

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL E PASTAGENS

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE ESTIRPES
BACTERIANAS ORIUNDAS DE NÓDULOS RADICULARES
DE *Mimosa tenuiflora* (Willd) Poir. E *Desmanthus*
pernambucanus (L.) Thellung

Autora: Penélope Teles Viveiros da Silva
Orientador - Prof. Dr. Albericio Pereira de Andrade

GARANHUNS
Estado de Pernambuco
Julho - 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL E PASTAGENS

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE ESTIRPES BACTERIANAS
ORIUNDAS DE NÓDULOS RADICULARES DE *Mimosa tenuiflora*
(Willd) Poir. E *Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung

Autora: Penéllope Teles Viveiros da Silva
Orientador - Prof. Dr. Albericio Pereira de Andrade

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIA ANIMAL E PASTAGENS, no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e Pastagens da Universidade Federal Rural de Pernambuco - Área de Concentração: Produção Animal.

GARANHUNS
Estado de Pernambuco
Julho - 2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Ariano Suassuna, Garanhuns-PE, Brasil

S586c Silva, Penelope Teles Viveiros da
Caracterização fenotípica de estirpes bacterianas oriundas de
Nódulos radiculares de *Mimosa tenuiflora* (Willd) Poir. e
Desmanthus Pernambucanus (L.) Thellung / Penélope Teles
Viveiros da Silva. – 2016.

f. : il.

Orientadora: Albericio Pereira de Andrade.

Coorientadoras: André Luiz Rodrigues Magalhães, Geane Dias
Gonçalves Ferreira

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Pastagens, Recife, BR-PE, 2016.

Inclui referências.

1. Microbiologia do solo
2. Leguminosas
3. Adubação;
5. Biodiversidade I. Andrade, Albérico Pereira de., orient.
II. Magalhães, André Luiz Rodrigues, coorient. III. Ferreira, Geane
Dias Gonçalves coorient. IV. Título

CDD 636.32

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL E PASTAGENS

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE ESTIRPES BACTERIANAS
ORIUNDAS DE NÓDULOS RADICULARES DE *Mimosa tenuiflora*
(Willd) Poir. E *Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung

Autora: Penélope Teles Viveiros da Silva
Orientador - Prof. Dr. Albericio Pereira de Andrade

TITULAÇÃO: Mestre em Ciência Animal e Pastagens
Área de Concentração: Produção Animal

APROVADA: ____/____/____.

Prof. Dr. André Luiz Rodrigues Magalhães
PPGCAP/UFRPE

Prof^ª. Dr^ª. Geane Dias Gonçalves Ferreira
UAG/UFRPE

Prof. Dr. Albericio Pereira de Andrade
PPGCAP/UFRPE
(Orientador)

*“Há quem, por ter estudado
Tudo o que outros escreveram,
Entre as letras se perderam,
Já não sabem sequer quem são;
Perderam o coração
Que não se deve perder...
[...] Eu tenho sofrido muito
Nos meus voos ensaiados
Que ao querer sair do chão
Ficam-me os pés agarrados,
...E por falar dos pés
Com versos de pés quebrados
Perdoe lá a quem os fez
Pelo mal dos meus pecados
Só os fiz por timidez
Que tenho em me dirigir
A quem tem por lucidez
Razão para distinguir
O bom e o mau Português.”*

*“Bendito seja o nome do Senhor,
Desde sempre e para sempre!
Pois sabedoria e capacidade
São coisas que dele vêm!”*
(Dn. 2:20)

*Ao meu Deus que me deu forças, sabedoria, capacidade e sustento em todos os
momentos dessa caminhada.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos meus Pais José Sebastião e Margarette Teles, por todo amor, dedicação, apoio e esforços durante toda minha vida.

Aos meus irmãos Pâmella Teles e Renato Teles e sobrinhos Nícollas Teles e Nicolly Teles pelo carinho e atenção a mim dedicados, sempre quando deles precisei.

Ao meu namorado Marcelo Ferreira, pelo carinho, compreensão, paciência e companheirismo em todos os momentos.

A minha grande amiga Suelane Dias, por tudo, por toda ajuda sem medir esforços. Não tenho palavras para descrever o quanto sou grata a Deus por ter você como companheira de trabalho e de vida.

Ao meu orientador Professor Dr. Albericio Pereira de Andrade pelos seus conselhos, incentivo e compreensão.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco - Unidade Acadêmica de Garanhuns, pela oportunidade concedida para a realização deste curso.

Ao Programa de Pós-Graduação de Ciência Animal e Pastagens e todos que fazem parte da sua administração.

Ao CCA/UFPB nas pessoas de Professora Riselane Bruno, Ivandro França, Aline Mendes e Adailson Pereira pelo acolhimento, carinho e apoio nas atividades desenvolvidas.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo incentivo financeiro durante o curso.

A todos os Professores que participaram da minha formação profissional e pessoal durante esses dois anos de curso, em especial aos professores André Magalhães, Geane Gonçalves, Karla Andrade e Omer Cavalcanti.

Aos meus amigos que me concederam apoio e companheirismo em momentos propícios durante o curso: Angelita Lima, Lívia Maria, Jorge Serrão, Rayanne Thalita, Janieire Dorlames, Ribamar Jr., Wanderson Alves e Leandro Oliveira.

Enfim, agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização desse trabalho.

A todos vocês, Muito Obrigada!

BIOGRAFIA

Penélope Teles Viveiros da Silva, filha de José Sebastião da Silva e Margaretti Teles de Viveiros Silva, nasceu no município de Lajedo, Pernambuco, no dia 08 de março de 1989.

No ano de 2008, ingressou na Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns, onde em maio de 2014, obteve o título de Bacharel em Zootecnia. No mesmo ano ingressou no mestrado em Ciência Animal e Pastagens, na Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns, concentrando seus estudos na área de Ecofisiologia e Sistemas de Produção de Plantas Forrageiras e Desempenho de Animais em Pastagens.

Em maio de 2015, teve parte das atividades de Mestrado realizadas na Universidade Federal da Paraíba – Centro de Ciências Agrárias/Areia – PB, desenvolvendo o experimento e atividades de estágio em docência no referido local.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE TABELAS.....	12
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas	18
2.2 Produção de AIA por rizóbactérias.....	19
2.3 Produção de exopolissacarídeos por rizobactérias.....	21
2.4 Uso de RPCP como ferramenta sustentável	24
CITAÇÃO BIBLIOGRÁFICA.....	28
CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE ESTIRPES BACTERIANAS ORIUNDAS DE NÓDULOS RADICULARES DE <i>Mimosa tenuiflora</i> (WILLD) POIR. E <i>Desmanthus pernambucanus</i> (L.) THELLUNG.....	32
Introdução	33
Material e Métodos	34
1 Áreas de coleta.....	34
2 Coleta dos solos	36
3 Plantio das plantas isca	38
4 Isolamento e caracterização fenotípica dos isolados	39
5 Quantificação da produção de Compostos indólicos.....	42
Resultados e Discussão.....	44
Conclusão.....	53
Referências.....	54

APÊNDICE.....	57
ANEXO	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1B. Localização geográfica dos municípios do Sertão do estado de Pernambuco, selecionados para coleta de solos.....	34
Figura 2B. Caatinga de Arcoverde (A), Ibimirim (B) e Serra Talhada (C), Sertão Pernambucano, Brasil.....	35
Figura 3B. Coleta de solo para análise química (à esquerda) coletas de solo para o plantio de planta isca (à direita).....	38
Figura 4B. Esterco caprino (à esquerda) e incorporado ao solo (à direita) antes de serem acondicionados nos vasos.....	39
Figura 5B. Placa contaminada (à esquerda) e placa sem contaminante (à direita).....	40
Figura 6B. Morfologia de colônias de bactérias utilizadas para caracterização cultural em meio de cultivo. Fonte: Adaptado de Hungria e Silva (2011).....	41
Figura 7B. Curva padrão com diferentes concentrações ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de compostos indólicos (CI), quantificadas em espectrofotômetro a 530 nm.....	43
Figura 8B. Nódulo com interior vermelho (à esquerda) Nódulo não funcional (à direita).....	44
Figura 9B. Potencial de Nodulação Natural obtidos em duas espécies de fabáceas forrageiras do Semiárido.....	45
Figura 9B. Potencial de Nodulação Natural obtidos em duas espécies de fabáceas forrageiras do Semiárido.....	48
Figura 11B. Índice de Dominância de Simpson de isolados de rizóbios nativos das espécies <i>Mimosa tenuiflora</i> e <i>Desmanthus pernambucanus</i> cultivadas em solos coletados do Semiárido pernambucano.....	50
Figura 12B. Índice de Riqueza de Espécies Jackknife 1ª Ordem de isolados de rizóbios nativos das espécies <i>Mimosa tenuiflora</i> e <i>Desmanthus pernambucanus</i> cultivadas em três regiões do Semiárido pernambucano.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Georreferenciamento das áreas de coleta de solos nos municípios de Arcoverde, Ibimirim e Serra Talhada, Pernambuco, Brasil.....	36
Tabela 2. Atributos químicos dos solos dos municípios de Arcoverde, Ibimirim e Serra Talhada, Pernambuco, Brasil.....	36
Tabela 3. Atributos químicos dos solos, destinados ao plantio de planta isca, dos municípios de Arcoverde, Ibimirim e Serra Talhada, Pernambuco, Brasil.....	37
Tabela 4. Produção de massa seca da parte aérea e raiz de forrageiras nativas da caatinga, em função do tipo de solo e da aplicação do esterco.....	45
Tabela 5. Número e biomassa de nódulos de leguminosas forrageiras nativas da caatinga, cultivadas em solos representativos do semiárido, sem ou com aplicação de esterco caprino, em quantidade equivalente a 20 Mg ha ⁻¹	46
Tabela 6. Diversidade cultural de isolados de rizóbios pelos índices Shanon e Equitabilidade de Pielou, em <i>M. tenuiflora</i> e <i>D. pernambucanus</i> cultivadas nos solos de Arcoverde, Ibimirim e Serra Talhada, Pernambuco.....	49
Tabela 7. Produção de compostos indólicos (CI) por isolados bacterianos oriundos de nódulos de <i>M. tenuiflora</i> e <i>D. pernambucanus</i> , cultivados em meio de cultura Levedura Manitol (LM), enriquecidos ou não com triptofano.....	52

RESUMO

A caracterização cultural dos isolados bacterianos geralmente é a primeira etapa do processo de obtenção dos isolados e avaliação de sua biodiversidade. Estas avaliações são importantes e permitem a seleção preliminar de isolados, separando-os em grupos de gêneros, por exemplo. A realização deste estudo teve como objetivo caracterizar fenotipicamente estirpes bacterianas oriundas de nódulos radiculares das espécies forrageiras: *Desmanthus pernambucanus* e *Mimosa tenuiflora* cultivadas em solos adubados ou não. As amostras de solos para cultivo das plantas em estufa telada foram coletadas nos municípios de Arcoverde, Ibimirim e Serra Talhada, Pernambuco. Os isolados foram caracterizados quanto ao tempo de crescimento de colônias, determinação da forma e diâmetro, elevação, transparência, produção de exopolissacarídeos e coloração das colônias, alteração do pH do meio. Foram determinados o número e a biomassa de nódulos, produção de compostos indólicos e caracterização fenotípica dos isolados bacterianos. Na avaliação cultural, foram observadas como principais características: tempo de crescimento rápido, elevação plana, produção de exopolissacarídeos de pouca a moderada, coloração variando de creme a branca e superfície lisa. As leguminosas tiveram nodulação nos três solos na ausência ou presença de esterco. Adubação com esterco não aumenta o número dos nódulos das plantas *Mimosa tenuiflora*, porém aumenta o número de nódulos das *Desmantus pernambucanus*. Os isolados bacterianos são capazes de produzir compostos indólicos sem adição de triptofano.

