



Revista Brasileira de Ciência do Solo

ISSN: 0100-0683

revista@sbccs.org.br

Sociedade Brasileira de Ciência do Solo
Brasil

Pereira, Rodrigo Matheus; Silveira, Érico Leandro da; Carareto-Alves, Lúcia Maria; Macedo Lemos,
Eliana Gertrudes de

**AVALIAÇÃO DE POPULAÇÕES DE POSSÍVEIS RIZOBACTÉRIAS EM SOLOS SOB ESPÉCIES
FLORESTAIS**

Revista Brasileira de Ciência do Solo, vol. 32, núm. 5, 2008, pp. 1921-1927

Sociedade Brasileira de Ciência do Solo
Viçosa, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=180214065013>

- ▶ Como citar este artigo
- ▶ Número completo
- ▶ Mais artigos
- ▶ Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

AVALIAÇÃO DE POPULAÇÕES DE POSSÍVEIS RIZOBACTÉRIAS EM SOLOS SOB ESPÉCIES FLORESTAIS⁽¹⁾

Rodrigo Matheus Pereira⁽²⁾, Érico Leandro da Silveira⁽²⁾, Lúcia Maria Carareto-Alves⁽³⁾ & Eliana Gertrudes de Macedo Lemos⁽³⁾

RESUMO

Embora estudos recentes relatatem a utilização de RPCP (Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas) no Brasil, raríssimos trabalhos avaliam a presença natural dessas espécies bacterianas no solo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ocorrência de RPCP em duas amostras de solo sob diferentes tipos de manejo, através da construção e do seqüenciamento de bibliotecas de DNA metagenômico. Utilizaram-se oligonucleotídeos específicos para amplificação da região hipervariável do espaço intergênico dos genes ribossomais 16S-23S de DNA extraído de diferentes solos, sob *Eucalyptus* sp. e sob mata. Os fragmentos obtidos foram inseridos em vetor e clonados. As bibliotecas geraram 495 clones, que foram seqüenciados e identificados através de comparações realizadas pelo software Blast. O solo sob *Eucalyptus* sp. apresentou maior número de RPCP do que sob mata. Os filos *Actinobacteria* e *Proteobacteria* eram maiores no solo sob *Eucalyptus* sp., estando o filo *Firmicutes* ausente no solo sob mata. Somente oito espécies diferentes de RPCP foram detectadas: *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium* sp., *Frankia* sp., *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas gladioli*. O trabalho forneceu valiosos dados sobre a presença de RPCP em solos com espécies florestais e sua possível utilização em reflorestamentos, assim como para o melhor conhecimento desses microrganismos nos solos do Brasil.

Termos de indexação: RPCP, ecologia microbiana, *Eucalyptus* sp., ITS.

⁽¹⁾ Recebido para publicação em outubro de 2006 e aprovado em agosto de 2008.

⁽²⁾ Doutorando do Curso de Microbiologia Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – FCAV/UNESP, Rod. Paulista Dom Pedro, Castanheira s/n, CEP 14884-000, Ibaté (SP). E-mail: rmpereira@fcav.unesp.br

**SUMMARY: EVALUATION OF POSSIBLE RHIZOBACTERIA POPULATIONS
IN SOILS UNDER FOREST SPECIES**

Although new studies describe the use of PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) in Brazil, they rarely evaluate the natural existence of these bacterial species in the soil. The objective of this study was to evaluate PGPR in two samples under different use types, one with native forest and the other with eucalyptus, through construction and sequencing of a metagenomic DNA library. Using specific probes from the internally transcribed region of 16S-23S rRNA genes, fragments of PCR products were inserted into the vector and cloned. The library generated 495 clones, which were sequenced and identified using Blast software. A greater number of PGPR was found in the soil under eucalyptus than under forest. Actinobacteria and Proteobacteria phyla were more abundant in Eucalyptus sp soil, and the phylum Firmicutes was not found in forest soil. Only eight different species were detected: Bacillus subtilis, Bacillus megaterium, Bradyrhizobium japonicum, Bradyrhizobium elkanii, Bradyrhizobium sp., Frankia sp., Pseudomonas fluorescens and Pseudomonas gladioli. This study provided valuable information about PGPR in soils under forest species and their possible use in reforestation, as well as for a more detailed understanding of these microorganisms in Brazilian soils.

