

**BIOPROSPECÇÃO DE *Bacillus* spp PROMOTORES DO CRESCIMENTO DE
MUDAS DE EUCALIPTO**

ANA LIGIA DE LIMA MOREIRA

BIOPROSPECÇÃO DE *Bacillus* spp PROMOTORES DO CRESCIMENTO DE MUDAS DE EUCALIPTO

ANA LIGIA DE LIMA MOREIRA

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre - Área de Concentração: Produção vegetal

Orientador: Fabio Fernando de Araújo

634.956
M843b

Moreira, Ana Ligia de Lima .
Bioprospecção de *bacillus* spp
promotores de crescimento em eucalipto. /
Autor. – Presidente Prudente, 2011.
(50) f.: il.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste,
Presidente Prudente, SP, 2012.

Bibliografia.

Orientador: Fabio Fernando de Araújo

1. Rizobactérias. 2. *Eucalyptus urograndis* 3.
Reflorestamento. I. Título.

ANA LIGIA DE LIMA MOREIRA

BIOPROSPECÇÃO DE *Bacillus* spp PROMOTORES DE CRESCIMENTO EM EUCALIPTO

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre. - Área de Concentração: Produção vegetal

Presidente Prudente, 04 de outubro de 2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fabio Fernando de Araújo
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dr. Carlos Sérgio Tiritan
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente-SP

Prof. Dr. Andréia Cristina Silva Hirata
APTA- Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios
Presidente Prudente-SP

Aos meus pais, Aurélio Caetano e a Ligia Machado, duas pessoas com muita sabedoria, discernimento, bom senso e dedicação estiveram ao meu lado me encorajando e me dando força nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória. Obrigada por serem meus pais!!!

AGRADECIMENTOS

Ao concluir este trabalho, revendo tudo o que aconteceu no decorrer dele, vejo que nem sempre tudo foi fácil, porém foi como tinha de ser. Os problemas que foram solucionados com o passar do tempo, foi em muito facilitada por ter contado com o apoio daqueles a quem agora me cabe agradecer.

À Deus por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.

Ao orientador desta dissertação, Fabio Fernando de Araújo, por todo empenho, sabedoria, compreensão amizade, acima de tudo um exemplo competência quanto a um profissional por sua dedicação.

Aos melhores pais do mundo, Aurélio e Ligia que nunca mediram esforços para me ajudar, esquecendo-se dos seus próprios sonhos para conquistarem os meus, me apoiando em cada decisão, estando comigo nas horas de tristeza, alegria, me ajudando mesmo sem compreender muito do que se tratava em toda e execução do meu trabalho, até na parte prática sem se preocupar se era mais um feriado ou final de semana perdido. À meu pequeno e ao mesmo tempo grande irmão Matheus que por muitas vezes deixou de brincar para ajudar a plantar, regar, medir plantas, digitar planilhas, estando sempre ao meu lado, se preocupando e me ajudando no possível.

Ao meu namorado Hardilles obrigado pelo companheirismo, pelos conselhos na hora de dúvidas, pelo apoio, pelo carinho, e por toda a ajuda na parte prática e teórica, as quais não foram poucas durante essa caminhada do mestrado, ou simplesmente por estar ao meu lado me fazendo feliz e por a sua família que tenho tanto carinho e sempre me acolheu como uma filha.

À Pontal flora e a Unoeste que disponibilizaram as mudas de clones de eucalipto utilizadas neste experimento.

As minhas duas avós, pois hoje sei que o que aprendi em toda a trajetória do mestrado não equivale a nada quando comparado à sabedoria delas. À toda minha família tios, tias, primos e primas não vou citar nomes pois a família é grande e todos são importantes para mim, eu não poderia escolher família melhor, como é bom ter o apoio e encontrar a felicidade entre vocês.

Agradeço a todos os alunos e professores do Mestrado em Agronomia, colegas presentes na hora dos estudos, de dúvidas, conselhos, alegria. Especialmente ao professor Nelson, por sempre se preocupar comigo, pela amizade das colegas Catariny, Vivian, Maryhellen e Nara e ao colega Alexandrius pelas incontáveis caronas, pelos momentos felizes, pelos conselhos, pelas dúvidas tiradas. A keid que esta sempre pronta sendo sempre eficaz em resolver os problemas, dar explicações, com toda a parte burocrática do mestrado, com uma gentileza e delicadeza impressionante, até nos problemas mais chatos. A Márcia, a Luciana, a Edna e a Lindaura por seus vários conselhos e por todos os momentos de diversão que tivemos nos laboratórios da Unoeste. A amiga Rita, como duas pessoa podem pensar tão igual, e como diria o meu orientador, “eita dupla que fui arrumar”... obrigado Rita por toda ajuda obrigado por sua amizade ... e quando penso em você, a frase que me vem na cabeça é “kkkkkkkkk”.

Aos amigos Edson, Ana Paula, os quais a amizade eu cultivo desde a faculdade, e espero que dure para sempre, pois são amigos nas horas difíceis ou alegres. Desta época também ainda resiste à amizade com o amigo Willian, a quem sempre eu incomodo pedindo artigos e explicações.

As amigas Anameli e Janiele amigas que adoro tanto, as quais sempre escutaram podendo ser um dia de tristeza, estresse ou alegria. A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução dessa dissertação de Mestrado.

A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro.

Albert Einstein

RESUMO

Bioprospecção de *Bacillus* spp promotores de crescimento de eucalipto

Objetivou-se neste trabalho avaliar características bioquímicas de interesse agrônômico em isolados de *Bacillus* sp., originários da rizosfera de eucalipto e seu efeito no crescimento de mudas de *Eucalyptus urograndis*. O projeto foi conduzido em condições de laboratório e casa de vegetação. A partir do isolamento de bactérias da rizosfera de plantas, oriundas de diferentes municípios da região oeste paulista, foram obtidos 127 isolados de *Bacillus* spp. Foram realizados testes bioquímicos para caracterização dos isolados bacterianos quanto ao antagonismo de fungos fitopatogênicos, produção de auxinas, produção de amônia e atividade enzimática. Na etapa final foi avaliado o potencial dos isolados para promoção de crescimento mudas de eucalipto e cultivo das plantas em casa de vegetação durante 90 dias. Avaliou-se parâmetros de crescimento do eucalipto objetivando-se selecionar os melhores isolados e também correlacionar as diferentes variáveis analisadas no trabalho. O protocolo de bioprospecção de isolados de *Bacillus* sp. no solo foi válido para se encontrar rizobactérias promissoras para o crescimento de *Eucalyptus urograndis*. Foram selecionados cinco isolados como promissores para ação no crescimento de *Eucalyptus urograndis*. O potencial antagônico a fungos fitopatogênicos encontrados nos isolados de rizobactérias foi útil na fase inicial de seleção de rizobactérias promotoras do crescimento de eucalipto, pois apresentou correlação significativa com o crescimento das plantas.

Palavras-chave: Rizobactérias, *Eucalyptus urograndis*, Reflorestamento.

ABSTRACT

Bioprospecting of *Bacillus* spp growth promoters of eucalyptus

The objective of this study was to evaluate biochemical characteristics of agronomic interest in isolates of *Bacillus* sp., Originating from the rhizosphere of Eucalyptus and its effect on growth of seedlings of *Eucalyptus urograndis*. The project was conducted under laboratory and greenhouse. From the isolation of bacteria from the rhizosphere of plants originating from different municipalities in the region west of São Paulo, were obtained from 127 isolates of *Bacillus* spp. Tests were performed biochemical characterization of bacterial isolates on the antagonism of pathogenic fungi, production of auxin, ammonia production and enzyme activity. In the final step we evaluated the potential of the isolates for growth promotion eucalyptus seedlings and growing plants in a greenhouse for 90 days. We evaluated growth parameters of Eucalyptus aiming to select the best individual and also correlate the different variables at work. The bioprospecting protocol isolates of *Bacillus* sp. the soil was valid to meet rhizobacteria promising for growing *Eucalyptus urograndis*. Five isolates were selected as promising for action on growth of *Eucalyptus urograndis*. The potential antagonistic to pathogenic fungi found in isolates of rhizobacteria helpful in the initial selection of plant growth promoting rhizobacteria eucalyptus, it showed significant correlation with plant growth.

Keywords: Rhizobacteria, *Eucalyptus urograndis*, Forestry.

LISTA DE SIGLAS

AIA - ácido indol-acético

ACC- ácido 1-amino-ciclopropano-1-carboxílico

BDA - batata, dextrose, agar

N- nitrogênio

P – fósforo

RPCP- rizobactérias promotoras do crescimento em plantas

RPM – rotações por minuto

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- A Região Administrativa de Presidente Prudente	26
FIGURA 2 – Distribuição de frequência da capacidade de antagonismo de 127 isolados bacterianos a <i>Aspergillus niger</i>	32
FIGURA 3 – Distribuição de frequência da capacidade de crescimento dos 127 isolados bacterianos, em meio mínimo, com adição de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC).	33
FIGURA 4 – Distribuição de frequência da capacidade de solubilização de fosfatos em 127 isolados bacterianos.	34
FIGURA 5 - Distribuição de frequência da capacidade de produção de amônia em 127 isolados bacterianos.	35
FIGURA 6 – Distribuição de frequência da capacidade de produção auxinas em 127 isolados bacterianos.	36