ABSTRACT

The cultural characterization of bacterial isolates is usually the first step in the process of getting the isolated and evaluation of biodiversity. These evaluations are important and allow for a preliminary screening of isolated by separating them into groups genera, for example. This study aimed to characterize phenotypically bacterial strains derived from root nodules of forages: *Desmanthus pernambucanus* and *Mimosa tenuiflora* grown in fertilized soil or not. Samples of soil for cultivation of plants in the screened greenhouse were collected in the cities of Arcoverde, Ibimirim and Serra Talhada, Pernambuco. The isolates were characterized as the time of growth of colonies, determine the shape and diameter, high transparency, exopolysaccharides production and coloration of the colonies, change of pH. They determined the number and biomass of nodules, production indoles and phenotypic characterization of bacterial isolates. Cultural assessment, were seen as key features: rapid growth time, flat elevation, exopolysaccharides production of low to moderate color ranging from cream to white and smooth surface. Legumes had nodulation in the three soils in the absence or presence of manure. Manuring does not increase the number of nodules of *Mimosa tenuiflora* plants, but increases the number of nodules *Desmantus pernambucanus*. The bacterial strains are capable of producing indole compounds without the addition of tryptophan.

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil apresenta papel de destaque no cenário mundial pela quantidade e qualidade de sua produção agropecuária. Baseado no modelo convencional e utilizando-se de forma intensiva os fertilizantes químicos e agrotóxicos, o país encontra-se como o quarto maior consumidor mundial de fertilizantes. Isso indica grande dependência por insumos externos, podendo causar insegurança econômica e até levar ao aumento dos custos de produção, uma vez que a produção nacional de fertilizantes supre apenas 33% do mercado interno (Oliveira et al., 2014).

A nutrição adequada das culturas é um fator de extrema importância para o aumento da produção e produtividade e é um dos fatores de maior peso no custo de produção (econômico e ambiental) (Oliveira et al., 2014). Contudo, é importante que o manejo das culturas vise não somente a redução nos custos de produção, mas também a diminuição dos níveis de poluição causados pelo uso indiscriminado de fertilizantes (Guimarães, 2006).

Além disso, o aumento da exploração agropecuária tem reduzindo significativamente as coberturas florestais, provocando degradação dos biomas e diminuindo a fertilidade dos solos. Esta redução dos teores de nutrientes dos solos é causada pela erosão e pela exportação dos nutrientes agropecuários, podendo modificar o equilíbrio dos ambientes naturais e levar a alterações da composição química, física e biológica do solo e do ambiente (Menezes e Sampaio, 2000).

Uma das alternativas à diminuição da dependência por fertilizantes e agroquímicos seria a ampliação da oferta de insumos biológicos. A tecnologia de inoculação com rizobactérias promotoras de crescimento favorecem o desenvolvimento vegetal por mecanismos diretos, como a fixação biológica de nitrogênio, produção de fitormônios, solubilização de fosfatos e também por mecanismos indiretos, como o

controle biológico de fitopatógenos e insetos, proporcionando aumento da resistência de plantas a estresses bióticos e abióticos (Bulgarelli et al., 2013).

Esses mecanismos de promoção do crescimento vegetal, realizados por microrganismos diazotróficos do solo podem ser explorados em benefício de uma produção mais sustentável e de menor impacto ambiental.

Assim, objetivou-se caracterizar fenotípicamente estirpes bacterianas oriundas de nódulos radiculares das espécies *Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung e *Mimosa tenuiflora* (Willd) Poiret cultivadas em solos provenientes de áreas de Caatinga dos municípios de Arcoverde, Ibimirim e Serra Talhada no estado de Pernambuco, Brasil.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas

O solo é uma porção superficial da Terra que apresenta condições essenciais para o animal, o vegetal e a vida microbiana (Santos et al., 2010). Como habitat, o solo é um sistema heterogêneo, descontínuo e estruturado, formado por micro-habitats discretos com diferentes características químicas, físicas e comunidades biológicas (Moreira e Siqueira, 2006). É considerado um dos maiores reservatórios de biodiversidade microbiana, podendo existir milhares de diferentes espécies de bactérias por cm³ de solo (Torsvik e Ovreas, 2002). Essa biodiversidade microbiana possui papel essencial para a dinâmica funcional do solo, como a decomposição da matéria orgânica, degradação de substâncias xenobióticas, controle biológico de patógenos, influência na solubilização de minerais e contribuição na estruturação e agregação do solo (Kujur et al., 2012).

A biodiversidade microbiana no solo é determinada pela combinação das condições ambientais, as quais interagem com os fenótipos dos micróbios, resultando em populações maiores para genótipos adaptados e baixas populações aos menos adaptados. Além da constante competitividade por ocupação e absorção de nutrientes, a quantidade de células bacterianas é dependente das variáveis ambientais, como a profundidade do solo, pH, umidade e temperatura (Santos et al., 2010).

Há uma zona estreita do solo em torno da raiz que está sob influência imediata do sistema radicular, denominada de rizosfera (Dobbelaere et al., 2003). Esta denominação foi dada pela primeira vez por Hiltner, em 1904 para descrever a zona de influência das raízes que vai desde suas superfícies até a distância de 1 a 3 mm (Moreira e Siqueira, 2006; Saharan e Nehra, 2011). A rizosfera é rica em nutrientes, quando comparada com o solo em geral, devido à acumulação de uma grande variedade de exudatos liberados a partir do metabolismo radicular, favorecendo a manutenção de elevadas populações microbianas, cerca de 10 a 1.000 vezes maiores que aquelas encontradas no solo não rizosférico (Weller e Thomashoww, 1994).

O efeito do metabolismo vegetal sobre o solo adjacente às raízes é denominado de efeito rizosférico (Berendsen et al., 2012). Os microrganismos que se destacam na colonização da rizosfera de uma espécie vegetal qualquer são denominados de rizocompetentes. A rizocompetência possibilita a colonização do ambiente rizosférico pelas espécies mais competitivas, por serem mais adaptadas e eficientes na utilização dos recursos disponibilizados pelos exudatos radiculares (Oliveira et al., 2014).

Doornbos et al. (2012) relataram que a seleção de grupos específicos pelo efeito rizosférico, em resposta ao metabolismo vegetal, não ocorre de maneira aleatória. Assim, a planta consegue modular a qualidade/quantidade de material excretado pelas raízes de forma a selecionar microrganismos que vão atuar na rizosfera a seu favor. Contudo, Deutschbauer et al. (2006) e Thrall et al. (2011) afirmaram que as raízes vegetais e a estrutura da comunidade microbiana a ela associada atuam de forma interdependente em um sistema único, complexo e auto-regulado, sob influência de variáveis bióticas e abióticas.

Um grande número de microrganismos, tais como bactérias, fungos, protozoários e algas coexistem na rizosfera. Porém, são as bactérias as mais abundantes entre eles, sendo denominadas de rizobactérias (Saharan & Nehra, 2011; Berendsen et al., 2012). As rizobactérias exercem diversos efeitos positivos sobre as plantas, variando os mecanismos de influência direta e indireta, sendo denominadas também de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP). As RPCP são todas as bactérias com capacidade de colonizar a superfície de raízes, rizosfera, filosfera e tecidos vegetais internos, modulando o metabolismo da planta, estimulando seu crescimento e produção (Oliveira et al., 2014).

2.2 Produção de AIA por rizóbactérias

As RPCP são reconhecidamente capazes de produzir substâncias fitoestimuladoras que influenciam no crescimento e no desenvolvimento vegetal. A fitoestimulação é a promoção direta de crescimento das plantas através da produção de fitormônios. A síntese de fitormônios, principalmente auxinas e giberelinas, é considerada um dos mecanismos mais importantes com a finalidade de manutenção e desenvolvimento celular (Taiz e Seiger, 2013; Cassán et al., 2014). Cerca de 80% das espécies de bactérias isoladas da rizosfera produzem auxinas (Patten & Glick, 1996).

Entre as auxinas, o ácido indol-acético (AIA) é o mais estudado (Radwan, et al. 2005). O Ácido indol-acético é um hormônio vegetal que regula vários processos celulares e de desenvolvimento dos vegetais (Zeevaart, 1997). Este hormônio pode também ser produzido por bactérias capazes de fixar nitrogênio atmosférico, como já foi comprovado com estirpes de *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Flavobacterium*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Streptomyces*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Grimontella*, *Pantoea*, *Rahnella* entre outros gêneros (Tsavkelova et al., 2006; Ramírez e Kloepper 2010; Costa et al., 2014), estabelecendo

um elo de comunicação com a planta hospedeira (Bianc et al., 2006), auxiliando a planta em seu desenvolvimento, atuando na formação de raízes laterais e de pelos radiculares que aumentam absorção de nutrientes pela planta (Biswas et al., 2000; Lambrecht et al., 2000).

Bactérias nodulíferas podem sintetizar AIA através de três vias metabólicas, indol-3-acetamida (IAM), indol-3-piruvato (IpyA) e triptamina (TAM) sendo que, o precursor IpyA é independente de L-triptofano (Figura 1 A).

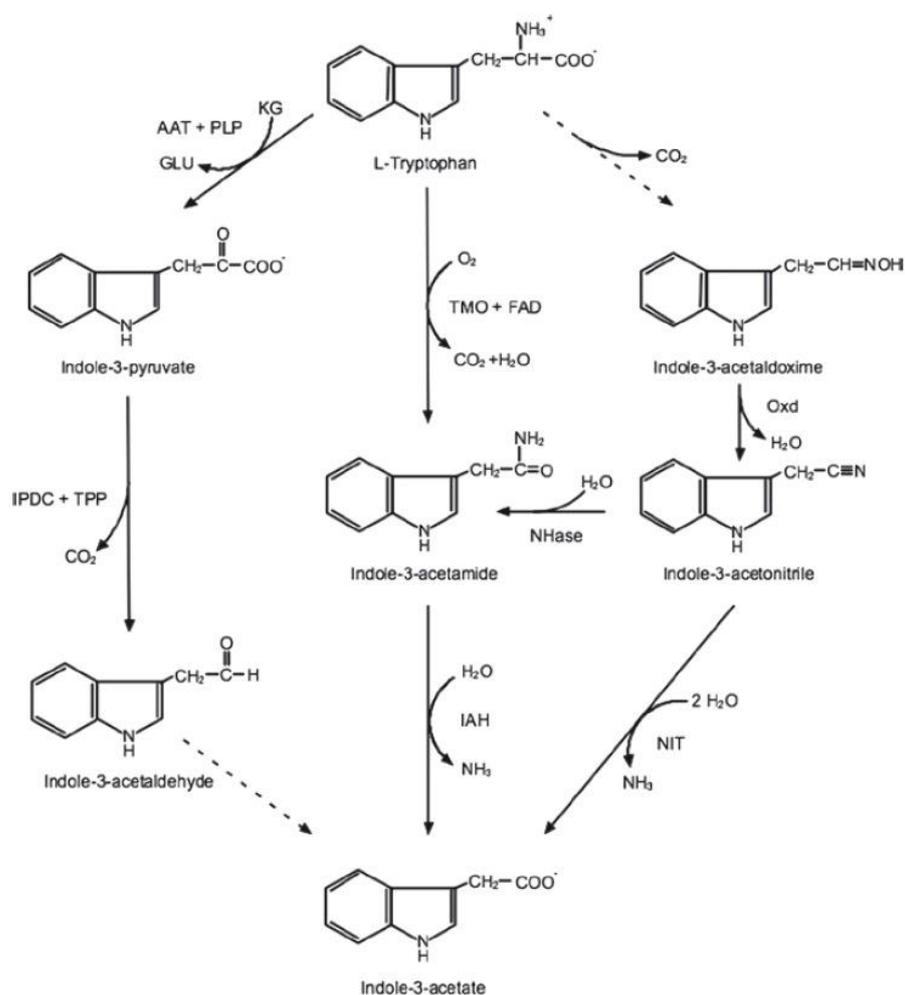


Figura 1A. Três vias biossintéticas principais AIA em bactérias. Fonte: Patten et al. (2012).