Index terms: PGPR, microbial ecology, Eucalyptus sp., ITS.

INTRODUÇÃO

Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) representam uma ampla variedade de bactérias do solo, que, em associação com as plantas hospedeiras, resultam na estimulação de seu crescimento.

Estudos recentes relatam a utilização de RPCP no Brasil (Amorim et al., 2002; Freitas et al., 2004, Sottero et al., 2006), entretanto apenas um pequeno número envolve RPCP em árvores, geralmente em *Eucalyptus* sp. e pinus (Germano et al., 2002; Teixeira et al., 2005) e com enfoque no controle de fitopatógenos. Um amplo estudo de árvores e de RPCP poderia beneficiar o setor florestal e o reflorestamento em diferentes regiões (Lucy et al., 2004). Além disso, o setor florestal constitui um importante segmento econômico no país, ocupando lugar de destaque no PIB brasileiro. Em 2001 contribuiu com 4 bilhões de dólares em exportações (Juvenal et al., 2002). Sendo assim, o estudo com RPCP em florestas torna-se de grande importância.

Há poucos grupos de pesquisadores trabalhando na área de RPCP em espécies florestais e, como consequência, há pouco ou nenhum dado para o uso dessas bactérias no desenvolvimento de árvores decíduas e menos ainda para árvores coníferas (Chanway, 1997).

As pesquisas de RPCP em solo sob floresta são bem menos comuns do que as ocorridas em aplicações na agricultura (Lucy et al., 2004). Ao longo da década de 80, o foco dos estudos de RPCP em espécies florestais era voltado para espécies exóticas, mas durante a década

Embora algumas árvores se desenvolvam facilmente, muitas apresentam dificuldades de crescimento e estabelecimento até que se tornam adultas, quando podem ser altamente beneficiadas por uma inoculação com RPCP (Zaady & Perevolotsky, 1995).

A especificidade de bactérias para a inoculação de espécies florestais parece ser similar à observada em sementes agrícolas (Enebak et al., 1998; Shishido & Chanway, 2000). Ecótipos ou árvores da mesma espécie de diferentes regiões ou altitudes, também exibem diferentes respostas à inoculação bacteriana (Chanway, 1995).

Há uma ampla faixa de estirpes bacterianas, como *Bacillus polymixa*, que consistentemente promove o crescimento de muitas variedades de pinus e outras espécies de árvores (Holl, 1992; Chanway, 1995). É interessante notar que esta estirpe bacteriana é originalmente isolada de grama perene e não de uma espécie florestal (Holl & Chanway, 1992).

O objetivo deste trabalho foi verificar a ocorrência de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RCPC), em amostras de solo sob diferentes tipos de manejo.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de material

As amostras de um Latossolo Vermelho fértil, da localidade, em 2002, foram obtidas

AVALIAÇÃO DE POPULAÇÕES DE POSSÍVEIS RIZOBACTÉRIAS EM SOLOS SOB ESPÉCIES...

Brasil), cujas coordenadas geográficas são: latitude 21° 17' 05" S e longitude 48° 17' 09" L e altitude em torno de 590 m. A primeira coleta foi realizada em uma área com mata nativa, não alterada pelo homem e caracterizada pela presença de sub-bosque rico em arbustos. O outro solo foi coletado em uma área de arboreto de *Eucalyptus* sp., plantado em fevereiro de 1969, que não sofreu trato cultural desde então. De cada solo, foram coletadas doze amostras simples ao acaso, na profundidade de 0–20 cm, abrangendo toda a área. As amostras de cada solo foram reunidas e homogeneizadas, resultando em duas amostras compostas, que foram utilizadas para a extração do DNA metagenômico. Os resultados das análises químicas e granulométricas dos solos das duas áreas são apresentados no quadro 1. A normal de precipitação pluvial da localidade é de 1.408,7 mm nos últimos trinta anos, e a temperatura média anual é de 22 °C, sendo a média das mínimas 12 °C e das máximas 32 °C (Fonte: Estação Agroclimatológica – UNESP – Campus Jaboticabal).

Extração de DNA metagenômico, PCR de amplificação e purificação dos amplicons do espaço intergênico da região 16S-23S rRNA (ITS)

A extração do DNA da comunidade microbiana do solo (DNA metagenômico) foi realizada utilizando FastDNAR Spin Kit para solo (Bio 101 – catálogo #6560-200) conforme as instruções do fabricante.