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Resumo da análise de variância com valores obtidos pelo teste F nas seguintes variáveis: altura, diâmetro do caule, massa seca parte aérea e massa seca das raízes de eucalipto inoculado com rizobactérias.....	37
TABELA 2 – Avaliação de produção de massa seca ((MS) g pl ⁻¹) da parte aérea de eucalipto inoculado com 127 isolados de rizobactérias.....	38
TABELA 3 - Correlação de Pearson entre variáveis de crescimento e características bioquímicas nas rizobactérias promotoras de crescimento de eucalipto selecionadas neste estudo.....	39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Importância da Cultura do Eucalipto	15
2.2 Rizobactérias Promotoras do Crescimento em Plantas	15
2.3 Modos de Ação das Rizobactérias	17
2.3.1 Solubilização de fosfatos	17
2.3.2 Interações microbianas na disponibilidade de nitrogênio	19
2.3.3 Produção de ácido 1- carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) desaminase pelas rizobactérias	20
2.3.4 Controle de fitopatógenos	21
2.3.5 Produção de fitoreguladores	22
2.3.6 Gênero <i>Bacillus</i> e seu potencial como promotor do crescimento em plantas ..	23
3 OBJETIVO.....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Local de Desenvolvimento dos Trabalhos.....	26
4.2 Área de Coleta das Plantas.....	26
4.3 Isolamento de <i>Bacillus</i> spp.....	27
4.4 Inibição de <i>Aspergillus niger in vitro</i>	27
4.5 Avaliação da Produção da Enzima ACC Desaminase	28
4.6 Teste de Solubilização de Fosfato	28
4.7 Determinação de Produção de Amônia pelos Isolados.....	29
4.8 Ensaio para Avaliação de Produção do Hormônio AIA (Acido Indol Acético)	29
4.9 Experimento para Avaliação de Promoção de Crescimento de eucalipto	30
4.10 Análises Estatísticas	300
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
6 CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS.....	42

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Eucalyptus* é nativo da Austrália e pertence à família *Myrtaceae*. Possui cerca de 600 espécies, além de um grande número de variedades e alguns híbridos. O Brasil ocupa a segunda colocação mundial em área de cultivo dessa espécie com cerca de cinco milhões de hectares, perdendo apenas para a Índia. Em termos de espécies utilizadas em reflorestamentos no Brasil, o eucalipto é responsável por cerca de 60% da área ocupada por esta atividade.

O cultivo de eucalipto tem ocupado grandes áreas agrícolas na região oeste paulista com aumento gradativo na última década. Por ser uma espécie de cultivo perene as tecnologias que possam ser adotadas na fase de implantação irão contribuir com desenvolvimento da cultura ao longo dos anos, podendo ser responsáveis por maiores rendimentos na fase da extração da madeira.

As rizobactérias promotoras do crescimento de plantas são bactérias que habitam o solo e com frequência são isoladas da rizosfera de diversas plantas cultivadas. Os efeitos destes microrganismos sobre o crescimento das plantas são amplos, incluindo os efeitos benéficos no controle de fitopatógenos no solo, emergência de plântulas e crescimento de plantas. Várias espécies de rizobactérias têm sido avaliadas em diferentes culturas agrícolas, porém os trabalhos com espécies florestais são escassos, necessitando maiores investimentos da pesquisa.

A seleção de rizobactérias que possam ser utilizadas como inoculantes para o eucalipto tem muita importância na atualidade, pois esses microrganismos apresentam habilidades de interesse para a manutenção da sanidade e promoção do crescimento da cultura. A introdução das rizobactérias na fase inicial do crescimento das plantas vai colaborar para o desenvolvimento das plantas na etapa mais crítica da cultura que são os primeiros meses onde as plantas estão mais suscetíveis ao ataque de patógenos e déficits hídrico e nutricional. Os benefícios que as plantas poderão receber a partir da inoculação com as rizobactérias são: controle biológico de fitopatógenos, indução de resistência às pragas, maior tolerância ao estresse hídrico, maior disponibilidade de nutrientes solúveis no solo, entre outros.

O isolamento de bactérias de plantas cultivadas na região aumenta as chances para a seleção de isolados promissores que possam estar mais adaptadas

às condições edafoclimáticas regionais e com isto podem contribuir como inoculantes para o cultivo do eucalipto em grandes áreas comerciais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância da Cultura do Eucalipto

O Brasil atualmente ocupa a segunda posição no cenário mundial em área plantada com espécies do gênero *Eucalyptus*, totalizando aproximadamente cinco milhões de hectares, sendo destinado cerca de 70% desta área cultivada para a produção de papel e celulose (ABRAF, 2012).

A demanda por madeira e a competição de mercados tem estimulado a busca de alternativas para o aumento da produtividade dos plantios de *Eucalyptus* spp. A clonagem de genótipos promissores vem possibilitando um importante avanço no cultivo intensivo dessa espécie no Brasil (SANTOS, 1994).

No Brasil hoje os plantios de eucalipto suprem a demanda por madeira com propriedades tecnológicas e silviculturais específicas de diversos setores industriais, o de papel e celulose, carvão vegetal, postes, moirões de cerca e, mais recentemente, o de madeira serrada. A produção de mudas é feita preferencialmente por meio da clonagem, pois garante a manutenção plena das características da planta-matriz selecionada e a implantação de talhões uniformes obtendo uma maior produtividade, incluindo resistência a doenças (ALFENAS et al., 2004).

2.2 Rizobactérias Promotoras do Crescimento em Plantas

A rizosfera é uma palavra de origem grega criada a partir dos termos “rhizo” e “sphaera”, expressa o volume de solo que é influenciado pela raiz na distância de 1 a 5 mm. Lorenz Hiltner é reconhecido como o primeiro cientista a citar o termo "rizosfera" em 1904. Com estudos sobre a germinação e o crescimento de plantas de diferentes cultivos (leguminosas e não leguminosas) Hiltner se convenceu, que exsudatos radiculares de diferentes plantas ajudavam o desenvolvimento de diferentes comunidades bacterianas. Sua definição de "rizosfera" foi centrada na ideia de que a nutrição das plantas é bastante influenciada pela composição microbiana da rizosfera (HARTMANN et al., 2008).

A rizosfera é um ambiente complexo onde as raízes podem interagir com as propriedades física, química e biológica do solo (RICHARDSON et al., 2009).

Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) são as bactérias encontradas na rizosfera, podendo estar na superfície ou em associação com as raízes, sendo capazes de aumentar o crescimento da planta de maneira direta ou indireta (GALDIANO JR, 2011). Pesquisa sobre as RPCP tem aumentado cada vez mais desde que o termo foi utilizado pela primeira vez por Kloepper e colaboradores no final de 1970 (VESSEY, 2003). Entre os gêneros mais estudados destacam-se: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Azospirillum* e *Rhizobium*. Os efeitos desses microrganismos sobre o desenvolvimento das plantas são amplos, incluindo os efeitos benéficos na germinação de sementes, emergência de plântulas e crescimento das plantas (LAZZARETI; BETTIOL, 1997).

Dantas et al. (2009) destacam que na rizosfera as propriedades físico-químicas apresentam elevada estabilidade e em função da exsudação constante de substratos e fatores de crescimento, favorece intensa atividade metabólica e gerações da microbiota e permite interações biológicas de competição, predação, comensalismo e mutualismo.

Para as RPCP terem um efeito benéfico no crescimento da planta melhorando o estado nutricional do seu hospedeiro, é necessário existir uma relação íntima entre a RPCP e a planta hospedeira. As relações entre RPCP e seus hospedeiros podem ser categorizadas em dois níveis de complexidade: rizosférico e endofítica (VESSEY, 2003).

As rizobactérias indiretamente podem reduzir ou prevenir os efeitos negativos de um ou mais microrganismos patogênicos e, ou, deletérios ao crescimento de plantas. Sendo que o efeito direto causado pelas rizobactérias na promoção de crescimento geralmente ocorre pela produção de substâncias que atuam como reguladores de crescimento da planta, podendo com a interação causar mudanças fisiológicas. Estas bactérias também podem proporcionar benefícios como aumento da absorção de nutrientes e controle de fitopatógenos (GLICK, 1995; COELHO et al., 2007).

Rizobactérias têm sido utilizadas como inoculantes para biofertilização, biorremediação, biopesticidas e bioestimulação. No entanto, o desenvolvimento de produtos comerciais utilizando esse grupo de microrganismo para espécies agrônomicas e florestais tem sido um processo lento, em grande parte por variações nas respostas de promoção de crescimento após a bacterização (SHISHIDO; CHANWAY, 1998). A fonte dessa variação está relacionada a fatores abióticos e

bióticos associados à rizosfera. Dentre os fatores abióticos, a textura, estrutura do solo, aeração e pH influenciam o crescimento de plantas e microrganismos do solo e intimamente, as respostas de inoculação das plantas com rizobactérias. No entanto, as interações bióticas envolvendo o inóculo da bactéria, a comunidade microbiana natural do solo e o genótipo das plantas hospedeiras têm afetado a magnitude das respostas (CHANWAY; TURKINGTON; HOLL, 1991).

Nesse sentido, acredita-se que a aplicação de isolados selecionados de rizobactérias pertencentes ao seu local de origem estejam mais adaptadas, sendo assim, devem promover uma melhor resposta no crescimento de plantas, devido ao menor impacto dos fatores abióticos e bióticos.

2.3 Modos de Ação das Rizobactérias

2.3.1 Solubilização de fosfatos

O fósforo (P) é o nutriente que pode limitar o crescimento das plantas, sendo imprescindível no metabolismo de plantas e microrganismos (MARTINAZZO et al., 2007). Entretanto, os solos podem ter grandes reservas de P total, mas as quantidades disponíveis geralmente são uma pequena proporção do total que as plantas podem assimilar (STEVENSON; COLE, 1999; RICHARDSON et al., 2009). A baixa disponibilidade de P para as plantas é devido a grande maioria de P no solo está concentrado em formas insolúveis, entretanto as plantas somente podem absorver P como ânions ortofosfato, predominantemente em duas formas solúveis, o monobásico (H_2PO_4) e o dibásico (HPO_4^-) (GLASS, 1989).

No solo, o P está sujeito a diversos processos biogeoquímicos que alteram sua disponibilidade. Entre estes processos, destaca-se a dissolução das formas pouco solúveis de P, tornando-as disponíveis para as plantas (SOUCHIE et al., 2007). Bactérias solubilizadoras de fosfato são comuns na rizosfera e a secreção de ácidos orgânicos e enzimas do grupo das fosfatases são métodos comuns que facilitam a conversão de formas insolúveis de P para formas disponíveis para as plantas (KIM et al., 1998).

A disponibilidade de P na rizosfera é influenciada significativamente por alterações no pH e os exsudados de raiz que pode afetar direta ou indiretamente a disponibilidade de nutrientes e / ou atividade microbiana (RICHARDSON et al., 2009;

RICHARDSON, 1994). A acidificação da rizosfera em resposta ao P tem sido demonstrada por uma série de espécies podendo alterar a solubilidade do P inorgânico (HINSINGER et al., 2003).