Diversos autores já destacaram a capacidade de produção de AIA pelo grupo dos rizóbio, onde, este fitohormônio desempenha papel importante no crescimento da planta e na interação fabácea-rizóbio (Ghosh et al., 2015).

Em experimento conduzido em câmara de crescimento, Silveira (2008) estudou o efeito da inoculação de cinco estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii quanto

à capacidade de promover o crescimento de arroz, variedade IAC103, em solução nutritiva. Quanto ao acúmulo de massa seca, as plantas inoculadas com as estirpes SEMIA235 e SEMIA250 foram superiores ao tratamento controle em mais de 100%. A produção de AIA por estas estirpes foi menor em relação às demais estirpes, e isto pode ter sido a chave para o maior estímulo às plantas.

Biswas et al. (2000) conduziram estudos em laboratório e em casa de vegetação para testar a capacidade de rizóbios em promover crescimento vegetal em duas variedades de arroz. Os rizóbios estudados foram avaliados quanto à produção de AIA através de teste colorimétrico, o qual foi positivo para as culturas sobrenadantes de todos os rizóbios testados, variando de 1,6 a 2,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. As melhores respostas às inoculações foram obtidas com *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii estirpe E11 e *Rhizobium* sp. Estirpe IRBG74, os quais estimularam precocemente o crescimento vegetal, resultando em incremento no rendimento de grãos e palhada, durante a maturidade das plantas.

2.3 Produção de exopolissacarídeos por rizobactérias

As bactérias são seres unicelulares capazes de sintetizar biopolímeros, moléculas constituídas de monômeros simples ou diversos. As unidades dos biopolímeros geralmente são açúcares, denominados polissacarídeos ou heteropolissacarídeos. Os EPSs rizobianos são espécie ou estirpe-específicos, compostos de diferentes tipos de monossacarídeos. Existem evidências de que a composição de EPS varia não só entre os diversos gêneros, mas também com mudanças no meio ambiente bacteriano. As alterações na constituição das unidades repetitivas podem afetar a habilidade simbiótica do bacterióide (Morgante et al., 2007).

A produção de exopolissacarídeos (EPSs) microbianos tem se mostrado promissora, pelo seu elevado potencial de aplicação em diferentes setores. No entanto, os polissacarídeos sintetizados por bactérias do grupo *Rhizobium* tem sido estudados na tentativa de melhor compreender sua participação na simbiose rizóbio fabácea (Barreto et al., 2011).

Os EPSs produzidos por bactérias do gênero *Rhizobium* foram estudados como em muitas outras proteobactérias, e são compostos, pelo menos em parte, de grandes heteropolímeros formados a partir de repetidas estruturas unitárias denominadas de monômeros. No gênero *Rhizobium*, são encontrados os monossacáridos, como D-glicose, D-galactose, D-manose, L-ramnose, D-glucurônico e o ácido D-galacturônico.

As unidades de repetição são altamente variáveis até ao nível de espécie, como é exemplificado pela ocorrência de diferentes unidades de repetição, dentro dos mesmos de *R. leguminosarum biovarieties*. Algumas das unidades de sacarídeos podem ser modificadas por acetil, piruvil, succinil, e grupos hydroxubutanal. A complexidade resultante é muitas vezes agravada pela ocorrência de várias formas de EPS da mesma subunidade de repetição ou de diferentes sub-unidades de repetição. Por exemplo, os *S. meliloti* sintetizam duas classes diferentes de EPS, denominada EPS I (um succinoglicano) e EPS II (um galactoglucano). Em ambos foram encontrados dois principais tipos de polissacarídeos fracamente ligados à superfície da membrana externa bacteriana: os EPSs ácidos liberados são os β -glucanas cíclicos de médio porte. Os β -glucanas cíclicos são encontrados predominantemente no espaço periplasmático (Morgante et al., 2007).

Além dos genes de nodulação (*nod*, *nol*, *Noé*, *Nif*) envolvidos na fixação do nitrogênio, outras moléculas envolvidas na sinalização são necessárias para a formação de nódulos fixadores de nitrogênio. Os polissacarídeos de superfície, tais como exopolissacáridos rizobianos ácidos (EPS), glucanos cíclicos (GC), lipopolissacarídeos (LPS) e os polissacarídeos capsulares (KPS) são claramente relevantes para a formação de uma simbiose eficaz (Rodríguez-Navarro et al., 2014). Os EPS tem fraca associação com a superfície da bactéria e são liberados em grandes quantidades no meio da célula.

Segundo Barreto et al. (2011), os EPS possibilitam vida livre às bactérias, permitindo a aderência e colonização às superfícies sólidas onde os nutrientes se acumulam. Esses exopolissacarídeos envolvem as membranas das células protegendo-as do dessecamento e outros estresses ambientais, além de poderem ajudar na fixação de minerais e nutrientes próximo as bactérias. Os EPS podem ser homopolímeros ou heteropolímeros e possuem uma variedade de substituintes não carboidratos.

As cianobactérias, organismos procariontes com capacidade de realizar fotossíntese oxigênica, são fontes biológicas bem conhecida de substâncias químicas de uso comercial, como ácidos orgânicos, proteínas, aminoácidos livres, carotenoides e ácidos graxos. As cianobactérias são capazes de produzir polissacarídeos extracelulares (EPS). Esses polissacarídeos podem ser encontrados formando cápsulas que são estruturas compactas associadas com a superfície celular ou como massa mucilaginosa amorfa, fracamente ligada às células (Camilios Neto et al., 2004).

No processo de fixação biológica de nitrogênio, os flavonóides, moléculas exsudadas pelas raízes das plantas, são capazes de induzir a expressão genética de

exopolissacarídeos em rizóbios comumente conhecidos como fatores de nodulação. A expressão dos genes reguladores da nodulação, ou simplesmente Genes Nod, é um fator primordial para o processo de nodulação em fabáceas. Nestes eventos iniciais, as bactérias mostram quimiotaxia, ou seja, reação a gradientes químicos, a diversas substâncias exsudadas pelas plantas hospedeiras. Neste contexto, a motilidade da bactéria tem sido indicada como importante fator na competição entre estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* para nodulação (Morgante et al., 2005).

De acordo com Santos & Reis (2008), a regulação da expressão dos genes nod varia entre as estirpes bacterianas. Normalmente esse processo é mediado pela proteína NodD, que por sua vez, pertence a uma família de reguladores transcricionais (LysR-like) onde permanecem ligadas a 47 pares de bases altamente conservadas no DNA (nod boxes). Embora as proteínas NodD se liguem aos promotores nod mesmo na ausência dos indutores, os flavonóides são geralmente requeridos para a expressão desses genes. Assim, a proteína NodD atua tanto como sensor do sinal emitido pela planta e como ativador transcricional de genes nod.

O processo de sinalização não é simples e envolve outros mecanismos comunicativos entre macro e microsimbionte. Inicialmente, os flavonoides agem como promotores de crescimento bacteriano interagindo como sinais quimiotáticos, favorecendo rápida proliferação de rizóbios. O primeiro passo dessa sinalização cruzada ocorre a nível molecular na interface do solo circundante a raiz da planta, a rizosfera, o que representa uma alta dinâmica de interações entre plantas e microrganismos do solo (Moscatiello et al., 2010). Os ácidos orgânicos presentes na rizosfera, liberados pelas plantas ou resultantes da decomposição, podem contribuir para desestabilizar microagregados por causar quebra de ligações entre a matéria orgânica e a argila pela redução do pH ou quelação catiônica, facilitando o processo de comunicação. Nas raízes, como consequência de seu metabolismo há liberação, de forma ativa ou passiva, de várias substâncias orgânicas para o ambiente rizosférico. Tal processo é conhecido como rizodeposição e, a zona sob sua influência é um importante nicho microbiológico no solo (Moreira & Siqueira, 2006).

Vários aspectos da simbiose entre as fabáceas e rizóbios são regulados pelo mecanismo denominado quorum-sensing (QS), incluindo a formação de nódulos, desenvolvimento de biossoma, transferência de plasmídeo, fixação biológica de nitrogênio, biossíntese de exopolissacarídeo (EPS) e formação de biofilme (Moscatiello et al., 2010). Segundo Marshall (2013), o quorum-sensing é um mecanismo de troca de

sinais entre os microrganismos através de moléculas denominadas autoindutoras ou metabólitos secundários, sendo sistema de comunicação determinado pela densidade celular. Quando a concentração da molécula autoindutora é suficientemente elevada, é iniciada uma sinalização celular na qual o gene alvo ou genes são ativados ou reprimidos. A comunicação pode ocorrer entre microrganismos de espécies diferentes (interespecie). São conhecidas três classes de moléculas auto-indutoras: oligopeptídeos, homoserino lactonas (AHL), auto-indutor-2 e auto-indutor-3.

2.4 Uso de RPCP como ferramenta sustentável

A microbiota do solo compreende organismos adaptados a diferentes condições bióticas e abióticas, que refletem uma grande diversidade metabólica, podendo ser explorados como fonte de interesse humano em função desta diversidade, da relativa facilidade de isolamento e cultivo em meios de baixo custo e da susceptibilidade para manipulação genética ou ambiental (Muller et al., 2010).

Os mecanismos de promoção de crescimento plantas podem ser explorados em benefício da produção de pastagens mais sustentáveis e de menor impacto ambiental, pela diminuição do uso de insumos derivados do petróleo. A utilização destes bioprodutos objetiva a colonização da planta pelo microrganismo inoculado, para que os mecanismos microbianos possam ser ativados (Vessey, 2003).

O nitrogênio e o fósforo são elementos que apresentam baixa disponibilidade nos solos tropicais e baixo aproveitamento pelas plantas cultivadas quando adicionados no sistema na forma de fertilizantes. Fenômenos de volatilização, desnitrificação e lixiviação são responsáveis por perdas que variam de 25 a 50% do N-fertilizante aplicado (Trivelin et al., 2002; Gava et al., 2006; Oliveira et al., 2014). A imobilização do fósforo resultante das interações com óxidos de ferro e alumínio, comuns em solos tropicais, também pode limitar o aproveitamento deste nutriente adicionado como fertilizante (Motta et al., 2002).