O DNA metagenômico foi usado na amplificação do espaço intergênico (ITS) 16S–23 S rRNA genes por PCR de acordo com Laguerre et al. (1996). As amostras foram então colocadas em um termociclador, e o seguinte programa foi usado: um ciclo a 94 °C e submetidas a 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, e 72 °C por 30 s, mais uma extensão final de 1 ciclo a 72 °C por 5 min.

Quadro 1. Resultados de análises químicas e granulométricas do Latossolo Vermelho de mata nativa (SMN) e arboreto com *Eucalyptus* sp. (SE)

Característica	SMN	SE
pH (CaCl ₂)	6,2	5,5
Matéria orgânica (g dm ⁻³)	75	61
P (mg dm ⁻³)	63	17
K (mmol _c dm ⁻³)	2,9	4,8
Ca (mmol _c dm ⁻³)	410	49
Mg (mmol _c dm ⁻³)	80	40
H + Al (mmol _c dm ⁻³)	15	28
Argila (g kg ⁻¹)	430	440
Limo (g kg ⁻¹)	256	120
Areia Fina (g kg ⁻¹)	130	180

Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose e brometo de etídeo (EBAGE) e eluídos do gel pela adição de NaCl 1 mol L⁻¹ fenol e clorofórmio (Sambrook & Russell, 2001).

Clonagem e seqüenciamento do ITS

Os amplicons do espaço intergênico 16S-23S rRNA de ambas as amostras de solo foram inseridas dentro do pGEM®-T vector (Promega, Madison, WI, USA, catalog # A3600) de acordo com instruções do fabricante, e usados para transformar células *Escherichia coli* estirpe DH5a. Bactérias transformadas foram cultivadas em meio LB contendo ampicilina (50 µg mL⁻¹) e os clones selecionados em 1 mL de meio CG CircleGrow (Bio 101 – catálogo 3000-142) também com ampicilina (50 µg mL⁻¹). O cultivo dos clones ocorreu por 22 h a 37 °C e 220 rpm.

O DNA plasmidial dos clones selecionados foi isolado por miniprep ((Sambrook & Russell, 2001) e purificado usando plates MultiScreen (Millipore, catalog # MAGVN2250). O material obtido foi quantificado por EBAGE usando gel de agarose em tampão TBE (Tris 89 mM; Ácido Bórico 89 mM; EDTA 2,5 mM, pH 8,3) contendo brometo de etídeo (0,5 µg mL⁻¹), e visualizado em um fotodocumentador Gel Doc 1000, com luz UV (Bio Rad, Richmond, CA, USA).

O seqüenciamento dos fragmentos ITS inseridos nos plasmídeos foi realizado usando 0,4 µL de Sequencing-Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready ABI Prism (Version 3); 3,2 pmols de PUC 1211 forward initiator oligonucleotide (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'); 100 ng de plasmídeo DNA, 4,6 µL de tampão (400 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 10 mM MgCl₂); e H₂O mili-Q (Millipore) para um volume final de 10 µL. A reação foi colocada em um termociclador, MJ Research Inc., modelo PTC-200, com o seguinte programa: 2 min a 96 °C e 40 ciclos de 96 °C por 10 s, 52 °C por 20 s, e 60 °C por 4 min. Os amplicons foram seqüenciados usando o sequenciador capilar modelo ABI 3700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Análise das seqüências

A análise das seqüências foi realizada com o Sequencing Analysis 3.4 e o pacote de programas Phred/Phrap/ConSeq (Gordon et al., 1998), permitindo verificar a qualidade das seqüências e a existência de possíveis seqüências químéricas. Somente seqüências com mais de 400 bases e qualidade Phred acima de 20 foram selecionadas para o auxílio de programa Contgen. Nenhuma seqüência foi descartada pelo programa Contgen. As seqüências de nucleotídeos foram comparadas com seqüências do banco GenBank (acessadas através do NCBI - National Center for Biotechnology Information em 6 de junho de 2002), usando o programa BLAST (Altschul et al., 1990).

Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (<http://lbmp.fcav.unesp.br/metagenoma>), e posteriormente depositadas no GenBank.