A acidificação também é comumente associada com a liberação de ânions orgânicos o que têm sido amplamente relatado para vários microrganismos. Ânions orgânicos podem aumentar ainda mais a mobilização de formas específicas de P pouco solúvel (por exemplo, Al-P e Fe-P) através de reações de quelação (WHITELAW, 2000).

Atividade das fosfatases é significativamente maior na rizosfera e é considerada como uma resposta das plantas à mobilização do P encontrado nas formas orgânicas em resposta a deficiência de P (RICHARDSON et al., 2005). Estas enzimas são necessárias para a hidrólise (mineralização) de P orgânico. Na maioria dos casos a mineralização do P orgânico é mediada por microrganismos que contribuem significativamente na disponibilidade de P para a planta (OEHL et al., 2004). Dependendo do tipo de solo, as formas orgânicas de P constituem cerca de 50% do total de P no solo, sendo a forma predominante de P encontrado em soluções de solo (SHAND et al., 1994). O P orgânico dissolvido é derivado em grande parte a partir da quantidade de microrganismos no solo havendo uma relação com a quantidade de ortofosfato, que tem maior mobilidade na solução do solo (SEELING; ZASOSKI, 1993).

O efeito benéfico de inoculantes microbianos para a utilização do P orgânico pelas plantas sob condições controladas de crescimento têm sido apresentado na literatura (RICHARDSON et al., 2001.). A solubilização de P na rizosfera é o modo mais comum de ação sugerido em RPCP, pois aumenta a disponibilidade de nutrientes para as plantas hospedeiras. Apesar das rizobactérias solubilizadoras de fosfato apresentarem potencial para uso como inoculantes, sua aplicação permanece limitada devido à falta de conhecimento sobre ecologia microbiana e dinâmica das populações no solo em ambientes não controlados (RICHARDSON, 2000).

Ganhos na nutrição de plantas inoculadas com *Bacillus* sp também têm sido destacados como benefício advindo da presença deste grupo de microrganismos na rizosfera. Rodriguez; Fraga (1999) citaram que estirpes do gênero *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Rhizobium* estão entre as bactérias com maior potencial de solubilização de fósforo.

2.3.2 Interações microbianas na disponibilidade de nitrogênio

O nitrogênio (N) é um dos principais constituintes das biomoléculas e, em sua forma molecular (N_2), compõe aproximadamente 80% da atmosfera. O nitrogênio do ar mesmo sendo abundante é quimicamente inerte e poucos organismos tem a capacidade de utilizá-lo. O N_2 não é assimilável pelas plantas, já que a maioria das plantas obtém o nitrogênio do solo sob a forma de íon nitrato (NO_3) e amônio (NH_4) (SOUZA; FERNANDES, 2006). No solo o nitrogênio disponível para as plantas pode estar na forma de nitrato, amônia, aminoácidos, peptídeos e purinas, sendo encontrados transportadores de membranas para todas estas formas (WILLIAMS; MILLER, 2001).

Disponibilidade e absorção de nitrogênio ocorrem no solo nas formas orgânica e inorgânica, além de marcantes mudanças sazonais é caracterizado por uma distribuição heterogênea dentro do solo. Entradas de nitrogênio através de reações de fixação (microrganismos simbióticos ou bactérias diazotróficas) e transformações de N entre grupos diferentes têm importantes implicações para o crescimento da planta e também para a perda de N no solo (JACKSON et al., 2008).

O nitrogênio encontra-se no solo essencialmente na forma orgânica (aproximadamente 98%). Este nitrogênio orgânico é, principalmente, o produto da biodegradação de plantas e animais mortos, efetivado por bactérias. O N orgânico é eventualmente hidrolisado à amônia (NH_3) e sais de amônio (NH_4), que são convertidos em nitritos (NO_2) o qual pode ser oxidado à NO_3 pela ação das bactérias presentes no solo. A transformação biológica do N orgânico do solo em N inorgânico, executada pelos microrganismos heterotróficos do solo é chamada de mineralização. A imobilização refere-se ao processo inverso, ou seja, é a transformação do N inorgânico em orgânico. Os microrganismos do solo assimilam as formas inorgânicas de N para formar os constituintes orgânicos de suas células e tecidos. Estudos sobre os mecanismos relacionados com a imobilização e mineralização de fertilizantes nitrogenados têm sido relatados por diversos autores (SULÇE et al., 1996).

A mineralização mediada por microrganismos, onde formas orgânicas de N são transformadas em amônia (NH_4) e da sua subsequente nitrificação a nitrato (NO_3) é de grande importância para as plantas, sendo que a disponibilidade de N

tem influência sobre o comportamento da raiz e dinâmica da rizosfera (SCHIMMEL; BENNETT, 2004).

Os aminoácidos podem constituir até metade do total de N solúvel em solução do solo (concentrações que variam de 0,1 para 50 mM) e, assim, compreender uma parte significativa potencialmente disponível de N para planta (CHRISTOU et al., 2005). Aminoácidos na solução do solo ocorrem como um resultado de qualquer exsudação direta pelas raízes ou a partir da quebra de proteínas e peptídeos a partir de matéria orgânica do solo (JAEGER et al., 1999). Além disso, o envolvimento de proteases na digestão de proteínas na superfície da raiz tem sido relatado ao longo do tempo, com a possibilidade de absorção direta de proteínas por raízes através de endocitose (PAUNGFOO-LONHIENNE et al., 2008).

2.3.3 Produção de ácido 1- carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) desaminase pelas rizobactérias

O etileno é um gás hidrocarboneto (C_2H_4), que atua como fitoregulador, desempenhando um papel importante na regulação do processo deteriorativo intrínseco da planta (WINKLER, 2002). O etileno é um hormônio chave que pode inibir alongamento da raiz, senescência e abscisão de vários órgãos e maturação dos frutos (GLICK et al., 2007).

Yang e Hoffman (1984) descreveram a via de biossíntese do etileno, onde a metionina é o seu precursor biológico em todas as plantas superiores. Esse aminoácido é convertido em etileno pela via de biossíntese que compreende dois passos com reações enzimáticas. Na primeira reação, o S-adenosil-metionina é convertido em ácido 1- carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) pela ação da enzima ACC sintetase. Na segunda reação o ACC é então metabolizado pela enzima ACC oxidase, por uma reação de oxidação que necessita de O_2 e ferro, sendo ativada pela presença de CO_2 para produzir etileno.

As RPCP são capazes de estimular o crescimento da planta diretamente baixando os níveis de etileno nas plantas através da ação da enzima ACC desaminase (PRIGENT-COMBARET et al., 2008). Glick et al. (1998) relataram em seu estudo que um dos modos de ação de algumas rizobactérias para estímulo ao crescimento das plantas é a produção de ACC desaminase, uma enzima que poderia se unir ao ACC, o precursor do etileno em plantas. Assim a atividade ACC

desaminase faria diminuir a produção de etileno nas raízes de plantas hospedeiras resultando em alongamento da raiz. Em alguns casos, os efeitos de promoção do crescimento por RPCP pela atividade ACC desaminase parecem ser bem expressos em situações estressantes, como inundação (GRICHKO; GLICK, 2001), solos contaminados por metais pesados ou solos salinos (BURD et al., 1998; CHENG et al. 2007; FARWELL et al., 2007) e em resposta para fitopatógenos (WANG et al., 2000).

2.3.4 Controle de fitopatógenos

A rizosfera pode atrair microrganismos que exercem efeitos deletérios ou benéficos sobre a planta. Microrganismos que afetam negativamente o crescimento e sanidade das plantas são, geralmente, fungos patogênicos, bactérias e nematóides enquanto que os microrganismos que são benéficos incluem bactérias fixadoras de nitrogênio, fungos micorrizicos e rizobactérias promotoras do crescimento (RAAIJMAKERS et al., 2009).

Várias evidências têm suportado que os microrganismos da rizosfera são agentes protetores contra patógenos do solo (MELO, 1991; ROBBS, 1991; KLOPPER, 1999). As rizobactérias podem suprimir as doenças envolvendo vários mecanismos de ação como: antagonismo relacionado à produção de antibióticos antifúngicos como a iturina em *B. subtilis* (ARAUJO et al., 2005); competição por espaço e nutrientes com fitopatógenos e outros microrganismos prejudiciais na rizosfera (PEIXOTO, 1997; ROBIN et al., 2008); e resistência induzida, (WALL; SANCHEZ, 1993).

Os trabalhos de pesquisas com o gênero *Bacillus* tem dado bastante importância à área de controle biológico de doenças, onde se tem avaliado determinadas espécies deste gênero, como *B. subtilis* (ARAUJO, 2008). Katz e Demain (1977) citam que *B. subtilis* pode elaborar 66 tipos de diferentes antibióticos, em sua maioria polipeptídeos, com efeito inibitório contra bactérias e fungos patogênicos. Nesse contexto, a utilização de isolados de rizobactérias no substrato de mudas de eucaliptos tem apontado efeito positivo no controle de doenças causadas por vários fungos, por meio de indução de resistência (ALFENAS; ZAUZA, 2002).

A indução de resistência sistêmica não confere completa proteção, mas protege a planta de vários tipos de fitopatógenos (incluindo agentes patogênicos da raiz), sem a necessidade de interação direta entre os microrganismos indutores de resistência e o patógeno (ZEHNDER et al., 2001).

O estudo da resistência de plantas induzidas por rizobactérias, para controle de várias doenças, tem mostrado resultados promissores em várias culturas (SILVA et al., 2004). Os mecanismos de defesa das plantas podem ser ativados por um estímulo apropriado. Geralmente, essa indução de resistência é sistêmica e seu efeito pode ser observado em locais da planta distantes do local de aplicação do indutor (TEIXEIRA et al., 2005).