O fósforo é um recurso não renovável e escasso em nosso planeta e as estimativas apresentam o esgotamento de suas reservas em 50-100 anos (Oliveira et al., 2014). A matéria orgânica do solo contribui com 30 a 50%, em média, do total de fósforo solúvel na maioria dos solos, onde o fosfato de inositol (fitato) pode representar até 50% do P-orgânico (Richardson et al., 2009). Na forma inorgânica, as maiores reservas de P estão presentes como constituintes de rochas e minerais primários. Porém, a mobilização deste nutriente a partir de minerais é um processo lento e a quantidade

mobilizada é geralmente insuficiente para suprir as necessidades de um cultivo agrícola (Sneider et al., 2010). Além disso, uma quantidade considerável dos fertilizantes fosfatados aplicados é rapidamente imobilizada nos solos, pela sua reação com minerais de ferro, alumínio ou cálcio, formando fosfatos insolúveis e indisponíveis para a assimilação pelas plantas. Com isso, os microrganismos do solo assumem papel fundamental nas produções agrícolas, atuando na mineralização do fosfato orgânico ou na solubilização de fosfatos inorgânicos (Richardson et al., 2011).

O uso de fertilizantes nitrogenados pode ser substituído parcial ou completamente pela aplicação de biofertilizantes contendo RPCP eficientes na fixação biológica de nitrogênio.

As contribuições médias da FBN para sistemas agrícolas apresentados por Herridge et al. (2008) foram de 25kg N/ha/ano para associações não simbióticas (cana-de-açúcar), e até 176 kg N/ha/ano para associações simbióticas (soja). Apesar da importância da FBN no fornecimento de N por espécies diazotróficas, os insumos biotecnológicos com base neste processo estão disponíveis somente para algumas culturas e o uso de fertilizantes nitrogenados industriais ainda constitui a principal forma de aporte desse nutriente (Oliveira et al., 2014). Algumas estimativas apontam que a emissão de gases de efeito estufa para a produção, distribuição e aplicação de 1 kg de N-fertilizante corresponde a 4,5 kg de equivalentes de CO₂ emitidos na atmosfera (Hungria et al., 2013).

Mesmo considerando o pouco entendimento de como as relações benéficas entre plantas e bactérias são firmadas, uma grande diversidade de produtos contendo RPCP são comercializados como insumo para a agricultura: *Agrobacterium radiobacter*, *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum*, *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus firmus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mucilaginosus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus* spp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens*, *Burkholderia cepacia*, *Delftia acidovorans*, *Paenobacillus macerans*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas* spp., *Pseudomonas syringae*, *Serratia entomophila*, *Streptomyces griseoviridis*, *Streptomyces* spp., *Streptomyces lydicus* e vários *Rhizobia* spp (Glick, 2012).

No Brasil, são poucas as estirpes de RPCP registradas no MAPA (Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento) e compreendem: *Bacillus subtilis* (estirpes UFV 3918, UFV S1 e UFV S2); *Frauteria aurantia* (estirpe UFV R1); *Azospirillum*

brasiliense (estirpes Ab-V1, Ab-V4, Ab-V5, Ab-V6, Ab-V7 e Ab-V8), além de 116 estirpes de rizóbios indicados para diferentes espécies de leguminosas (Oliveira et al., 2014).

Estudos de inoculação realizados na cultura do milho pelo grupo de pesquisa sobre o desenvolvimento e a aplicação de biofertilizantes da Universidade Estadual de Londrina tem demonstrado ser possível a obtenção de elevadas produtividades sob menores dosagens de fertilizantes nitrogenados. Os resultados obtidos pelo grupo não indicam a ocorrência de possíveis efeitos aditivos relacionados ao uso de biofertilizantes e dosagens regulares de N-fertilizante. Ao contrário, as parcelas que receberam biofertilizantes, independentemente do tipo de formulação, não apresentaram resposta à adubação nitrogenada (Figura 2A). Assim, é possível e viável substituir, ao menos parcialmente, os insumos agrícolas industriais (fertilizantes e agroquímicos) por tecnologias de base biológica.

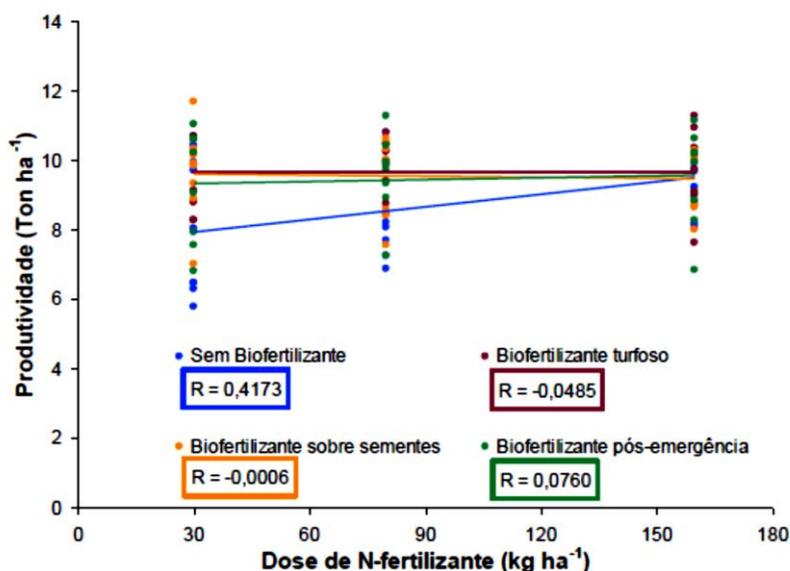


Figura 2A. Curva de tendência e coeficiente de correlação de Pearson entre a produtividade de milho (híbridos AG2040 e 2B512Hx) e o uso de fertilizantes nitrogenados, na ausência e presença de diferentes formulações de biofertilizante contendo a bactéria *Azospirillum brasilense* Ab-V5. Fonte: Oliveira et al. (2014).

A prática de uso de biofertilizantes comerciais tem crescido no Brasil, principalmente nas culturas de milho e trigo. Contudo, é recomendada como prática adicional ao manejo tradicional, visto que na maioria das propriedades os biofertilizantes são aplicados adicionalmente ao uso de fertilizantes minerais. Ou seja, não tem sido adotada como prática alternativa (Veresoglou & Menexes, 2010).

A presente dissertação é constituída de um capítulo intitulado: Caracterização fenotípica de estirpes bacterianas oriundas de nódulos radiculares de *Desmanthus Pernambucanus* (L.) Thellung e *Mimosa tenuiflora* (Willd) Poir., que será escrito em forma de artigo redigido de acordo com normas da revista Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (ANEXO –A).

CITAÇÃO BIBLIOGRÁFICA

BARRETO, M.C. S.; FIGUEIREDO, M.V. B.; BURITY, H. A. Produção e comportamento reológico de biopolímeros produzidos por rizóbios e caracterização genética. *Revista Brasil Agrociência*. v.17, p.221-227, 2011.

BERENDSEN, R. L.; PIETERSE, C. M. J.; BAKKER, P. A. H. M. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science*, v.17, p.478-486, 2012.

BISWAS, J. C. et al. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. *Agronomy Journal, Madison*, v.92, p.880–886, 2000.

BULGARELLI, D.; SCHLAEPPI, K.; SPAEPEN, S.; VAN THEMAAT, E. V. L.; SCHULZE-LEFERT, P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology*, v.64, p.807-838, 2013.

CAMILIOS NETO, D.; PINOTTI, M. H. P. Exopolissacarídeos de cianobactérias. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*. v.25, p.43-52, 2004.

CASSÁN, F.; VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 33, p. 440-459, 2014.

COSTA, T.L.; SAMPAIO, E.V.S.B.; SALES, M.F. Root and shoot biomasses in the tropical dry forest of semi-arid Northeast Brazil, p.113–123. <http://doi.org/10.1007/s11104-013-2009-1>. 2014.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 22, p. 107–149, 2003.

DOORBOS, R. F.; VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. a review. *Agronomy for Sustainable Development*, v. 32, p. 227-243, 2012.

GAVA, G. J. C.; TRIVELIN, P. C. O.; OLIVEIRA, M. W.; HEINRICHS, R.; SILVA, M. A. Balanço do nitrogênio da uréia (15N) no sistema solo-planta na implantação da semeadura direta na cultura do milho. *Bragantia*, v. 65, p. 477-486, 2006.

GHOSH, P.K.; KUMAR DE, T.; MAITI, T.K. Production and metabolism of indole acetic acid in root nodules and symbiont (*Rhizobium undicola*) isolated from root nodule of aquatic medicinal legume *Neptunia oleracea* Lour. *Journal of Botany*, <http://doi.org/10.1155/2015/575067>. 2015.

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica, Cairo*, v.2, p. 1-15, 2012.

GUIMARÃES, S. L. Aplicação de inoculante turfoso com bactérias diazotróficas e molibdênio em cultivares de arroz adubadas com nitrogênio mineral. 2006. 86 f. Tese

(Doutorado em Fitotecnia)- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica-RJ, 2006.

HERRIDGE, D. F.; PEOPLES, M. B.; BODDEY, R. M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and Soil*, v. 311, p. 1-18, 2008.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. *Biology and Fertility of Soils*, v. 49, p. 791-801, 2013.

KUJUR, M.; GARTIA, S.K.; PATEL, A.K. Quantifying the contribution of different soil properties on enzyme activities in dry tropical ecosystems. *ARPN Journal of Agricultural and Biological Science*, v.7, p. 763-772, 2012.

LAMBRECHT, M. et al. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends in Microbiology*, Cambridge, v. 8, p. 298-300, 2000.

MARSHALL, J. Quorum sensing. *PNAS*. p.110, n.8, 2013.

MOREIRA, F.M.S., SIQUEIRA, J.O. *Microbiologia e bioquímica do solo*. 2a ed. UFLA, Lavras-MG, 2006. 729p.

MORGANTE, C.; ANGELINI, J.; CASTRO, S. FABRA, A. Role of rhizobial exopolysaccharides in crack entry/intercellular infection of peanut. *Soil Biology & Biochemistry*. v. 37 p.1436–1444, 2005.

MORGANTE, C.; CASTRO, S.; FABRA, A. Role of rhizobial EPS in the evasion of peanut defense response during the crack-entry infection process. *Soil Biology & Biochemistry*. v.39, p.1222–1225, 2007.

MOSCATIELLO, R.; SQUARTINI, A.; MARIANI, P.; NAVAZIO, L. Flavonoid-induced calcium signalling in *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*. *New Phytologist*. v.188, p.814–823, 2010.

MOTTA, P.E.F.; CURI, N.; SIQUEIRA, J.O.; VAN RAIJ, B.; FURTINI NETO, A.E.; LIMA, J.M. Adsorção e formas de fósforo em Latossolos: influência da mineralogia e histórico de uso. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.26, p.349-359, 2002.

MÜLLER, S.; HARMS, H.; BLEY, T. Origin and analysis of microbial population heterogeneity in bioprocesses. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 21, p. 100-113, 2010.

OLIVEIRA, A. L. M.; COSTA, K. R.; FERREIRA, D. C.; MILANI, K. M. L.; SANTOS, O. J. A. P.; SILVA, M. B.; ZULUAGA, M. Y. A. Biodiversity of soil bacteria and its applications for a sustainable agriculture. *Biochemistry and Biotechnology*. v.3, n.1, p. 56-77, 2014.

PATTEN, C. L.; BLAKNEY, A. J. C.; COULSON, T. J. D., Activity, distribution and function of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 2012

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

RAMÍREZ, C.A.; KLOPPER, J.W. Plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 depends on inoculum rate and P-related soil properties *Biology and Fertility of Soils*, v. 46, p. 835–844. 2010.