Árvores filogenéticas foram construídas com o auxílio dos programas ClustalX (Thompson et al., 1997) para alinhamento global das seqüências e Mega 4 (Tamura et al., 2007) para execução dos cálculos e construção das árvores.

Uma busca no banco de dados metagenômico foi realizada para localizar 58 espécies de rizobactérias citadas na literatura como RPCP (Lucy et al., 2004; Vessey, 2003) pertencentes a quatro filos distintos: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* e *Cyanobacteria* (Vessey et al., 2003; Lucy et al., 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica molecular de análise do ITS (16S-23S rDNA) foi altamente eficiente na determinação das espécies presentes no solo, detectando um total de 233 bactérias no solo sob mata e 262 no solo sob *Eucalyptus* sp.

Das 495 seqüências de ITS analisadas, das bibliotecas, de ambos os solos, 19,6 %, ou seja, 97 seqüências pertencem a um grupo de oito espécies de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas. Os códigos das seqüências (geneids) ITS dessas oito espécies de possíveis RPCP detectadas neste estudo foram depositados no NCBI (AY713465.1, AY713452.1, DQ376549, DQ376546, DQ376547.1, DQ190838.1, DQ190831.1, DQ376548).

Após a comparação das seqüências de rizobactérias de ambos os solos com as seqüências cadastradas no banco internacional de genes (NCBI), foram observadas taxas de similaridade variando de 99 % entre as RPCP. Somente seqüências com mais de 90 % de similaridade com o Genbank foram consideradas o mesmo organismo. Além disso, as seqüências de RPCP observadas estavam distribuídas de forma diferente. Foram encontradas 31 seqüências (6,3 %) dos 495 clones seqüenciados, em solo sob mata e 66 (13,3 %) em solo sob *Eucalyptus* sp.

As noventa e sete seqüências de bactérias promotoras de crescimento detectadas nas bibliotecas de ITS pertencem a quatro gêneros: *Pseudomonas* (com as espécies: *P. fluorescens* e *P. gladioli*), *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. megaterium*), *Bradyrhizobium* (*B. japonicum*, *B. elkanii*, *Bradyrhizobium* sp.) e *Frankia* (Frankia sp.). Além disso, o solo sob *Eucalyptus* sp. apresentou maior número de diferentes RPCP que o solo sob mata (Figura 1). Esse resultado está de acordo com observações anteriores de diversidade de bactérias no solo sob *Eucalyptus* sp., maior do que no solo sob mata (Silveira, 2004; Scaquito, 2004).

Deve-se destacar ainda que as bactérias dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Frankia* foram as que apareceram em maior proporção entre todos os gêneros nos solos analisados, com maiores freqüências no solo sob *Eucalyptus* sp. (Figura 1).

Por outro lado, as espécies *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* e *Pseudomonas gladioli* foram detectadas apenas no solo sob *Eucalyptus* sp., enquanto *Pseudomonas fluorescens* apareceram somente