2.3.5 Produção de fitoreguladores

Os hormônios vegetais são reguladores naturais de crescimento das plantas e influenciam os processos fisiológicos. Constituem-se de moléculas pequenas (de 28 a 346 Da); possuem efeitos específicos sobre o crescimento e metabolismo das plantas e atuam em baixíssimas concentrações. Os hormônios vegetais podem ser classificados como auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e ácido abscísico (TAIZ; ZEIGER, 2004; KERBAUY, 2008).

Entre os fitoreguladores, a auxina (do grego auxein = aumentar) é o mais comum encontrada em plantas. O representante do grupo das auxinas mais estudado tem sido o ácido-indol-acético (AIA). Sua função está relacionada ao alongamento de células, estimulando a síntese ou desinibindo a ação de enzimas que atuam sobre as microfibrilas da parede celular, o que resulta em aumento da plasticidade da membrana; ao passo que é responsável pela formação de raízes adventícias no caule e aumento da extensão nas raízes (TAIZ; ZEIGER, 2004; RAVEN et al., 1996). Acredita-se que seu efeito benéfico para o crescimento e morfologia da raiz seja pelo maior acesso à água e nutrientes do solo (VESSEY, 2003).

A produção microbiana de AIA é, em muitos casos, dependente do aminoácido triptofano e é realizada em vias biossintéticas. A razão pela qual muitas rizobactérias são capazes de produzir auxinas ainda é desconhecida. Alguns autores sugerem que estas bactérias possuem um metabolismo relacionado ao triptofano e que a biossíntese de AIA é uma detoxificação alternativa, enquanto

outros propõem que auxinas possuem alguma função celular (SOLANO et al., 2008). Ainda assim, uma visão mutualística desta interação pode ser correta, pois o fornecimento de auxinas promove o crescimento de plantas e, desta forma, há mais exudatos e mais nutrientes para a bactéria (SOLANO et al., 2008).

A habilidade para sintetizar fitoreguladores é amplamente distribuída entre bactérias associadas a plantas, sendo que cerca de 80 % dos isolados bacterianos de rizosferas tem a capacidade de produzir AIA (ZAKHAROVA et al., 1999). O AIA supostamente não funciona como um hormônio em células bacterianas e sua produção pelas bactérias pode ter surgido devido a sua importância na relação bactéria-planta (PATTEN; GLICK, 2002)

Araujo et al. (2005) detectaram a produção de auxinas em duas estirpes de *Bacillus subtilis* as quais proporcionaram benefícios no crescimento de soja, além de serem antagonistas de fungos fitopatogênicos a cultura. Teixeira (2007) encontrou dois isolados de *B. subtilis* capazes de produzir ácido indol-acético (AIA) in vitro, e quando comparados ao tratamento de miniestacas de eucalipto com ácido indol butírico (AIB), estes isolados promoveram incrementos significativos na porcentagem de enraizamento e na massa seca do sistema radicular de miniestacas.

2.3.6 Gênero *Bacillus* e seu potencial como promotor do crescimento em plantas

O gênero *Bacillus* (família *Bacillaceae*) é extremamente heterogêneo, é um grupo diversificado de bactérias que são em forma de bastonete, Gram-positivas, possui esporos, podem ser aeróbios ou anaeróbios facultativos. A palavra bacilo, de uma forma mais geral, também pode ser usada para designar bactérias em forma de bastonetes, não necessariamente pertencentes ao gênero *Bacillus*. A maioria dos bacilos são saprófitas. Cada bactéria cria apenas um esporo, que é resistente ao calor, frio, radiação, dessecação, e desinfetantes. *Bacillus* exibem uma variedade de habilidades fisiológicas que lhes permitem viver em uma grande variedade de habitats, incluindo muitos habitats extremos como areias do deserto, nascentes de água quente e solos do Ártico (MURRAY, 2000).

Bacillus subtilis é uma das principais espécies de rizobactérias de importância para o aumento do crescimento de plantas, influenciando positivamente

a germinação, desenvolvimento e rendimento da cultura devido à produção de substâncias promotoras de crescimento e melhoria na nutrição das plantas (SRINIVASAN; PETERSON; HOLL et al., 1996; ARAUJO et al., 2005).

A promoção de crescimento das plantas mediada por *Bacillus* spp é realizada por meio de vários mecanismos, como a produção de fitoreguladores estimuladores do crescimento (DATTA et al., 1982), a mobilização do fosfato (FREITAS; BANERJEE; GERMIDA et al., 1997), a inibição da síntese de etileno (GLICK et al., 1994), a indução de resistência das plantas contra fitopatógenos (RAMAMOORTHY et al., 2001), produção de sideróforos e antibióticos (HARMAN et al., 2004) e pela eliminação dos microrganismos deletérios e de seus metabólitos tóxicos presentes na zona radicular (LUZ, 1996).

Mafia et al. (2007) avaliando a indução biológica do enraizamento e crescimento de eucalipto por isolados de rizobactérias selecionou dois isolados de *Bacillus subtilis* (S1 e 3918) que foram mais efetivos para enraizamento e biomassa radicular, com incrementos da ordem de 40,6 e 114,2%, respectivamente. Verificaram também que a aplicação de isolados de rizobactérias no substrato de produção de mudas aumentou o enraizamento e crescimento das mudas, cujos incrementos variaram conforme o clone de eucalipto e isolado de rizobactéria testados.

No âmbito da agricultura, existem diversos produtos formulados para o controle biológico de fitopatógenos, tendo como ingrediente ativo espécies do gênero *Bacillus*, como exemplo: *Bacillus thuringiensis* (DIPEL, Abbot Co., USA), *Bacillus sphaericus* (BIOBAC, ICI, Alemanha) e *B. subtilis* (KODIAK, Gustafson Inc., USA). Estes produtos têm sido aplicados em vários países do mundo (FERREIRA, 2010).

3 OBJETIVO

Objetivou-se neste trabalho avaliar características bioquímicas, de interesse agrônomo, em isolados de *Bacillus* sp., originários da rizosfera de eucalipto e seu efeito no crescimento de mudas de *Eucalyptus urograndis*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de Desenvolvimento dos Trabalhos

O isolamento de *Bacillus* spp. e caracterização bioquímica foram conduzidos no laboratório de microbiologia e fitopatologia da faculdade de Ciências Agrárias (FCA) – UNOESTE, Presidente Prudente, SP em 2011. O experimento com avaliação do crescimento de plantas foi conduzido na casa de vegetação da UNOESTE, em 2011 e 2012.

4.2 Área de Coleta das Plantas

Amostras de raízes foram coletadas de plantas jovens de eucaliptos com aproximadamente um ano de idade, sendo acondicionadas em sacos plásticos e colocadas sob refrigeração até o momento das análises. Os locais de amostragem foram os seguintes municípios: Estrela do Norte (22°29'17"S 51°40'40"W), Iepê (22°38'7"S 51°4'34"W), Itororó do Paranapanema - distrito de Pirapozinho (22°36'36"S 51°43'15"W), Montalvão - Distrito de Presidente Prudente (22°36'36"S 51°43'15"W), Montalvão - Distrito de Presidente Prudente (22°3'6"S 51°20'51"W), Presidente Prudente (22°6'53"S 51°24'47"W), Presidente Venceslau (21°47'38"S 51°51'41"W), Sandovalina (22°27'58"S 51°51'59"W) e Tarabai (22°21'35"S 51°37'47"W). A localização dos municípios dentro da região Oeste Paulista está representada na Figura 1.

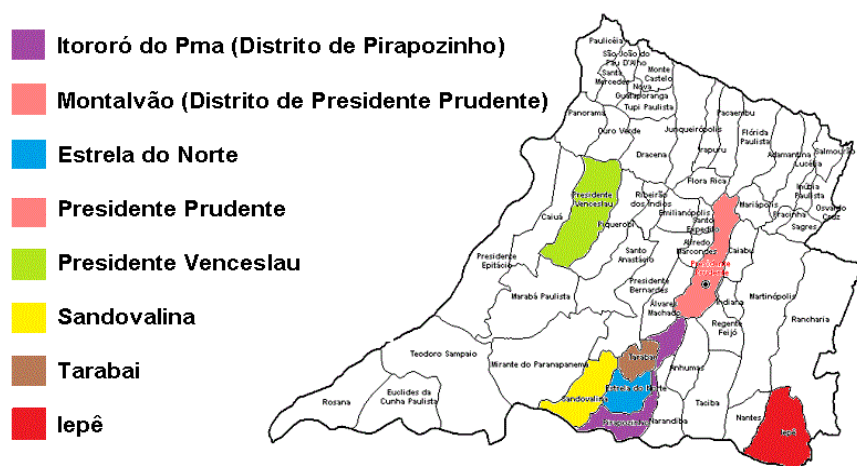


FIGURA 1- A Região Administrativa de Presidente Prudente

Fonte: http://juventude.sp.gov.br/portal.php/minha-cidade/reg_presidentepudente (Adaptado)

4.3 Isolamento de *Bacillus* spp.

No laboratório, a raiz inteira de cada planta coletada foi lavada levemente para desprender o solo que estava menos aderido e posteriormente a mesma foi fracionada e colocada em frasco erlenmeyer com solução salina esterilizada (solução de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01M). O conjunto raiz solo que permaneceu aderido foi denominado ambiente rizosférico. Esse conjunto, dentro do frasco foi submetido a 30 minutos de agitação em agitador orbital mecânico. Amostras de 1 mL retiradas do frasco foram submetidas a diluições seriadas em tubos com 10 mL de água destilada estéril. Antes do plaqueamento foram submetidas a um choque térmico (80°C/20 min) visando selecionar os microrganismos resistentes a este tratamento, onde se enquadra o gênero *Bacillus* (BUCHANAN; GIBBONS, 1975; BETTIOL, 1995). O plaqueamento foi realizado com alíquotas de 0,1 mL, coletadas nos tubos após o choque térmico e distribuídas em meio AN (ágar nutritivo) com incubação por 48 horas, em estufa a 28°C. As bactérias formadoras de colônias nas placas foram, então, isoladas e caracterizadas previamente como pertencente ao gênero *Bacillus*, de acordo com a metodologia descrita por Li e Alexander (1988). Por este procedimento foi amostrado e constituído um grupo de 127 isolados bacterianos pertencentes ao gênero *Bacillus* originário da rizosfera de eucalipto, sendo a seguinte quantidade de isolados em cada local: Estrela do norte (EN) 10 isolados, Iepê (IE) 11 isolados, Itororó do Paranapanema (IT) 11 isolados, Montalvão (M) 10 isolados, Presidente Prudente (PP) 15 isolados, Presidente Venceslau (PV) 39 isolados, Sandovalina (S) 21 isolados, Tarabai (T) 10 isolados. Os mesmos foram utilizados nas etapas posteriores. Os 127 isolados foram preservados em meio de cultura agar nutriente sob óleo mineral.