RICHARDSON, A. E.; HOCKING, P. J.; SIMPSON, R. J.; GEORGE, T. S. Plant mechanisms to optimize access to soil phosphorus. *Crop and Pasture Science*, v. 60, p. 124-143, 2009.

RICHARDSON, A. E.; LYNCH, J. P.; RYAN, P. R.; DELHAIZE, E.; SMITH, F. A.; SMITH, S. E.; HARVEY, P. R. RYAN, M. H.; VENEKLAAS, E. J.; LAMBERS, H.; OBERSON, A.; CULVENOR, R. A.; SIMPSON, R. J. Plant and microbial strategies to improve the phosphorus efficiency of agriculture. *Plant and Soil*, v. 349, p. 121-156, 2011.

RODRÍGUEZ-NAVARRO, D. N.; RODRÍGUEZ-CARVAJAL, M. A.; ACOSTA-JURADO, S. et al., Structure and Biological Roles of *Sinorhizobium fredii* HH103 Exopolysaccharide. *PLOS ONE*. v.9, n.12, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0115391.

SAHARAN, B. S.; NEHRA, V. Plant growth promoting rhizobacteria: A critical review. *Life Sciences and Medicine Research*, v.21, p. 1-30, 2011.

SANTOS, L. A.; REIS, V. M. A formação de nódulos em leguminosas. *Seropédica*. Embrapa Agrobiologia, 2008, 14p. (Documentos/ Embrapa Agrobiologia, ISSN 1517-8498; 251).

SANTOS, S. N.; KAVAMURA, V. N.; SILVA, I. S. M.; ANDROEOTE, F. D., Plant Growth Promoter Rhizobacteria in Plants Inhabiting Harsh Tropical Environments and Its Role in Agricultural Improvements. D.K. Maheshwari (ed.), *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*, Microbiology Monographs, 2010.

SELBMANN, L.; ONOFRI, S.; FENICE, N.; FEDERICI, F.; PETRUCCIOLI, M. Production and structural characterization of the exopolysaccharide of the Antarctic fungus *Phoma herbarum* CCFEE5080. *Research in Microbiology*, Amsterdam, v.153,

SILVEIRA, E. L. Inoculações de bactérias promotoras de crescimento no cultivo de arroz em solução nutritiva. 2008. 99 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

THRALL, P. H.; OAKESHOTT, J. G.; FITT, G.; SOUTHERTON, S.; BURDON, J. J.; SHEPPARD, A.; RUSSELL, R. J.; ZALUCKI, M.; HEINO, M.; DENISON, R. F. Evolution in agriculture: the application of evolutionary approaches to the management of biotic interactions in agro-ecosystems. *Evolutionary Applications*, v. 4, p. 200–215, 2011.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems, *Current Opinion in Microbiology*, v. 5, p. 240–245, 2002.

TRIVELIN, P. C. O.; OLIVEIRA, M. W.; VITTI, A. C.; GAVA, G. J. C.; BENDASSOLLI, J. A. Perdas do nitrogênio da uréia no sistema solo planta em dois ciclos de cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 37, p.193-201, 2002.

TSAVKELOVA, E.A.; KLIMOVA, S.Y.; CHERDYNTSEVA, T.A.; NETRUSOV, A.I. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v.42, p.117-126, 2006.

VERESOGLOU, S. D.; MENEXES, G. Impact of inoculation with *Azospirillum* spp. on growth properties and seed yield of wheat: a meta-analysis of studies in the ISI Web of Science from 1981 to 2008. *Plant and Soil*, v. 337, p. 469-480, 2010.

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

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE ESTIRPES BACTERIANAS ORIUNDAS DE NÓDULOS RADICULARES DE *Mimosa tenuiflora* (WILLD) POIR. E *Desmanthus pernambucanus* (L.) THELLUNG

RESUMO

Objetivou-se caracterizar fenotipicamente estirpes bacterianas oriundas de nódulos radiculares das espécies forrageiras: *Desmanthus pernambucanus* e *Mimosa tenuiflora* cultivadas em solos adubados ou não. As amostras de solos para cultivo das plantas em estufa telada foram coletadas nos municípios de Arcoverde, Ibimirim e Serra Talhada, Pernambuco. Os isolados foram caracterizados quanto ao tempo de crescimento de colônias, determinação da forma e diâmetro, elevação, transparência, produção de exopolissacarídeos e coloração das colônias, alteração do pH do meio. Foram determinados o número e a biomassa de nódulos, produção de compostos indólicos e caracterização fenotípica dos isolados bacterianos. Na avaliação cultural, foram observadas como principais características: tempo de crescimento rápido, elevação plana, produção de exopolissacarídeos de pouca a moderada, coloração variando de creme a branca e superfície lisa. As leguminosas tiveram nodulação nos três solos na ausência ou presença de esterco. Adubação com esterco não aumenta o número dos nódulos das plantas *Mimosa tenuiflora*, porém aumenta o número de nódulos das *Desmantus pernambucanus*. Os isolados bacterianos são capazes de produzir compostos indólicos sem adição de triptofano.

Palavras-chave: caatinga, espécies nativas, fixação biológica de nitrogênio, forragem

ABSTRACT

This study aimed to characterize phenotypically bacterial strains derived from root nodules of forages: *Desmanthus pernambucanus* and *Mimosa tenuiflora* grown in fertilized soil or not. Samples of soil for cultivation of plants in the screened greenhouse were collected in the cities of Arcoverde, Ibimirim and Serra Talhada, Pernambuco. The isolates were characterized as the time of growth of colonies, determine the shape and diameter, high transparency, exopolysaccharides production and coloration of the colonies, change of pH. They determined the number and biomass of nodules, production indoles and phenotypic characterization of bacterial isolates. Cultural assessment, were seen as key features: rapid growth time, flat elevation, exopolysaccharides production of low to moderate color ranging from cream to white and smooth surface. Legumes had nodulation in the three soils in the absence or presence of manure. Manuring does not increase the number of nodules of *Mimosa tenuiflora* plants, but increases the number of nodules *Desmantus pernambucanus*. Os bacterial isolates are capable of producing indole compounds without the addition of tryptophan.

Key-works: caatinga, native species, biological nitrogen fixation, forage

Introdução

O solo é uma porção superficial da Terra, que apresenta condições essenciais para o animal, o vegetal e a vida microbiana (Santos et al., 2010). Como habitat, o solo é um sistema heterogêneo, descontínuo e estruturado, formado por micro-habitats discretos com diferentes características químicas, físicas e comunidades biológicas (Moreira e Siqueira, 2006). É considerado um dos maiores reservatórios de biodiversidade microbiana, podendo existir milhares de diferentes espécies de bactérias por cm³ de solo (Torsvik e Ovreas, 2002).

A biodiversidade microbiana no solo é determinada pela combinação das condições ambientais, as quais interagem com os fenótipos dos micróbios, resultando em populações maiores para genótipos adaptados e baixas populações aos menos adaptados. Além da constante competitividade por ocupação e absorção de nutrientes, a quantidade de células bacterianas é dependente das variáveis ambientais, como a profundidade do solo, pH, umidade e temperatura (Santos et al., 2010).

A caracterização cultural dos isolados bacterianos geralmente é a primeira etapa do processo de obtenção dos isolados e avaliação de sua biodiversidade. Nesta etapa as características das bactérias no meio de cultura, geralmente o meio Levedura Manitol Agar (LMA) (Vincent, 1970), são avaliadas e informações relativas ao tempo de crescimento dos isolados, alteração do pH do meio, produção de muco, cores e aspectos das colônias, dentre outros são obtidos (Martins et al., 1997). Estas informações são importantes e permitem a seleção preliminar de isolados, separando-os em grupos de gêneros, por exemplo.

Além das características culturais, outras características fenotípicas podem trazer informações importantes sobre o perfil metabólico das coleções bacterianas e do seu potencial para a promoção do crescimento vegetal. Testes bioquímicos como a estimativa na produção de compostos indólicos (CI) podem indicar estirpes que possam trazer uma melhor desenvoltura na promoção de crescimento vegetal. Assim objetivou-se caracterizar fenotípicamente estirpes bacterianas oriundas de nódulos radiculares das espécies *Mimosa tenuiflora* (Willd) Poiret e *Desmanthus pernambucanus* (L.) Thellung cultivadas em solos provenientes de áreas de Caatinga dos municípios de Arcoverde, Ibimirim e Serra Talhada no estado de Pernambuco, Brasil.

Material e Métodos

1 Áreas de coleta

As áreas selecionadas para coleta de solos pertencem aos municípios de Arcoverde, Ibimirim e Serra Talhada, localizadas na mesorregião do Sertão Pernambucano (Figura 1B). As três áreas foram escolhidas tendo por base a predominância e conservação da vegetação caatinga ao longo da paisagem.