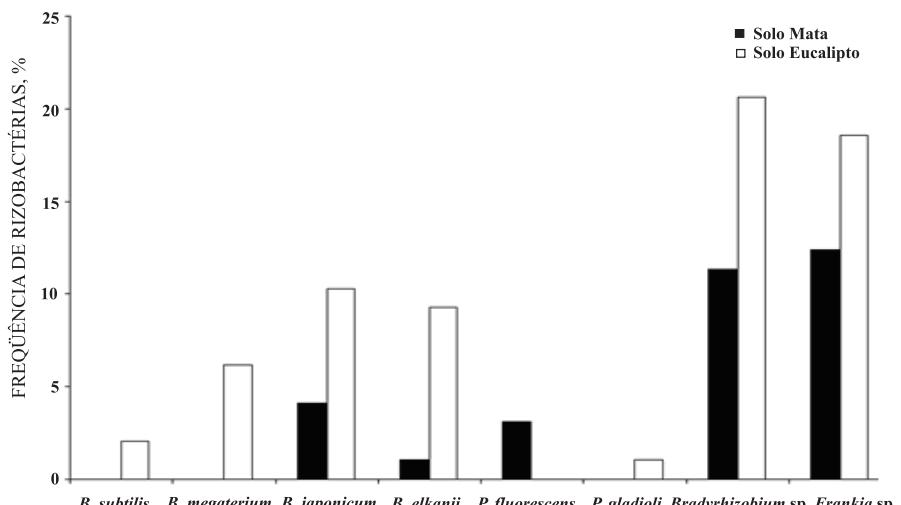


Figura 1. Distribuição de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, observadas nos solos mata e sob *Eucalyptus* sp. *B. subtilis* (*Bacillus subtilis*), *B. megaterium* (*Bacillus megaterium*), *B. japonicum* (*Bacillus japonicum*), *B. elkanii* (*Bacillus elkanii*), *P. fluorescens* (*Pseudomonas fluorescens*), *P. gladioli* (*Pseudomonas gladioli*), *Bradyrhizobium* sp. (*Bradyrhizobium* sp.) e *Frankia* sp. (*Frankia* sp.).

AVALIAÇÃO DE POPULAÇÕES DE POSSÍVEIS RIZOBACTÉRIAS EM SOLOS SOB ESPÉCIES...

solo sob mata (Figura 1). Além de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii*, outras seqüências do gênero *Bradyrhizobium* foram observadas em ambas as bibliotecas, porém com maior freqüência no solo sob *Eucalyptus* sp. O maior aparecimento de *Bradyrhizobium* sp. e *Frankia* sp. nesse solo provavelmente se deve ao fato de muitas bactérias pertencentes a estes gêneros ainda não terem sido classificadas em espécies.

As árvores filogenéticas (Figuras 2 e 3) construídas demonstraram que as bactérias se agruparam de acordo com os filos e classes aos quais pertencem, sendo: *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas gladioli* (Filho: *Proteobacteria*, classe: *Betaproteoacteria*); (Filho: *Firmicutes*) *Bacillus subtilis* e *Bacillus megaterium* (Filho: *Proteobacteria*; classe: *Alphaproteoacteria*) *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium elkanii*, *Bradyrhizobium* sp. e *Frankia* sp. (Filho: *Actinobacteria*).

Os resultados obtidos neste trabalho quanto à freqüência de *Pseudomonas gladioli* e *P. fluorescens* tornam-se interessantes considerando-se que isolados bacterianos de *Pseudomonas* fluorescentes, além de *Bacillus* e outras bactérias rizosféricas, podem agir como promotores do crescimento de espécies cítricas atuando no crescimento da raiz ou no aumento de matéria seca. Embora a promoção de crescimento do vegetal possa ser afetada de acordo com o ambiente onde se encontram apresentando um comportamento instável (Freitas, 2004), pode-se levantar a hipótese

da importância dessas duas rizobactérias no crescimento das espécies vegetais presentes nos solos em estudo.

Aumentos de biomassa e peso seco foram relatados em pinheiros após a inoculação de *Pseudomonas fluorescens* (Lucy et al., 2004). Possivelmente esse resultado ocorreu devido à ação do fitormônio citocinina sobre a planta, isto porque alterações positivas no crescimento de pinheiro e na quantidade desse fitormônio nas raízes puderam ser detectadas após a inoculação com esta estirpe bacteriana (Lucy et al., 2001). A bactéria *Pseudomonas fluorescens* também apresenta comprovado auxílio na ectomicorrização de raízes de mudas de *Eucalyptus* sp., o que auxilia o rápido desenvolvimento das árvores (Dustan et al., 1998). Além disso, a *Pseudomonas fluorescens* apresenta-se bem adaptada ao adaptar-se, com resultados benéficos, às rizosferas de *Pinus banksiana* (Lucy et al., 2004), *Pinus eliottii* (Enebak et al., 1998), *Picea glauca* (Chanway et al., 2000), justificando sua ocorrência em um solo de onde há maior diversidade de árvores.