4.4 Inibição de *Aspergillus niger* in vitro

Para avaliar os isolados quanto ao potencial de antagonismo a fungos foi utilizado o método de pareamento em placas de Petri contendo BDA [batata(250g.L⁻¹):dextrose(10g.L⁻¹):agar(15g.L⁻¹)] segundo metodologia descrita por Araujo et al (2005). Foi utilizado fungo fitopatogênico *Aspergillus niger*, que foi inoculado pela introdução de discos com micélio, em quatro pontos equidistantes na placa de petri com BDA, 24 horas antes da inoculação do *Bacillus* no centro da

placa. Para cada isolado foram preparadas placas em duplicatas. As placas foram incubadas em estufa à 28°C por sete dias. Após este período, foram medidos os halos de inibição do crescimento em cada isolado em relação ao fungo fitopatogênico.

4.5 Avaliação da Produção da Enzima ACC Desaminase

Para estimativa da produção de aminociclopropano carboxilato (ACC) desaminase utilizou-se o método descrito por Lucon, Akamatsu e Harakava (2008), onde a capacidade de crescimento dos isolados, em presença de ACC, foi verificada em meio líquido pela incubação por 48h a 27°C, sob agitação constante. Foi utilizado um meio mínimo, com adição de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) como única fonte de N (GLICK et al. 1995), com a seguinte composição: 4 g de KH₂PO₄, 10 mg de H₃BO₄, 6 g de Na₂HPO₄, 10 mg de MnSO₄.7H₂O, 0,2 g de MgSO₄.7H₂O, 70 mg de ZnSO₄, 1 mg de FeSO₄.7H₂O, 50 mg de CuSO₄, 2 g de glicose, 10 mg de MoO₃, 2 g de ácido glucônico, 2 g de ácido cítrico, 3 mM de ACC e 1 L de água destilada. Foram feitas duas repetições para cada isolado. A avaliação final foi realizada pela medição do crescimento bacteriano utilizando-se da leitura de absorbância a 595 nm em espectrofotômetro (ROMEIRO, 2007), por comparação da leitura final (48 horas) com a do tempo zero.

4.6 Teste de Solubilização de Fosfato

A avaliação dos isolados quanto à solubilização de fosfato foi realizada de acordo com o método descrito por Chagas Jr. (2010) utilizando-se meio líquido GL, contendo 10 g de glicose, 2g de extrato de levedura, suplementado com 3 g de fosfato de arad. Após a inoculação dos isolados no meio de cultura o material ficou sob agitação constante no período de 7 dias. Logo após foi retirado 1 mL da solução e centrifugado por 10 min a 9000 RPM, sendo que ao sobrenadante foi adicionado 2ml do reagente de molibdato de sódio. Foram feitas duas repetições para cada isolado. A avaliação da solubilização de fósforo pelos isolados foi feita pela medida de absorbância da solução a 670 nm em espectrofotômetro.

4.7 Determinação de Produção de Amônia pelos Isolados

Foi utilizado o método do reagente de Nessler para análise de produção de NH_3 . O mesmo foi preparado dissolvendo 100 g de iodeto de mercúrio (II) e 70 g de iodeto de potássio em 100 mL de água isenta de amônia, adicionando-se uma solução fria de 160 g de NaOH em 700 mL de água destilada e elevando a solução para um volume de 1L. As bactérias cresceram em meio líquido (caldo nutriente), após 24 de incubação foi colocado o reagente de Nessler. Na presença de amônia forma-se um precipitado amarelo-acastanhado. Quanto maior a concentração das substâncias analisadas aumenta a intensidade da cor. O resultado foi obtido efetuando-se a leitura da absorbância (540 nm) em um espectrofotômetro, sendo o ensaio realizado em duplicata para cada isolado (MARIANO; SILVEIRA, 2005).

4.8 Ensaio para Avaliação de Produção do Hormônio AIA (Acido Indol Acético)

Para avaliação dos isolados de *Bacillus* sp. quanto ao potencial de produção de AIA foi conduzido bioensaio descrito originalmente por Tang e Bonner (1947) onde as bactérias foram cultivadas em 50 mL de meio líquido TSB (Trypticase Soy Brooth) suplementado com 10 g L^{-1} de dextrose, 5 g L^{-1} de extrato de levedura e 5mM de L-triptófano (1000 ug mL^{-1}). Os isolados foram mantidos a 28° C , no escuro sob agitação constante, durante 24 horas. Após este período, foram centrifugados a $10000 \times \text{g}$ durante 10 minutos, para a obtenção do sobrenadante. A quantidade de AIA por mL de cultura foi estimada através da mistura de 5 mL de reagente de Salkowski (EHMANN, 1977) com 1 mL do sobrenadante da cultura, seguido da leitura da absorbância em 500 nm, após 30 minutos. O ensaio foi realizado em duplicata para cada isolado. A concentração de AIA no meio de cultura foi determinada pela comparação com uma curva padrão determinada previamente com concentrações conhecidas do fitoregulador.

4.9 Experimento para Avaliação de Promoção de Crescimento de eucalipto

Todos os 127 isolados de *Bacillus* que foram caracterizados bioquimicamente foram utilizados no experimento final de casa de vegetação para avaliação da promoção do crescimento do eucalipto. O cultivo das plantas foi realizado em vasos plásticos com 5 kg de solo coletado em área agrícola, o qual apresentou os seguintes parâmetros de fertilidade pH (CaCl₂)= 5,5; Al (mmolc dm⁻³) = 0; Mat.orgânica (g dm⁻³)= 12; P (mg dm⁻³) = 4,5; K (mmolc dm⁻³)= 2,3; Ca (mmolc dm⁻³) = 23,2; e V(%)= 65,8. Foram utilizadas no experimento mudas clonais de *Eucalyptus Urograndis* com 60 dias de idade com altura média de 20 cm. As bactérias foram inoculadas na ocasião do plantio das mudas sendo adicionado, próximo das raízes, 0,1 mL de suspensão bacteriana contendo cada isolado na concentração de 1,0.10⁸ células por mL. A suspensão bacteriana foi obtida pela raspagem de células multiplicadas previamente em tubos com meio de cultura sólido (NA). A calibração da concentração de bactérias foi realizada com auxílio do método colorimétrico em espectrofotômetro (ROMEIRO, 2007).

As plantas foram cultivadas durante 90 dias com reposição periódica de umidade do solo. Ao final do experimento as plantas foram coletadas e as raízes foram lavadas em água corrente para remoção do solo aderido, separando-se o sistema radicular da parte aérea das plantas. Posteriormente foi avaliada a massa seca das raízes e parte aérea das plantas, após secagem em estufa a 60°C até 4 obtenção de massa constante. Foi avaliada também a altura das plantas medida desde o início do caule até o ápice e o diâmetro do caule, tomada a 2 cm de altura do solo.

O experimento em casa de vegetação foi implantado em blocos inteiramente causalizados com quatro repetições, cada parcela foi representada por uma planta.

4.10 Análises Estatísticas

No estudo das variáveis bioquímicas analisadas nos isolados bacterianos foram utilizados histogramas com distribuição da frequência em seis

intervalos pré-definidos, visando avaliar o agrupamento dos isolados nas diferentes classes.

Os dados obtidos no experimento de casa de vegetação foram analisados estatisticamente pelo programa Sisvar com determinação do valor de F e quando o mesmo foi significativo utilizou-se o teste Scott Knott para comparação de médias. Foi utilizado também o programa Sigmaplot para efetuar a correlação de Pearson entre as variáveis bioquímicas e de crescimento das plantas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização dos 127 isolados bacterianos quanto ao antagonismo fúngico mostrou que aproximadamente 85 % dos isolados apresentaram pouca ação para inibir o crescimento do fungo *Aspergillus niger* utilizado com referência neste critério (Figura 2). Esses isolados ficaram agrupados na menor classe de inibição, próxima de zero (0 - 0,6 cm). De acordo com Araujo et al. (2011), em trabalho de bioprospecção de rizobactérias promotoras de crescimento em alface foi constatado que o antagonismo da rizobactéria a um fungo fitopatogênico é importante critério de avaliação para ser utilizado nos programas de seleção de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas.



FIGURA 2 – Distribuição de frequência da capacidade de antagonismo de 127 isolados bacterianos a *Aspergillus niger*.

A avaliação da atividade da enzima ACC desaminase revelou que aproximadamente 78% dos isolados foram agrupados na classe de menor expressão dessa atividade (Figura 3). Marques et al. (2010) em avaliação de isolados bacterianos para promoção de crescimento em milho encontraram atividade significativa da ACC desaminase em 50% dos isolados.

A produção da enzima ACC desaminase por rizobactérias ajuda a manter o crescimento e desenvolvimento de plantas sob condições de estresse, mesmo durante as infecções causadas por fitopatógenos (SALEEM et al., 2007).

Essa enzima tem por função catalisar a clivagem hidrolítica do ACC, molécula precursora do etileno, o que causa diminuição no seu nível e, por consequência, maior crescimento das raízes (GLICK et al., 1998).



FIGURA 3 – Distribuição de frequência da capacidade de crescimento dos 127 isolados bacterianos, em meio mínimo, com adição de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC).

Quanto ao potencial para solubilização de fosfatos encontrado nos isolados verificou-se que a maioria apresentou baixos valores detectados pela leitura espectrofotométrica (FIGURA 4). Poucos isolados foram classificados nas classes de maior potencial nesta característica avaliada.