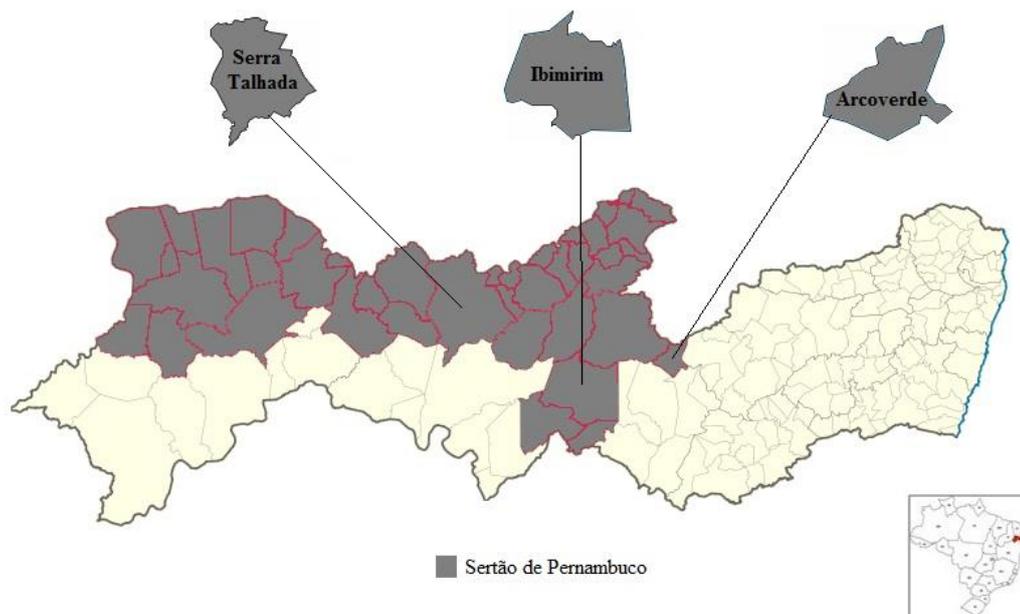
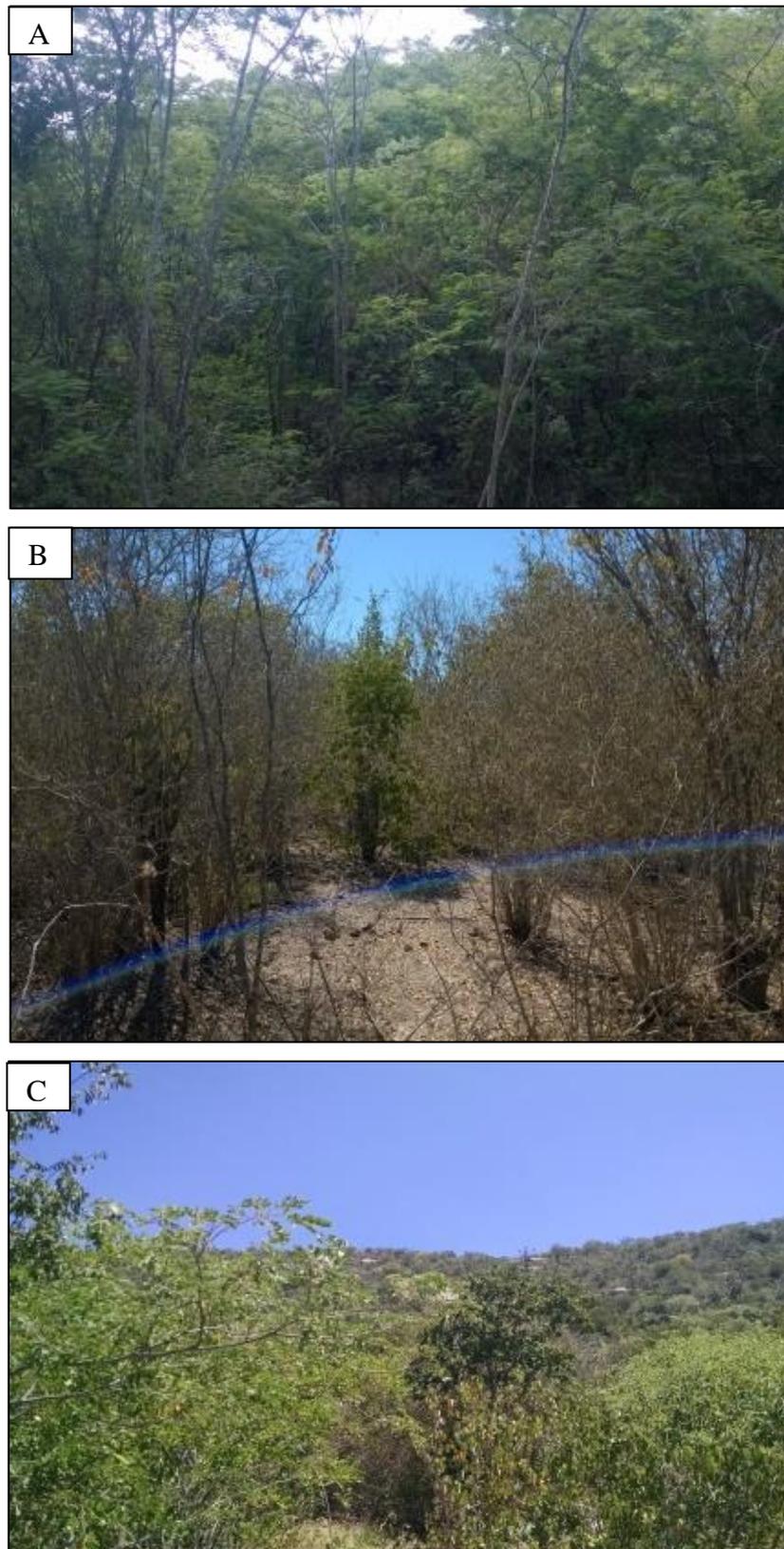


Figura 1B. Localização geográfica dos municípios do Sertão do estado de Pernambuco, selecionados para coleta de solos.

Na área onde foram realizadas as coletas de solo em Arcoverde a vegetação é adensada e possui porte alto, denominada de Caatinga de Cipó. Apresenta-se bem conservada, contudo, foi verificada a entrada de rebanho bovino e aberturas ao longo da vegetação, bem como a ação antrópica com a demarcação de cercas ao longo da vegetação (Figura 2B). A vegetação na área de coleta de Serra Talhada também se apresenta bem conservada, porém, demarcada de cercas ao longo de sua vegetação que é composta por caatinga hiperxerófila.

A caatinga de Ibimirim apresenta-se como uma das mais antropizadas, com presença de corte seletivo de árvores com porte madeireiro, bem como aberturas ao longo da vegetação para tráfego de animais, veículos e pessoas (Figura 2B).



Fonte: Silva, P.T.V. (2016)

Figura 2B. Caatinga de Arcoverde (A), Ibimirim (B) e Serra Talhada (C), Sertão Pernambucano, Brasil.

2 Coleta dos solos

As coletas foram realizadas nos meses de abril e maio do ano 2015. Todos os locais de coleta das amostras de solos foram georreferenciados (Tabela 1) com o uso de GPS (Sistema de Posicionamento Geográfico). Foram coletadas amostras para caracterização química dos solos e para cultivo de plantas isca em estufa telada.

Tabela 1. Georreferenciamento das áreas de coleta de solos nos municípios de Arcoverde, Ibimirim e Serra Talhada, Pernambuco, Brasil.

Ponto*	Município		
	Arcoverde	Ibimirim	Serra Talhada
1	08°26'17.33" S	08°30'27.40" S	07°56'59.44" S
	37° 0'14.08" O	37°33'38.79" O	38°18'2.89" O
2	08°26'8.47" S	08°29'36.90" S	07°56'57.94" S
	37° 0'13.85" O	37°33'11.09" O	38°18'4.30" O
3	08°26'9.78" S	08°29'44.76" S	07°56'56.82" S
	37° 0'13.66" O	37°33'5.24" O	38°17'58.17" O
4	08°26'12.53" S	08°29'53.98" S	07°56'57.41" S
	37° 0'11.00" O	37°33'0.59" O	38°17'56.53" O
5	08°26'13.99" S	08°29'38.74" S	07°56'58.64" S
	37° 0'12.23" O	37°32'58.07" O	38°17'56.82" O
6	08°26'8.47" S	08°29'50.28" S	07°56'59.21" S
	37° 0'13.67" O	37°33'3.58" O	38°18'6.21" O
7	08°26'7.72" S	08°29'54.11" S	07°56'57.41" S
	37° 0'14.82" O	37°33'0.66" O	38°17'55.94" O
8	08°26'13.94" S	08°29'38.67" S	07°56'59.44" S
	37° 0'12.27" O	37°32'57.94" O	38°18'2.89" O

*Os pontos de 1,2, 3, 4 e 5 são referentes às amostras coletadas para caracterização da área e os pontos 6, 7 e 8 são referentes aos pontos de coletas de solo para o cultivo de planta isca.

Para caracterização química, foram coletadas cinco amostras simples de solos em pontos representativos das áreas, realizadas aleatoriamente ao longo de cada área, nas profundidades de 10-20 e 30-40 cm as amostras foram homogeneizadas para a obtenção de amostras compostas da área (Tabela 2).

Tabela 2. Atributos químicos dos solos dos municípios de Arcoverde, Ibimirim e Serra Talhada, Pernambuco, Brasil.

Local	Ca ⁺²	Mg ⁺²	Na ⁺	K ⁺	H ⁺	Al ⁺³	P*	N	CO	MO	pH H ₂ O (1:2,5)
	-----meq/100g de solo-----						mg/100g	-----%-----			
Arcoverde											
10-20 cm	2,20	1,54	0,11	0,28	4,00	0,18	0,81	0,12	1,20	2,07	5,45
30-40 cm	1,77	1,91	0,15	0,21	3,23	0,30	0,06	0,08	0,83	1,43	5,41
Ibimirim											
10-20 cm	3,26	1,82	0,20	0,28	2,42	0,13	1,41	0,10	1,02	1,76	5,19
30-40 cm	1,79	3,56	0,27	0,23	2,10	0,25	1,39	0,08	0,77	1,33	5,00
Serra Talhada											
10-20 cm	4,54	2,15	0,11	0,46	1,85	0,00	4,03	0,04	0,42	0,72	6,65
30-40 cm	3,92	2,40	0,08	0,39	1,75	0,00	4,02	0,04	0,40	0,69	6,64

P*= Fósforo Assimilável; CO = Carbono orgânico; MO = Matéria orgânica.

As coletas dos solos para cultivo das plantas iscas foram feitas aleatoriamente em três pontos distintos de cada área, com distância de no mínimo 10 m entre si. Cada ponto foi demarcado com o auxílio de uma picareta, delimitando uma circunferência com raio de aproximadamente 1 m ao redor de uma fabácea encontrada no local (*Mimosa tenuiflora*) (Figura 3B). O solo foi retirado a uma profundidade de 20 cm (Figura 3B) e também foi realizada a caracterização química (Tabela 3). Todas as amostras de solos (caracterização da área e plantio de planta isca) foram transportadas para o laboratório em caixas térmicas, destorroadas, homogeneizadas e passadas em peneiras com crivo de 2,0 mm.

Tabela 3. Atributos químicos dos solos, destinados ao plantio de planta isca, dos municípios de Arcoverde, Ibimirim e Serra Talhada, Pernambuco, Brasil.

Local	Ca ⁺²	Mg ⁺²	Na ⁺	K ⁺	H ⁺	Al ⁺³	P*	N	CO	MO	pH H ₂ O (1:2,5)
	-----meq/100g de solo-----						mg/100g	-----%-----			
Arcoverde											
(Ponto 1)	1,96	1,02	0,1	0,11	1,9	0,4	1,67	0,06	0,55	0,95	5,01
(Ponto 2)	5,92	1,53	0,11	0,42	0,94	0	4,03	0,1	0,93	1,6	5,24
(Ponto 3)	2,54	1,86	0,15	0,35	3,71	0	0,85	0,14	1,38	2,37	5,66
Ibimirim											
(Ponto 1)	4,15	1,72	0,08	0,32	4,33	0,2	0,38	0,15	1,5	2,58	6
(Ponto 2)	3,33	1,02	0,08	0,37	1,14	0	1,63	0,02	0,19	0,33	6,53
(Ponto 3)	3,83	1,59	0,15	0,37	2,78	0,07	1,89	0,08	0,8	1,38	5,47
Serra Talhada											
(Ponto 1)	3,82	1,2	0,08	0,35	1,82	0	1,65	0,08	0,75	1,29	6,64
(Ponto 2)	3,51	2,15	0,07	0,53	2,14	0	3,68	0,06	0,58	1	6,37
(Ponto 3)	4,57	1,11	0,08	0,35	1,51	0	3,92	0,06	0,62	1,07	6,62

P*= Fósforo Assimilável; CO = Carbono orgânico; MO = Matéria orgânica.



Fonte: Silva, P.T.V. (2016)

Figura 3B. Coleta de solo para análise química (à esquerda) coletas de solo para o plantio de planta isca (à direita).

3 Plantio das plantas isca

O experimento foi conduzido em estufa telada pertencente ao Laboratório de Análise de Sementes do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Areia-PB.

As plantas iscas foram cultivadas em temperatura e luminosidade ambiente. Utilizou-se um delineamento inteiramente casualizado com três repetições, seguindo um arranjo fatorial $2 \times 3 \times 2$, correspondendo a duas espécies de fabácea *Demantus pernambucanus* (Jureminha), *Mimosa tenuiflora* (Jurema Preta), três solos (provenientes dos municípios de Arcoverde, Ibimirim e Serra Talhada) e dois níveis de adubação com esterco caprino (sem adubação e 16 g de esterco caprino por vaso, correspondendo a 20 Mg ha^{-1}). Também foram realizados testes prévios de nodulação com *Vigna unguiculata* (L.) Walpa. (Feijão Macassa) devido a essa espécie possuir baixa especificidade bacteriana (Medeiros et al., 2009), cultivado sob as mesmas condições.

