacidade/transparência