A ocorrência de *Bacillus subtilis* e *Bacillus megaterium* no solo sob *Eucalyptus* sp. poderia indicar uma afinidade com a rizosfera desse tipo de árvore, que ela não aparece no solo sob mata. Apesar de não ter sido observado que a inoculação com *Bacillus subtilis* não influencia de maneira significativa o aumento de biomassa em árvores de Albedo (spruce) (Shishido et al., 2000), aumentos de biomassa, da ordem de

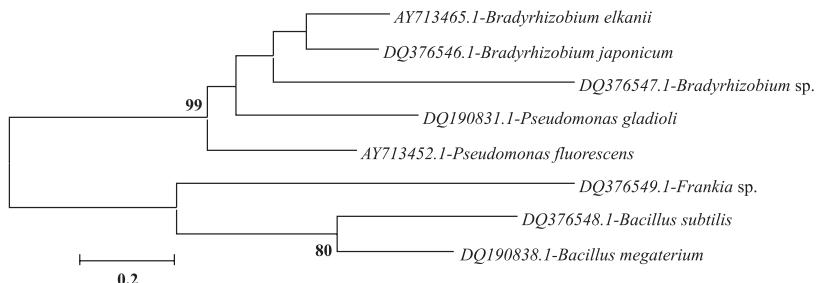
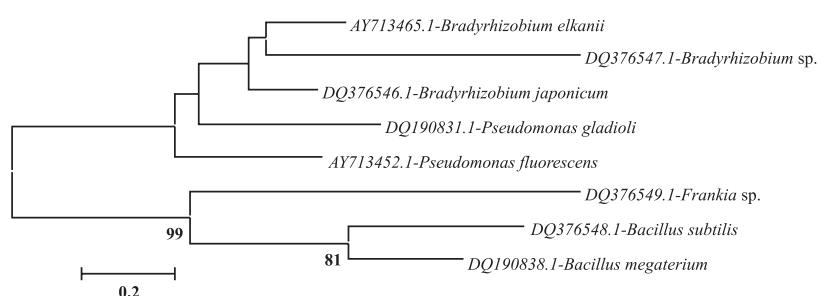


Figura 2. Árvore filogenética construída pelo método Neighobor-Joining com as oito possíveis espécies RCPC observadas no estudo.



44 %, foram encontrados como resultado da inoculação de *Bacillus megaterium* e *Azotobacter chroococcum* em experimento com mudas de *Eucalyptus* sp. em vasos (Lucy et al., 2004).

Outro aspecto importante a mencionar é a indução de resistência à ferrugem do *Eucalyptus* sp. através da inoculação de *Bacillus subtilis* no substrato de mudas. Embora não tenha sido o mais eficiente, um moderado grau de indução foi observado (Teixeira, et al., 2005). Ainda nessa linha, Amorin & Melo (2002) observaram que *Bacillus subtilis* foi capaz de controlar *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* além de promover maior desenvolvimento tanto da raiz como da parte aérea de plântulas de citros quando comparados à testemunha sem inoculação daquela bactéria.

Como mostrado na figura 1, as espécies *Bradyrhizobium* sp., *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium elkanii* e *Frankia* estavam presentes em ambos os solos, sempre em maior quantidade no solo sob *Eucalyptus* sp.

Em um extenso estudo realizado em solos australianos cultivados com a leguminosa tropical acácia, foi detectada a presença de *Bradyrhizobium elkanii* e *Bradyrhizobium japonicum*, entre outras bactérias, em diferentes regiões do país (Lafay & Burdon, 2001). A influência que estas bactérias podem ter no desenvolvimento do *Eucalyptus* sp. é questionável. Por outro lado, a presença de *Bradyrhizobium* sp. poderia ser consequência da presença de leguminosas florestais na mata em estudo, localizada relativamente próxima ao arboreto de *Eucalyptus* sp.

Dentro desse contexto, o trabalho de Santiago et al. (2002) com *Bradyrhizobium* sp. mostra que o crescimento de *Dalbergia nigra* foi igual ao obtido na área onde houve apenas o uso de fertilizantes. Também foi constatado que a inoculação com esta bactéria aumentou a ectomicorrização em *Acacia holosericea*, favorecendo seu crescimento (André et al., 2005).