Foram utilizados vasos de polietileno com capacidade de 2,2 kg, previamente desinfestados através da imersão em água sanitária por 30 minutos e em seguida lavados com água e secos ao ar. Antes do plantio, foi realizada a quebra da dormência das sementes por meio da imersão em água quente (entre 80 e 90 °C) durante 30 segundos, subsequentemente em água à temperatura ambiente por um minuto (Bakke et al., 2006).

As sementes foram pré germinadas em gerbox® com areia lavada em água e após a emergência das plântulas, foram transplantadas duas plântulas por vaso contendo 2 kg de solo. O esterco curtido adicionado aos vasos, foi previamente macerado, passado em peneira com crivo de 1 mm e incorporado em todo o solo (Figura 4B). Os solos foram irrigadas com água destilada com capacidade de campo de 80%.



Fonte: Silva, P.T.V. (2016)

Figura 4B. Esterco caprino (à esquerda) e incorporado ao solo (à direita) antes de serem acondicionados nos vasos.

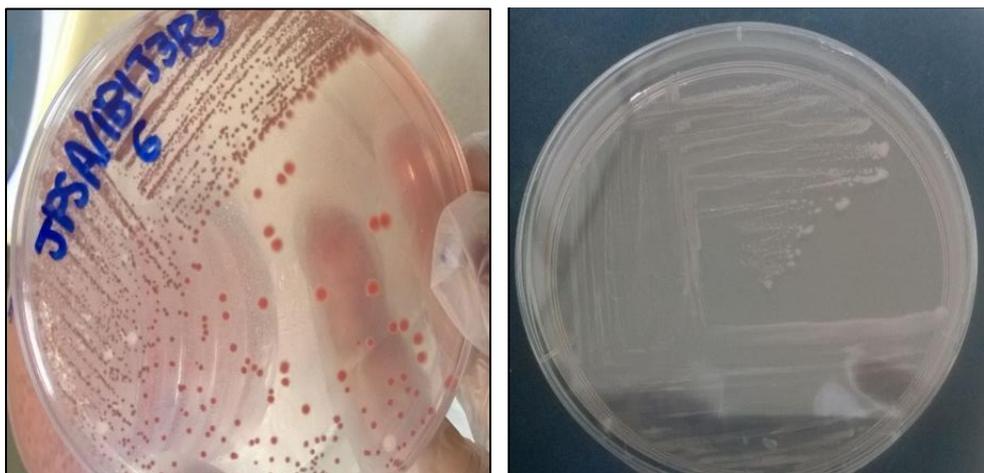
A coleta dos nódulos foi realizada com 65 e 90 dias após o plantio da *Desmanthus pernambucanus* e da *Mimosa tenuiflora*, respectivamente. As plantas foram divididas em parte aérea e raízes. As raízes foram lavadas e secas em papel toalha, logo após foram escolhidos aleatoriamente de dez a quinze nódulos radiculares por planta, sendo acondicionados em recipientes hermeticamente fechados, contendo algodão e sílica perolada com a finalidade de desidratá-los para subsequente isolamento bacteriano.

4 Isolamento e caracterização fenotípica dos isolados

O isolamento e a caracterização fenotípica dos isolados bacterianos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia do Solo da Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias, Areia – PB.

Foram escolhidos aleatoriamente seis nódulos de cada repetição e plaqueados. Os nódulos foram reidratados por aproximadamente 30 minutos com água destilada. Em seguida, realizou-se a desinfestação com álcool etílico a 70% por um minuto, para quebra da tensão superficial, e com hipoclorito de sódio a 1% por dois minutos, para desinfestação superficial. Posteriormente, foram lavados por cinco vezes com água destilada e esterilizada (Hungria & Araújo, 1994).

Após a desinfestação superficial, os nódulos foram macerados com bastão de vidro esterilizado e repicados em placas de Petri contendo o meio de cultura LMA (Levedura Manitol Agar) (Vicent, 1970) com adição do corante vermelho Congo (Fred & Warksman, 1928), para auxiliar na identificação de contaminantes, que em geral absorvem a cor vermelha (Figura 5B). As amostras repicadas foram incubadas em câmara DBO (Demanda Biológica de Oxigênio) a 28 °C por 10 dias.



Fonte: Silva, P.T.V. (2016)

Figura 5B. Placa contaminada (à esquerda) e placa sem contaminante (à direita).

Após o período de purificação dos isolados bacterianos, foi realizada a caracterização morfofisiológica cultural das colônias isoladas em meio de cultura, as quais foram o tempo de crescimento, diâmetro das colônias, forma, elevação, superfície, cor, produção de exopolissacarídeos e alteração do pH do meio.

O tempo de crescimento bacteriano foi classificado em um gradiente que vai de muito rápido a muito lento, onde, colônias que cresceram um dia após da incubação foram classificadas como: tempo de crescimento muito rápido; dois a três dias de incubação: rápido; quatro a cinco dias: intermediário; seis a dez dias: lentas e colônias que tiveram mais de dez dias para serem formadas, foram classificadas como muito lentas (Melloni et al., 2006).

O diâmetro das colônias foi medido com auxílio de um contador de colônias, sendo o tamanho expresso em milímetros. A forma foi classificada como circular, irregular ou puntiforme, a elevação como lenticular, convexa ou umbilicada e a superfície como lisa, rugosa ou papilada (Figura 6B). A coloração foi classificada como amarela, creme, incolor, branca e rosa. As colorações creme, branca e incolor da colônia indicam que as bactérias não alteraram o pH do meio, enquanto que as cores, amarela e

rosa indicam modificação. Já a produção de exopolissacarídeos foi avaliada visualmente em escassa, pouca e moderada (Melloni et al., 2006).

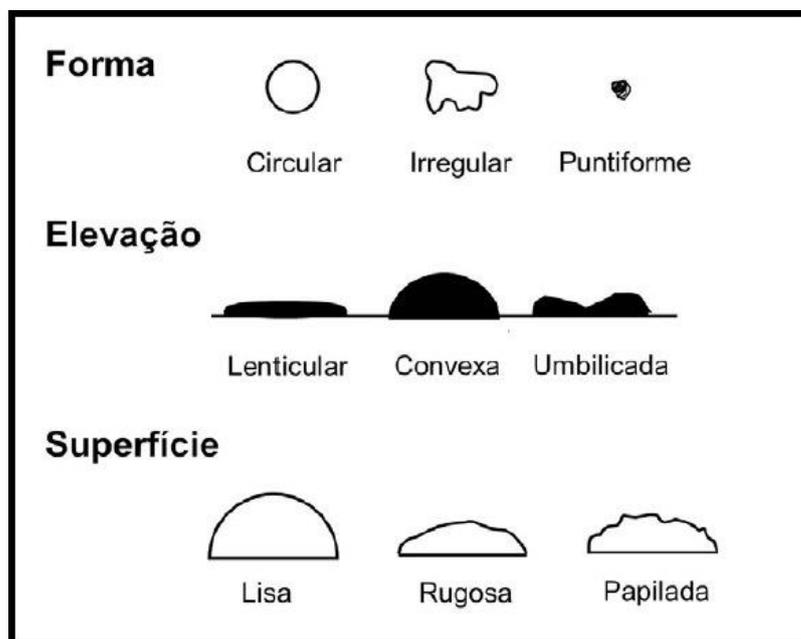


Figura 6B. Morfologia de colônias de bactérias utilizadas para caracterização cultural em meio de cultivo. Fonte: Adaptado de Hungria e Silva (2011).

Para a caracterização fisiológica de modificação do pH pelo aspecto colorimétrico, os isolados de rizóbios foram inoculados em meio LMA modificado pela adição 10 mL. L⁻¹ de azul de bromotimol (Vincent, 1970), para verificar a reação ácida ou básica na presença de manitol suprindo como fonte de carbono. Os isolados acidificantes tornam o meio amarelo, enquanto que os alcalinizantes tornam o meio verde azulado e os neutros não modificam a coloração do meio de cultura variando entre o bege, branco e transparente.

Os resultados do agrupamento fisiológico serviram como base para os cálculos da diversidade dos rizóbios nos diferentes solos. Para isso, cada grupo fisiológico foi considerado como um *táxon* segundo (Santos et al., 2007). Foi utilizado o índice de diversidade de espécies proposto por Shannon (1948).

$$\text{Equação: } H' = \sum_{i=1}^n p_i \times \log_b p_i$$

Onde: p_i é a proporção da espécie em relação ao número total de espécimes encontrados nos levantamentos realizados, \log_b = logaritmo na base b (2). Equitabilidade de Pielou (1958),

$$J = \frac{H'}{H_{max}}$$

Equação:

Onde: H' é o Índice de Shannon e H_{max}' é dado pela seguinte expressão: $H_{max}' = \log_b$.

Dominância de Simpson

$$\text{Equação: } D_s = 1 - \left(\frac{\sum_{i=1}^n n_i \times (n_i - 1)}{N(N - 1)} \right)$$

Onde: n_i é o número de indivíduos de cada espécie; N é o número de indivíduos. Riqueza de espécies de Jackknife 1ª Ordem (Smith & Pontius, 2006).

$$\text{Equação: } E_D = S_{obs} + s_1 \left(\frac{f - 1}{f} \right)$$

Onde: S_{obs} = número de espécies observadas; s_1 = o número de espécie que está presente em somente um agrupamento (espécie de um agrupamento) e f = o número de agrupamento que contém a *iésima* espécie de um agrupamento.

Para os cálculos dos índices supracitados, foi utilizado o software DivEs - Diversidade de Espécies v. 3.0.

5 Quantificação da produção de Compostos indólicos

As avaliações sobre a capacidade dos isolados em produzir compostos indólicos *in vitro* foram realizadas utilizando meio de cultura líquido Levedura e Manitol (LM) (Vicent, 1970) enriquecidos e não enriquecidos com triptofano (Asghar et al., 2002). Os testes foram realizados em 11 isolados selecionados com base na produção de exopolissacarídeos.

Os isolados bacterianos foram inoculados em tubos contendo 10 mL de meio LM com e sem adição de 7 mg de triptofano L⁻¹, a pH 6,8 e incubadas a uma temperatura ambiente sob agitação de 120 rpm por 72 horas.

Posteriormente, 3 mL do meio líquido das culturas foram transferidos para tubos de centrífuga de 10 mL estéreis, sendo centrifugados a 10.000 rpm por 5 minutos. Foi coletado 1,5 mL do sobrenadante e adicionado a 1 mL da solução de Salkowski (2 mL de FeCl₃ + 98 mL de HClO₄ 35%), onde o HClO₄ tem a função de oxidar compostos indólicos e na presença do FeCl₃, produz uma cor rosada, cuja intensidade é proporcional à quantidade de compostos indólicos na amostra. Em seguida, as amostras

foram armazenadas por 30 minutos em local escuro, para que ocorresse a reação de oxidação.

A produção de compostos indólicos pelas bactérias foi quantificada utilizando espectrofotômetro a um comprimento de onda de 530 nm (Gordon & Weber, 1951). A concentração de compostos indólicos nas amostras foi calculada comparando as leituras das amostras inoculadas com uma curva padrão, com zero, 10, 30, 50, 100, 200 e 300 μg de AIA sintético mL^{-1} (Figura 7B).