Uma parcela importante das rizobactérias é capaz de solubilizar fosfatos inorgânicos permitindo a liberação de fósforo assimilável pelas plantas (SILVA FILHO, 1998). Sendo possível utilizar tais microrganismos como inoculante, já que podem maximizar o desenvolvimento das plantas (SAHIN; ÇAKMAKÇI; KANTAR et al., 2004); (SOUCHIE et al., 2005).



FIGURA 4 – Distribuição de frequência da capacidade de solubilização de fosfatos em 127 isolados bacterianos.

Na Figura 5 é apresentado o desempenho dos isolados quanto a produção de amônia. Observou-se que apesar da maioria dos isolados aparecerem como positivos nesse quesito poucos foram frequentes nas classes de maiores valores. Marques et al. (2010) também detectaram a produção de amônia em todos os isolados bacterianos avaliados para promoção do crescimento em milho. Esses autores também afirmaram que a capacidade das espécies bacterianas na produção de amônia também colabora para o crescimento das plantas. A amônia além de ser uma forma assimilável de N, pode ser mineralizada por alguns microrganismos como metabólito secundário e é um composto tóxico a diferentes seres vivos com efeito direto contra fitopatógenos (MACAGNAN; ROMEIRO; POMELLA, 2009).



FIGURA 5 - Distribuição de frequência da capacidade de produção de amônia em 127 isolados bacterianos.

Todos os isolados bacterianos avaliados foram considerados positivos no ensaio de produção de auxinas (Figura 6). Aproximadamente 85% dos isolados foram classificados nos dois primeiros grupos de frequência com valores percentuais semelhantes. De acordo com Glick et al. (1995) cerca de 80% de isolados de rizobactérias provenientes do solo são hábeis para produzir auxinas. Contudo, Teixeira et al. (2007) relataram que em seleção de isolados promissores para estimulação de enraizamento em eucalipto apenas 20% produziram auxinas *in vitro* e ainda em baixas concentrações.

A produção de concentrações maiores de AIA pode ter efeito negativo sobre o crescimento e até atuar como um herbicida como o 2,4,diclorofenilacético (2,4-D) uma conhecida auxina sintética (TAIZ; ZEIGER, 2004).

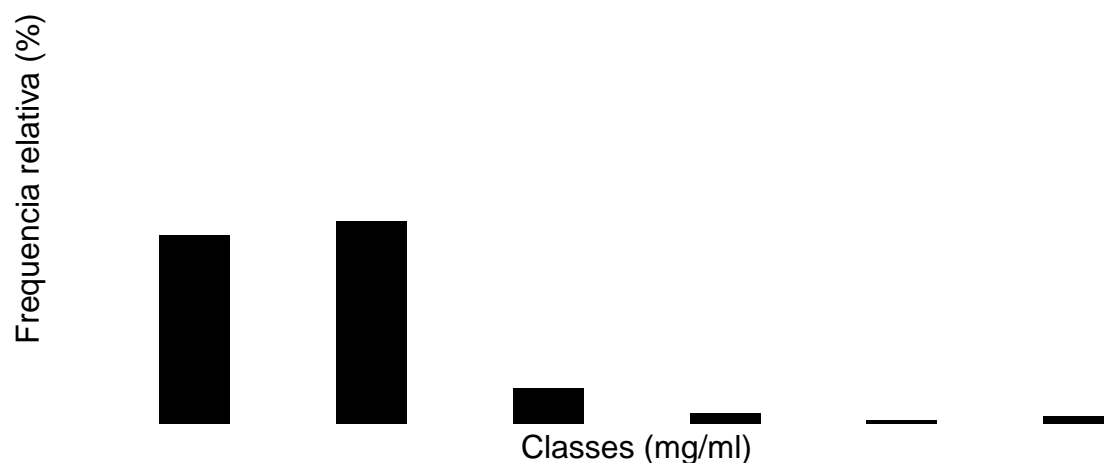


FIGURA 6 – Distribuição de frequência da capacidade de produção auxinas em 127 isolados bacterianos.

No resumo da análise de variância da avaliação de crescimento das plantas (Tabela 1), encontrou-se que apenas a variável massa seca da parte aérea proporcionou valores de F significativo ($p < 0,05$). Observou-se também na variável massa seca da raiz a ausência de significância na avaliação aos 90 dias após a inoculação das bactérias. A avaliação do enraizamento das plantas tem sido priorizada em alguns estudos de inoculação de rizobactérias em eucalipto, entretanto estes experimentos têm sido realizados em períodos menores de 20 a 25 dias após a inoculação das rizobactérias (MAFIA et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2007). Desta forma pode ter ocorrido estímulo ao enraizamento das plantas no início do experimento, mas esta ação pode não ter sido destacada aos 90 dias após a inoculação.

TABELA 1 - Resumo da análise de variância com valores obtidos pelo teste F nas seguintes variáveis: altura, diâmetro do caule, massa seca parte aérea e massa seca das raízes de eucalipto inoculado com rizobactérias.

Fonte de variação	Altura (cm)	Diâmetro (cm)	Massa seca da parte aérea (g por planta)	Massa seca da raiz (g por planta)
Tratamento	1,08	1,16	2,75*	1,29
C.V. (%)	11,21	15,82	31,56	24,20

*Significativo a 5% de probabilidade **significativo a 1% de probabilidade

Dos 127 isolados avaliados dentro da variável produção de massa seca das plantas, 15 apresentaram potencial para promoção do crescimento do eucalipto (Tabela 2). Pode ser observado também que dentro deste grupo de cinco isolados (s32, s24, s31,s13, e s25) verificou-se desempenho significativamente maior que os outros na promoção de crescimento do eucalipto. Esses isolados também são originários da rizosfera de plantas coletadas na mesma localidade (Sandovalina).

Verificou-se que os isolados bacterianos mais promissores proporcionaram aumentos da ordem de 53 a 167% na produção de massa seca na parte aérea de *Eucalyptus urograndis* clonados, quando comparado ao controle. Em estudo semelhante Diaz et al. (2009) encontraram 32 estirpes de *Bacillus spp* em 132 estirpes avaliadas, com ação de aumento da ordem de 69 a 191% no enraizamento de *Eucalyptus globulus* clonado. Aumentos da biomassa da ordem de 44% foram encontrados como resultado da inoculação de *Bacillus megaterium* em experimento com mudas de *Eucalyptus sp.* em vasos (LUCY; REED; GLICK, 2004). Em estudo de isolamento e seleção de rizobactérias em *Pinus taeda* concluiu-se que entre as 99 rizobactérias testadas apenas seis foram selecionadas por promoverem ganhos que variaram de 10 a 16% no crescimento das plantas (BRUNETTA et al., 2010).

TABELA 2 – Avaliação de produção de massa seca ((MS) g pl⁻¹) da parte aérea de eucalipto inoculado com 127 isolados de rizobactérias.

Isolados	MS	Isolados	MS	Isolados	MS	Isolados	MS
v128	4,95c	v211	7,36c	v214	8,37c	s14	9,19c
v325	5,26c	s46	7,37c	pp33	8,39c	t22	9,23c
v413	5,39c	t12	7,38c	pp31	8,41c	it23	9,25c
ie23	5,48c	v115	7,45c	m23	8,42c	s41	9,31c
v322	5,62c	s11	7,46c	ie25	8,45c	m32	9,33c
ie24	5,94c	ie14	7,49c	v114	8,46c	pp15	9,36c
v315	6,13c	pp25	7,62c	v113	8,57c	en13	9,37c
v122	6,15c	v111	7,64c	v314	8,60c	pp12	9,43c
en11	6,31c	s25	7,64c	en21	8,61c	v422	9,54c
v412	6,32c	v312	7,64c	ie21	8,65c	t11	9,57c
v213	6,37c	v112	7,75c	it31	8,68c	m21	9,70c
v411	6,40c	m11	7,79c	en12	8,72c	it21	9,74c
v323	6,45c	m33	7,80c	s44	8,73c	en15	9,77c
v321	6,54c	v424	7,83c	it22	8,77c	it26	9,85c
en24	6,54c	m34	7,85c	m13	8,77c	v421	9,94c
v423	6,57c	pp11	7,85c	ie11	8,77c	ie15	9,94c
en25	6,60c	m12	7,86c	s12	8,81c	s42	10,40c
v215	6,65c	v127	7,87c	v313	8,82c	s33	11,00b
v415	6,68c	pp22	7,87c	v116	8,83c	v311	11,25b
ie22	6,73c	t31	7,89c	m31	8,86c	pp24	11,60b
v125	6,90c	t32	7,92c	it12	8,87c	s22	11,73b
t14	6,91c	pp14	7,95c	m22	8,87c	pp34	11,93b
t13	6,92c	pp13	7,95c	t21	8,89c	pp35	12,39b
en22	7,05c	en23	7,95c	pp23	8,91c	pp21	12,68b
it27	7,06c	t33	7,95c	pp32	8,91c	s23	13,41b
v324	7,08c	ie12	8,06c	v414	9,03c	s15	13,75b
s45	7,16c	s34	8,09c	v425	9,06c	s21	14,11b
ie13	7,21c	it11	8,12c	v426	9,07c	s32	14,64a
ie26	7,21c	v123	8,16c	it25	9,10c	s24	15,68a
Testemunha	7,25c	it24	8,24c	v126	9,11c	s31	15,72a
s43	7,27c	v212	8,26c	t23	9,13c	s13	16,30a
v124	7,36c	it32	8,35c	en14	9,17c	s25	19,17a

Letras iguais na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-knott a 5% de significância.

Com relação à interação entre características bioquímicas encontrados nos isolados bacterianos e efeito sobre o crescimento das plantas encontrou-se que a ação de antagonismo a fungo e a produção de amônia foram as variáveis bioquímicas que apresentaram correlações significativas com a maioria dos parâmetros de crescimento das plantas (Tabela 3). Houve correlação positiva significativa a 1% de característica de antagonismo das rizobactérias com a massa seca da raiz de eucalipto.

TABELA 3 - Correlação de Pearson entre variáveis de crescimento e características bioquímicas nas rizobactérias promotoras de crescimento de eucalipto selecionadas neste estudo.