Quanto à presença de *Frankia* em ambos os solos, é justificada pelo fato de que plantas freqüentemente encontradas nas matas, como Angiospermas, hospedam *Frankia*, em especial árvores do gênero *Casuarina* e *Allocasuarina*, que fixam nitrogênio em seus nódulos através da simbiose com essas bactérias, assim como plantas dos gêneros *Alnus* e *Elaeagnus*. Do mesmo modo, existe uma grande diversidade de plantas noduladas por *Frankia*, incluindo mais de 200 espécies distribuídas em 24 gêneros de oito famílias (Marin et al., 1999). Além disso, esta *actinobacteria* pode viver também na rizosfera e no rizoplano de outras árvores e possui grande habilidade de sobrevivência em diferentes ambientes independentemente do hospedeiro, confirmando assim sua alta promisão e simbiótica (Simonet et al., 1998). Esses dados, portanto, possibilitam a compreensão da razão do tor-

Os dados relatados demonstram uma vez mais a grande variedade de hospedeiros e diferentes hábitos que um simbionte pode ter, o que reforça os resultados coletados neste trabalho com essas mesmas bactérias, ocorrendo em solos sob mata e sob *Eucalyptus* ssp.

Este trabalho forneceu valiosos dados, para futuros estudos, sobre diversidade de populações bacterianas, em especial as rizobactérias promotoras do crescimento de plantas em solos sob diferentes espécies florestais, assim como para o melhor conhecimento das comunidades desses microrganismos nos solos do Brasil. Esses dados podem também fornecer subsídios para novos estudos sobre inoculação de rizobactérias em espécies florestais.

CONCLUSÕES

1. Constatou-se maior ocorrência de possíveis RPCP no solo sob *Eucalyptus* sp.

2. Das 495 seqüências de bactérias detectadas, somente 97 eram de rizobactérias, compreendendo 10 espécies diferentes detectadas nos dois solos.

AGRADECIMENTOS

As agências CAPES, CNPq e FAPESP, que possibilaram a realização do trabalho.

LITERATURA CITADA

- AMORIM, E.P.R. & MELO, I.S. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. R. Bras. Frutic., 24:563-568, 2002.
- ANDRÉ, S.; GALIANA, A.; LE ROUX, C.; PRIN, Y.; NIEMI, M. & DUPONNOIS, R. Ectomycorrhizal symbiosis enhanced the efficiency of inoculation with *Bradyrhizobium* strains and *Acacia holosericea* grown in *Acacia* mycorrhiza. Mycorrhiza, 15:357-364, 2005.
- ASTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, W.; ALTSCHUL, S.F.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLETT, J. & LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res., 25:3389-402, 1997.
- BENT, E.; TUZUN, S.; CHANWAY, C.P. & ENEBORG, H. Alterations in plant growth and in root hormone levels in lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. Can. J. Microbiol., 47:793-800, 2001.
- CHANWAY, C.P.; SHISHIDO, M.; NAIM, J.; JUNGWIRTH, S.; MARKHAM, J.; XIAO, G. & HOLL, F.B. Endophytic bacteria in *Acacia* and *Eucalyptus* ssp. ssp. and their role in plant growth. Can. J. Microbiol., 47:783-792, 2001.

AVALIAÇÃO DE POPULAÇÕES DE POSSÍVEIS RIZOBACTÉRIAS EM SOLOS SOB ESPÉCIES...