Fontes de variação	ACC desaminase	Fosfatase	Antagonismo	Produção de amônia	AIA
Massa seca parte aérea	-0,228	-0,253	0,305*	0,035	-0,061
Massa seca raiz	-0,181	0,076	0,689**	0,075	-0,083
Diâmetro do caule	0,081	0,190	-0,122	0,353*	-0,071
Altura da planta	-0,360*	0,205	0,426*	0,382*	0,281

* e **Significativo a 5% e 1% de probabilidade, respectivamente.

A maioria dos trabalhos com a utilização de isolados do gênero *Bacillus* na agricultura tem sido relacionado ao controle biológico de fungos fitopatogênicos (BETTIOL, 1991) o qual tem sido atribuído com frequência à produção de antibióticos (PHAE; SHODA, 1991; ARAUJO et al., 2005). A produção de antibióticos em rizobactérias tem sido correlacionada com a eficiência de biocontrole em alguns estudos (FENTON et al., 1992). Contudo Mafia et al. (2009) relataram que nem sempre a produção de antibióticos pode correlacionar com a eficiência de biocontrole. Sobre isto, em estudo de biocontrole de fungos causadores de podridão em eucalipto foi encontrado que o isolado de melhor desempenho não se caracterizou como de maior antagonismo dos fungos *in vitro*. Por outro lado, Cunha (2006), comprovou que isolados de rizobactérias inibem o crescimento “in vitro” de bactérias fitopatogênicas ao *Eucalyptus* spp., além de promoverem aumento no crescimento do sistema radicular e parte aérea dessa espécie.

Outro aspecto importante a mencionar é a possibilidade da inoculação de *Bacillus subtilis* no substrato de mudas induzir resistência a doenças como a ferrugem do eucalipto (PEREIRA et al., 2008).

A produção de amônia por rizobactérias pode estar relacionada principalmente a dois processos: o primeiro seria a fixação biológica de N atmosférico, onde o N₂ é transformado em amônia e o segundo seria a produção de amônia pela degradação do N orgânico no solo (RICHARDSON, 2009). A inoculação de rizobactérias como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Azospirillum* pode aumentar o crescimento das plantas como resultado da capacidade de disponibilizar nitrogênio para as plantas (JOSEPH et al., 2007). Foi comprovado que a ação de produção de amônia pelos isolados bacterianos correlacionou-se significativamente com a altura e diâmetro do caule das plantas (Tabela 3).

A utilização de parâmetros bioquímicos para seleção de rizobactérias promotoras de crescimento pode ser uma alternativa útil para diminuir o número de isolados a serem avaliados em experimentos com plantas. Dessa forma, pode ser utilizado, dependendo de cada caso, características que apresentem correlação significativa com o crescimento das plantas como critério classificatório para os isolados.

A ocorrência de espécies do gênero *Bacillus* no solo sob *Eucalyptus* sp. poderia indicar uma afinidade com a rizosfera desse tipo de árvore, já que este gênero aparece mais na rizosfera dessa cultura do que no solo sob mata (PEREIRA et al., 2008). Segundo Teixeira (2007) alguns isolados bacterianos avaliados como promotores de crescimento de plantas apresentaram especificidade ao clone de eucalipto empregado, indicando que os isolados que promovem o crescimento de uma espécie de planta pode ser ineficaz em outros.

Os isolados de rizobactérias que foram selecionadas como promotores de crescimento do eucalipto devem ser melhores estudados quanto as suas características genéticas. Sendo necessários novos estudos a partir da identificação desses isolados bacterianos para uso futuro como inoculantes no cultivo do eucalipto.

6 CONCLUSÕES

O protocolo de bioprospecção de isolados de *Bacillus* sp. no solo foi válido para se encontrar rizobactérias promissoras para o crescimento de *Eucalyptus urograndis*.

Foram selecionados cinco isolados como promissores para ação no crescimento de *Eucalyptus urograndis*.

O potencial antagônico a fungos fitopatogênicos encontrados nos isolados de rizobactérias foi útil na fase inicial de seleção de rizobactérias promotoras do crescimento de eucalipto, pois apresentou correlação significativa com o crescimento das plantas.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A.C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa, MG: UFV, 2004.
- ALFENAS, A.C.; ZAUZA, E.A.V. **Clonagem e algumas doenças de *Eucalyptus* em viveiro e campo**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatístico 2012**. Disponível em: <http://www.abraflor.org.br/estatisticas/ABRAF12/ABRAF12-BR.pdf>. Acesso: 30 mar 2012.
- ARAUJO, F.F. et al. Produção de auxinas, fosfatases e antagonismo a fitopatógeno por rizobactérias e correlação com o crescimento da alface. In: congresso Brasileiro de ciências do solo, 33, 2011, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia, Center convention 2011. 1 CD.
- ARAUJO, F.F. ***Bacillus subtilis* no controle biológico de doenças e crescimento de plantas**. In: ARAUJO, A.S.F. et al. Matéria orgânica e organismos do solo. Teresina: EDUFPI, 2008.
- ARAUJO, F.F. et al. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.21, p.1639-1645, 2005.
- BETTIOL, W. Isolamento seletivo de *bacillus*. IN: MELO, I.S.; SANHUEZA, R.M.V. (coords). Métodos de seleção de microrganismos antagonísticos a fitopatógenos. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1995. p.35-36.
- BRUNETTA, J.M.F.C. et al. Isolamento e seleção de rizobactérias promotoras do crescimento de *Pinus taeda*. **Revista Árvore**, vol.34, n.3, p. 399-406, 2010.
- BUCHANAN, R.E.; GIBBONS, N.G. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 8. ed. Baltimore: Willians & Wilkens, 1975.
- BURD, G.I.; DIXON, D.G.; GLICK, B.R. A plant growthpromoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. **Applied and Environmental Microbiology**. v.64, p.3663–3668, 1998.
- CHAGAS JR, A.F. et al. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, p. 359-366, 2010.
- CHANWAY, C.P.; TURKINGTON, R.; HOLL, F.B. Ecological implications of specificity between plants and rhizosphere microorganisms. **Advances in Ecological Research**, v.21, p.121-169, 1991.
- CHENG, Z.; PARK, E.; GLICK, B.R. 1-Aminocyclopropane-1- carboxylate deaminase from *Pseudomonas putida* UW4 facilitates the growth of canola in the presence of salt. **Canadian Journal of Microbiology**, v.53, p.912–918, 2007.

CHRISTOU, M. et al. Dissolved organic nitrogen in contrasting agricultural ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, v.37 p.1560–1563, 2005.

COELHO, L.F. et al. Interação de bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas* e de *Bacillus* spp. com a rizosfera de diferentes plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.31, p. 1413-1420, 2007.

CUNHA, J.F. et al. Efeito "in vitro" de antibióticos e rizobactérias no controle de bactérias fitopatogênicas ao *Eucalyptus* spp. **Revista Árvore**, Viçosa, v.30, n.6, dez. 2006.

DANTAS, J.S. et al. Interações entre grupos de microrganismos com a rizosfera. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v.2, n.2, 2009.

DATTA, M.; BANIK, S.; GUPTA, K. Studies on the efficacy of a phytohormone producing phosphate solubilizing *Bacillus firmus* in augmenting paddy yield in acid soils of Nagaland. **Plant and Soil**, v.69, p.365-373, 1982.

EHMANN, A. The van urk – salkowski reagent- a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives. **Journal of chromatography**, v. 132, p. 267-276, 1977.

FARWELL, A.J. et al. Tolerance of transgenic canola plants (*Brassica napus*) amended with plant growth-promoting bacteria to flooding stress at a metal-contaminated field site. **Environmental Pollution**, v.147 p.540– 545, 2007.

FENTON, A.M. et al. Exploitation of gene(s) involved in 2,4- diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capacity to *Pseudomonas* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p.3873-3878, 1992.

FERREIRA, F.L. *Bacillus subtilis* e níveis de nitrogênio sobre o desenvolvimento e a produtividade do milho. 2010, 54 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - UFPI/CCA, Teresina.

FREITAS, J.R.; BANERJEE, M.R.; GERMIDA, J.J. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). **Biology and Fertility of Soils**, v.24, p.358-364, 1997.

GALDIANO JR, R.F. **Isolamento, identificação e inoculação de bactérias produtoras de auxinas associadas às raízes de orquídeas**. Disponível em: <http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/gmp/m/3614.pdf>. Acesso em: 10 set 2011.

GLASS, A.D.M. **Plant nutrition: an introduction to current concepts**. Boston, MA: Jones and Bartlett Publishers, 1989.

GLICK, B.R. et al. Promotion of plant growth by bacterial ACC desaminase. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.26, p.227–242, 2007.

- GLICK, B.R.; PENROSE, D.M.; LI, J. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. **Journal of Theoretical Biology**, v.190, p.63-68, 1998.
- GLICK, B.R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 109–117, 1995.
- GLICK, B.R. et al. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR 12-2 do not stimulate canola root elongation. **Canadian Journal of Microbiology**, v.40, p.911-915, 1994.
- GRICHKO, V.P. ; GLICK, B.R. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. **Plant Physiology and Biochemistry**. v.39, p.11–17, 2001.
- HARMAN, G.E. et al. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. **Nature Reviews – Microbiology**, v.2, p. 43-55, 2004.
- HARTMANN, A.; ROTHBALLER, M.; SCHMID, M. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. **Plant and Soil**, v.312, p.7-14, 2008.
- HINSINGER, P. et al. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. **Plant Soil**, v.248, p.43–59, 2003.
- JACKSON, L.E.; BURGER, M.; CAVAGNARO, T.R. Roots, nitrogen transformations, and ecosystem services. **Annual Review of Plant Biology**, v.59, p.341–363, 2008.
- JAEGER, C.H. et al. Seasonal partitioning of nitrogen by plants and soil microorganisms in an alpine ecosystem. **Ecology**, v.80 p.1883–1891, 1999.
- JOSEPH, B.; PATRA, R.R.; LAWRENCE, R.; Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). **International Journal of Plant Production**, v. 2, p. 141-152, 2007.
- KATZ, E.; DEMAINE, A.L. The peptide antibiotics of *Bacillus*: Chemistry, biogenesis and possible functions. **Bacteriological Reviews**, v.41, p.449-474, 1977.
- KERBAUY, G. **Fisiologia vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- KIM, K.Y.; JORDAN, D.; MCDONALD, G.A. Effect of phosphate solubilizing bacteria and vesicular–arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. **Biology and Fertility of Soils**, v.26, p.79–87, 1998.
- KLOEPPER, J.W. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. **Australasian Plant Pathology**, Rockhampton, v. 28, n. 1, p. 21-26, 1999.