- CHANWAY, C.P. Differential response of western hemlock from low and high elevations to inoculation with plant growth-promoting *Bacillus polymyxa*. *Soil Biol. Biochem.*, 27:767-775, 1995.
- CHANWAY, C.P. Inoculation of tree roots with plant growth promoting rhizobacteria: An emerging technology for reforestation. *For. Sci.*, 43:99-112, 1997.
- DUNSTAN, W.A.; MALAJCZUK, N. & DELL, B. Effects of bacteria on mycorrhizal development and growth of container grown *Eucalyptus diversicolor* F. Muell. Seedlings. *Plant Soil*, 201:241-249, 1998.
- ENEBAK, S.A.; WEI G. & KLOEPPER, J.W. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedlings. *For. Sci.*, 44:139-144, 1998.
- FREITAS, S.S. & VILDOSO, C.I.A. Rizobactérias e promoção do crescimento de plantas cítricas. *R. Bras. Ci. Solo*, 28:987-994, 2004.
- GORDON, D.; ABAJIAN, C. & GREEN, P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. *Genome Res.*, 8:195-202, 1998.
- HOLL, F.B. & CHANWAY, C.P. Rhizosphere colonization and seedling growth promotion of lodgepole pine by *Bacillus polymyxa*. *Can. J. Microbiol.*, 38:303-308, 1992.
- JUVENTAL, T.L. & MATHOS, R.L.G. Brasil e a importância do reflorestamento. *BNDES Setorial*, 16:3-30, 2002. Disponível em: <<http://www.bnDES.gov.br/conhecimento/bnset/set1601.pdf>> Acesso em 3 julho 2006.
- LAFAY, B. & BURDON, J.J. Small-Subunit rRNA Genotyping of Rhizobia Nodulating Australian *Acacia* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:396-402, 2001.
- LAGUERRE, G.; MAVINGUI, P.; ALLARD, M.R.; CHARNAY, M.P.; LOUVRIER, P.; MAZURIER, S.I.; RIGOTTIER-GOIS, L. & AMARGER, N. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: Application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. *Appl Environ. Microbiol.*, 62:2029-2036, 1996.
- LUCY, M.; REED, E. & GLICK, B.R. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie Leeuwenhoek*, 86:1-25, 2004.
- MARIN, V.A.; BALDANI, V.L.D.; TEIXEIRA, K.R.S. & BALDANI, J.I. Fixação biológica de Nitrôgenio: Bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical. *Seropédica*, 1999. 34p. (Série Documentos. Embrapa Agrobiologia)
- SAMBROOK, J. & RUSSELL, D.W. Molecular cloning: A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SANTIAGO, G.M.; GARCIA, Q. & SCOTTI, R.M. Effect of post-planting inoculation with *Bradyrhizobium* sp. and mycorrhizal fungi on the growth of Brazilian rosewood, *Dalbergia nigra* Allem. ex Benth., in two tropical soils. *New For.*, 24:15-25, 2002.
- SCAQUITO, D.C. Diversidade bacteriana em solos sob nativa e *Eucalyptus* sp. Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, 2004. 80p. (Tese de Mestrado)
- SHISHIDO, M. & CHANWAY, C.P. Colonization and growth of outplanted spruce seedlings pre-inoculated with growth promoting rhizobacteria in the greenhouse. *J. For. Res.*, 30:848-854, 2000.
- SILVA FILHO, G.N.; NARLOCH, C. & SCHARTZ, M. Solubilization of natural phosphates by microorganisms isolated from *Pinus* and *Eucalyptus* plantations in Catarina, Brazil. *Pesq. Agropec. Bras.*, 37, n.6, 2002. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2002000600014&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 26 de Set. de 2008.
- SILVEIRA, E.L. Identificação de comunidades bacterianas no solo por sequenciamento do gene 16S rDNA. Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, 2004. 75p. (Tese de Mestrado). Disponível em: <http://www.biblioteca.unesp.br/bibliotecadigital/docentes/get.php/2311/silveira_el_me_jabo.pdf>. Acesso em 30 de Setembro de 2006.
- SIMONET, P.; NAVARRO, E.; ROUVIER, C.; REDDELL, J.; ZIMPFER, J.; DOMMERGUES, Y.; BARDIN, C.; COMBARRO, P.; HAMELIN, J.; DOMENACH, P.; GOURBIÈRE, F.; PRIN, Y.; DAWSON, J.O. & NORMAND, P. Co-evolution between *Frankia* populations and plants in the family Casuarinaceae and consequences on patterns of global dispersal. *Environ. Microbiol.*, 533, 1999.
- SOTTERO, A.N.; FREITAS, S.S.; MELO, A.M.T. & TAVARES, P.E. Rizobactérias e alface: Colonização rizosférica e promoção de crescimento e controle biológico. *R. Bras. Ci. Solo*, 30:225-234, 2006.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M. & KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA4) software version 4.0. *Molec. Biol. Evol.*, 24:1596-1599, 2007. <Publicação <http://www.kumarlab-publications>>. Acesso em 15/06/2008.
- TEIXEIRA, D.A.; ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G.; MAFFIA, J. & FERREIRA, E.M. Evidências de indução de resistência sistêmica à ferrugem do *Eucalyptus* sp. mediada por rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. *Fitopatol. Bras.*, 30:350-356, 2005.
- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F. & HIGGINS, D.G. The Clustal windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 25:4876-4882, 1997.
- VESSEY, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*, 255:571-586, 2003.
- ZAADY, E. & PEREVOLTSKY, A. Enhancement of growth and establishment of oak seedlings *Quercus ithaburensis* Decaisne by inoculation with *Azospirillum brasiliense*. *Ecol. Manag.*, 72:81-83, 1995.