LAZZARETI, E.; BETTIOL, W. Tratamento de sementes de arroz, trigo, feijão e soja com um produto formulado a base de células e de metabólitos de *Bacillus subtilis*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 54, p. 89-96, 1997.

LI, D.M.; ALEXANDER, A. Co-inoculation with antibiotic-producing bacteria to increase colonization and nodulation by rhizobia. **Plant and Soil**, v.108, p. 211-219, 1988.

LUCON, C.M.M.; AKAMATSU, M.A.; HARAKAVA, R. Promoção de crescimento e controle de tombamento de plântulas de pepino por rizobactérias. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.6, p. 691-697, 2008.

LUCY, M.; REED, E.; GLICK, B.R. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. **Antonie Leeuwenhoek**, v.86 p. 1-25, 2004.

LUZ, W.C. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas e de bioproteção. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.4, p. 1-49, 1996.

MACAGNAN, D.; ROMEIRO R.S.; POMELLA, A.W.V. Inibição da germinação de basidiósporos de *Crinipellis perniciosus* por compostos voláteis produzidos por cinco actinomicetos residentes de filoplano de cacaueteiro. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.2, p.140-142, 2009.

MAFIA, R.G. et al. Root colonization and interaction among growth promoting rhizobacteria isolates and eucalypts species. **Revista Árvore**, vol.33, n.1, p. 1-9. 2009.

MAFIA, R.G. et al. Efeito de rizobactérias sobre o enraizamento e crescimento de clones de eucalipto em diferentes condições de propagação clonal. **Revista Árvore**, v.31, n.5, p.813-821, 2007.

MARIANO, R.; SILVEIRA, E.B. **Manual de práticas em fitobacteriologia**. 2. ed. Recife: UFRP, 2005.

MARQUES, A.P.G.C. et al. Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant. **Soil Biology and Biochemistry**, v.42, p. 1229-1235, 2010.

MARTINAZZO, R. et al. Fósforo microbiano do solo sob sistema plantio direto em resposta à adição de fosfato solúvel. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, n.3, p. 563-570, 2007.

MELO, I.S. Potencialidades de utilização de *Trichoderma* spp. no controle biológico de doenças de plantas. In: Bettiol, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Campinas: EMBRAPA/CNPDA, 1991. p. 135-156.

MURRAY, P.R. et al. **Microbiologia médica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

OEHL, F. et al. Basal organic phosphorus mineralization in soils under different farming systems. **Soil Biology and Biochemistry**, v.36, p.667–675, 2004.

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

PAUNGFUO-LONHIENNE, C. et al. Plants can use protein as a nitrogen source without assistance from other organisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.105, p.4524–4529, 2008.

PEIXOTO, A.R. Controle biológico da murcha bacteriana do tomateiro, por *Pseudomonas* spp. fluorescentes. **Ciência Rural**, v.27, n.1, p. 153-160, 1997.

PEREIRA, R.M. et al. Avaliação de populações de possíveis rizobactérias em solos sob espécies florestais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.1921-1927, 2008.

PHAE, C.; SHODA, M. Investigation of optimal conditions for separation of iturin an antifungal peptide produced by *Bacillus subtilis*. **Journal of fermentation and bioengineering**, v.71, p. 118-121, 1991.

PRIGENT-COMBARET, C. et al. Physical organization and phylogenetic analysis of *acdR* as leucineresponsive regulator of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene *acdS* in phytobeneficial *Azospirillum lipoferum* 4B and other Proteobacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v.65 p.202–219, 2008.

RAAIJMAKERS, J.M. et al. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. **Plant and Soil**, v.321, p.341-361, 2009.

RAMAMOORTHY, V. et al. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, v.20, p. 1-11, 2001.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; CURTIS, H. **Biologia vegetal**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

RICHARDSON, A.E. Regulating the phosphorus nutrition of plants: molecular biology meeting agronomic needs. **Plant and Soil**. v.322: p.17-24, 2009.

RICHARDSON, A.E. et al. Utilization of soil organic phosphorus by higher plants. In: TURNER, B.L.; FROSSARD, E.; BALDWIN, D.S. (eds). **Organic phosphorus in the environment**. Wallingford: CAB International, 2005. p.165-184.

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

RICHARDSON, A.E. Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28, n.9, p. 897-906, 2000.

RICHARDSON, A.E. Soil microorganisms and phosphorus availability. In: PUNKHURST, C.E.; DOUBE, B.M.; GUPTA, V.V.S.R. (eds.). Soil biota: management in sustainable farming systems. **Commonwealth scientific and industrial research organisation**, 1994. p. 238-244.

ROBBS, C.E. Bactérias como agentes de controle biológico de fitopatógenos. In: BETTIOL, W. **Controle biológico de doenças de plantas**. Campinas: EMBRAPA/CNPDA, 1991. p. 121-133.

ROBIN, A. et al. Iron dynamics in the rhizosphere: consequences for plant health and nutrition. **Advances in Agronomy**, v.99, p.183–225, 2008.

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

ROMEIRO, R.S. **Controle biológico de doenças de plantas**: procedimentos. Viçosa, MG: UFV, 2007.

SAHIN, F.; ÇAKMAKÇI, R.; KANTAR, F. Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N₂-fixing and phosphate solubilizing bacteria. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.265, n.1-2, p.123-129, 2004.

SALEEM, M. et al. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.34, p.635-648, 2007.

SANTOS, P.E.T. O uso da clonagem na silvicultura intensiva. **Silvicultura**, v.15, n.57, p. 28-29, 1994.

SCHIMEL, J.P.; BENNETT, J. Nitrogen mineralization: challenges of a changing paradigm. **Ecology**, v.85, p.591-602, 2004.

SEELING, B.; ZASOSKI, R.J. Microbial effects in maintaining organic and inorganic solution phosphorus concentrations in a grassland topsoil. **Plant Soil**, v.148, p.277–284, 1993.

SHAND, C.A. et al. Inorganic and organic P in soil solutions from three upland soils. Effects of soil solution extraction conditions, soil type and season. **Plant Soil**, v.159, p.255–264, 1994.

SHISHIDO, M.; CHANWAY, C.P. Storage effects on indigenous soil microbial communities and PGPR efficacy. **Soil Biology and Biochemistry**, v.7, p.939-947, 1998.

SILVA FILHO, G.N. **Solubilização de fosfatos pela microbiota do solo**. 1998. Tese. (Doutorado em Agronomia – Ciência do Solo) – Universidade Federal do Rio

Grande do Sul, Porto Alegre.

SILVA, H.S.A. et al. Induction of systemic resistance by *Bacillus cereus* against tomato foliar diseases under field conditions. **Journal of Phytopathology**, Saint Paul, v.152, p. 371-375, 2004.

SOLANO, B.R.; BARRIUSO, J.; GUTIÉRREZ-MAÑERO, F.J. Physiological and molecular mechanisms of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). In: AHMAD, I.; PICHTEL, J.; HAYAT, S. **Plant-Bacteria Interactions - strategies and techniques to promote plant growth**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2008. p.41-54.

SOUCHIE, E.L.; ABBOUD, A.C.S.; CAPRONI, A.L. Solubilizadores de fosfato in vitro por microrganismos rizosféricos de guandu. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 2, p. 53-60, 2007.

SOUZA, S.R.; FERNANDES, M.S. Nitrogênio. In: FERNANDES, M.S. (Ed). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa-MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 215-252.

SRINIVASAN, M.; PETERSEN, D.J.; HOLL, F.B. Influence of indoleacetic acid producing *Bacillus* isolates on the nodulation of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium etli* under gnotobiotic conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, v.42, n.10, p.1006-1014, 1996.

STEVENSON, F.J.; COLE, M.A. **Cycles of soil carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrientes**. 2. ed. New York: Wiley & Sons, 1999.

SULÇE, S. et al. Study of immobilization and remobilization of nitrogen fertilizer in cultivated soils by hydrolytic fraction. **European Journal of Soil Science**, v.47, n.2, p. 249-255, 1996.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TANG, Y.W.; BONNER, J. The enzymatic inactivation of indole-acetic, acid. **Arch Biochem**, v.13, p. 11-25, 1947.

TEIXEIRA, D.A. et al. Rhizobacterial promotion of eucalypt rooting and growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.1, p. 118-123, 2007.

TEIXEIRA, D.A. et al. Evidências de indução de resistência sistêmica à ferrugem do *Eucalyptus* sp. mediada por rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.350-356, 2005.

YANG, S.F.; HOFFMAN, N.E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 35 p. 155-189 1984.

VESSEY, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v.255, n.2, p. 571-586, 2003.

WALL, G.C.; SANCHEZ, J.L. A biocontrol agent for *Pseudomonas solanacearum*. In: HATMAN, G.L.; HAYWARD, A.C. (Eds). **ACIAR Proceedings...**1993. p. 320-321.

WANG, C. et al. Effect of transferring 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 and its gacA derivative CHA96 on their growth-promoting and disease-suppressive capacities. **Canadian Journal of Microbiology**, p.46 v.898–907, 2000.

WILLIAMS, L.E.; MILLER, A.J. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. **Annual Review Plant Physiology and Molecular Biology**, v. 52, p. 659-688, 2001.

WHITELAW, M. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. **Advances in Agronomy**, v.69, p.99–151, 2000.

WINKLER, L.M. et al. Produção de etileno e atividade da enzima ACCoxidase em frutos de maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, Dec. 2002.

ZAKHAROVA, E.A. et al. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*: insights from quantum chemistry. **European Journal of Biochemistry**, v.259, p.572-576, 1999.

ZEHNDER, G.W. et al. Application of rhizobacteria for induced resistance. **Journal of Plant Pathology**, v.107 p.39–50, 2001.