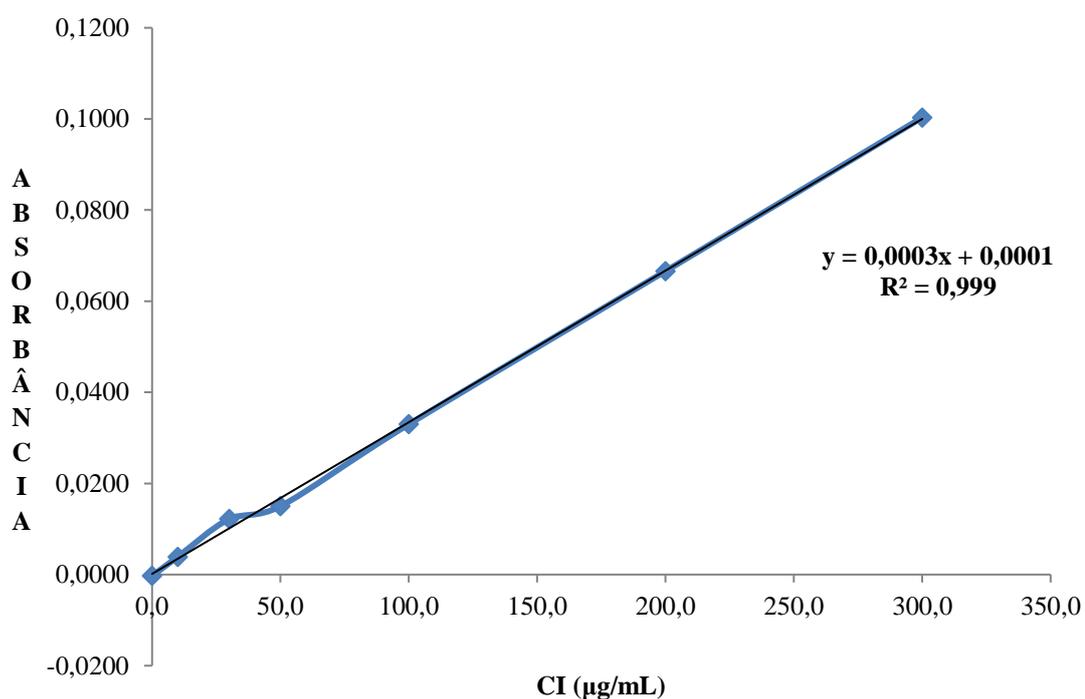


Figura 7B. Curva padrão com diferentes concentrações ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) de compostos indólicos (CI), quantificadas em espectrofotômetro a 530 nm.

Resultados e Discussão

O potencial de nodulação avaliado com a espécie *Vigna unguiculata* L Walp. (feijão macassa), resultou em 100% de nodulação em todos os solos avaliados, indicando que os solos em estudo possuem bactérias capazes de formar nódulos em espécies vegetais da família Fabacea.

A *Mimosa tenuiflora* e a *Desmanthus pernambucanus*, também tiveram a capacidade de nodular nos solos em estudo. Porém, foram encontrados nódulos pequenos e algumas vezes não funcionais, sem apresentar no seu interior a cor vermelha escura, indicando a presença de leghemoglobina, independente dos tratamentos com e sem esterco (Figura 8B). A leghemoglobina é responsável pelo controle da entrada do oxigênio no bacterióide, e quando há uma redução na capacidade de controle da entrada de oxigênio pela leghemoglobina ocorre à diminuição da fixação de nitrogênio (Vorster et al., 2013). Já a presença de nódulos menores e em pequena quantidade pode ser um indicativo de condições ambientais adversas (Vargas et al., 2004).

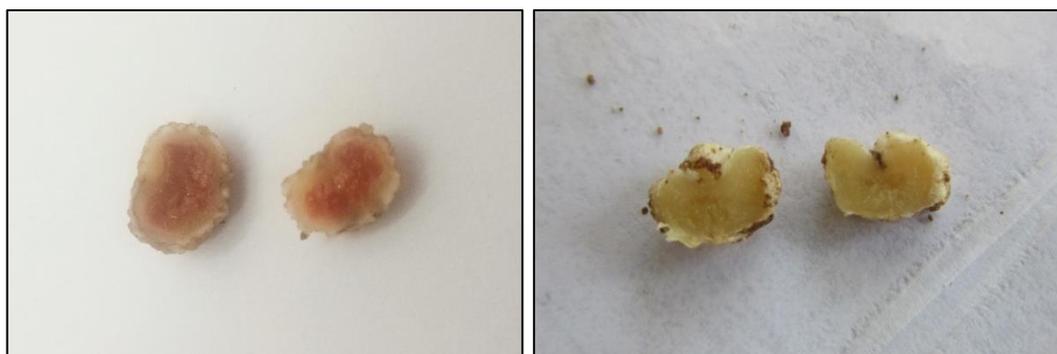


Figura 8B. Nódulo com interior vermelho (à esquerda) Nódulo não funcional (à direita).

Os resultados do potencial de nodulação para a *M. tenuiflora* foram maiores quando comparados com os da *D. pernambucanus* (Figura 9B). Tal resposta pode ser explicada pelo fato de que a *M. tenuiflora* apresenta baixa especificidade simbiótica (Araujo et al., 2011) ou porque os solos foram coletados em torno de plantas de *M. tenuiflora* e utilizados para cultivo das duas espécies, supondo que nestes solos já existiam estirpes específicas para nodulação da *M. tenuiflora*. Contudo, a *D. pernambucanus* é uma das poucas espécies da Caatinga com capacidade de nodulação conhecida, e pouco se sabe sobre as populações de bactérias capazes de formar simbiose com essa fabácea nos solos oriundos da região (Freitas & Sampaio, 2008; Freitas et al., 2011).

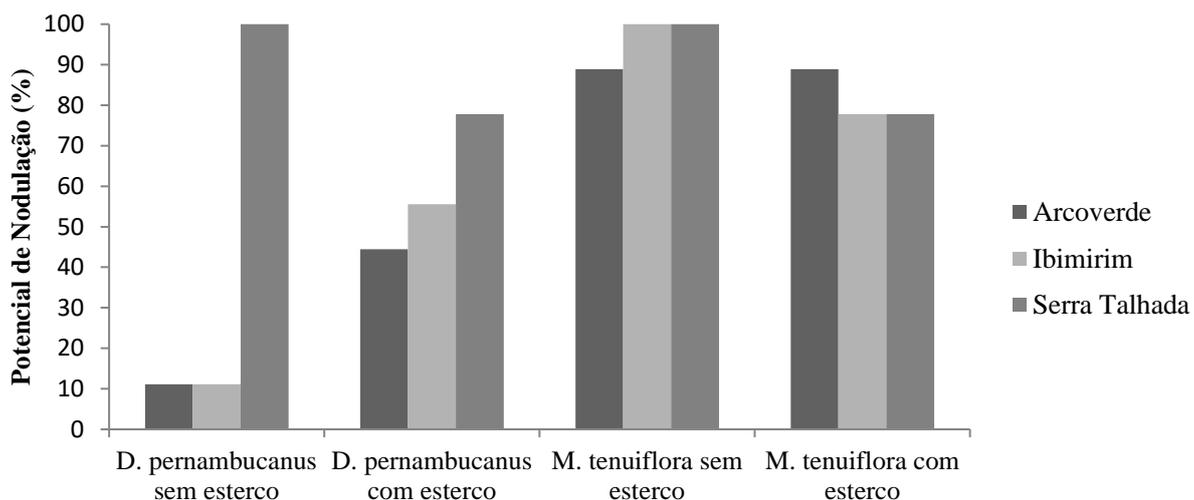


Figura 9B. Potencial de Nodulação Natural obtidos em duas espécies de fabáceas forrageiras do Seminário.

No geral, a aplicação do esterco nos solos promoveu aumentos na matéria seca da parte aérea e nas raízes das forrageiras cultivadas em solos da caatinga, esses aumentos foram maiores nos solos provenientes de Arcoverde, Ibimirim e Serra Talhada respectivamente, correspondendo a incrementos de até três vezes mais matéria seca quando comparada com as plantas que não receberam esterco caprino (Tabela 4). Entre as duas espécies avaliadas, a *M. tenuiflora* apresentou aumento na matéria seca em todos os solos estudados quando comparada com a *D. pernambucanus*.

Tabela 4. Produção de massa seca da parte aérea e raiz de forrageiras nativas da caatinga, em função do tipo de solo e da aplicação do esterco.

Espécies	Arcoverde		Ibimirim		Serra Talhada	
	sem esterco	com esterco	sem esterco	com esterco	sem esterco	com esterco
MS Parte aérea (g)						
<i>Desmantis pernambucanus</i>	1,443	3,405	0,675	2,745	1,00	2,442
<i>Mimosa tenuiflora</i>	3,398	7,029	3,337	5,359	3,361	4,426
MS raiz (g)						
<i>Desmantis pernambucanus</i>	0,666	2,707	0,355	2,446	0,87	2,331
<i>Mimosa tenuiflora</i>	2,778	4,369	3,014	4,013	2,857	3,108

Segundo Freitas et al. (2011), as populações de bactérias capazes de formar simbiose com a *D. pernambucanus* variam de tamanho de acordo com o solo e, na maioria dos casos, podem ser estimuladas pela adição de esterco. O que pode ser a explicação dos resultados nesse estudo, onde, a *D. pernambucanus* com esterco apresentou um maior resultado quando comparado com o tratamento que não recebeu esterco, exceto para as *D. pernambucanus* plantadas em solos provenientes das áreas de Serra Talhada que apresentaram nodulação inferior àquelas que não receberam esterco.

Resultados semelhantes foram encontrados por Freitas et al. (2011), onde foram encontradas plantas com poucos nódulos e biomassa total alta.

As plantas de *M. tenuifloras* cultivadas em solos adubados com esterco caprino apresentaram menor número de nódulos (Tabela 5). Há uma série de fatores externos e internos adicionais que atuam como reguladores negativos da nodulação, esses fatores funcionam como autorreguladores da nodulação, podendo ser ativada por genes, hormônios ou pela presença de nitrogênio suficiente na rizosfera, evitando que haja um gasto energético das plantas (Ferguson et al., 2010). Esse último fator possivelmente explique o baixo número de nódulos neste experimento, onde o esterco caprino provavelmente continha quantidade de nitrogênio satisfatórios para o metabolismo das *M. tenuifloras*. Em contrapartida, os nódulos apresentaram uma maior biomassa, corroborando com Altkins (1984), ao afirmar que nódulos pequenos e não funcionais representam um dreno de fotoassimilados.

Tabela 5. Número e biomassa de nódulos de leguminosas forrageiras nativas da caatinga, cultivadas em solos representativos do semiárido, sem ou com aplicação de esterco caprino, em quantidade equivalente a 20 Mg ha⁻¹.

Espécies	Arcoverde		Ibimirim		Serra Talhada	
	sem esterco	com esterco	sem esterco	com esterco	sem esterco	com esterco
	Número de Nódulos					
<i>Desmantis pernambucanus</i>	4	19	4	28	237	38
<i>Mimosa tenuiflora</i>	255	144	693	413	789	312
	Biomassa de Nódulos (g)					
<i>Desmantis pernambucanus</i>	0,0	0,056	0,017	0,022	0,638	0,093
<i>Mimosa tenuiflora</i>	0,055	0,073	0,078	0,213	0,095	0,126

Todos os isolados em estudo apresentaram crescimento rápido. Segundo Sprent (1994), bactérias do grupo dos rizóbios que apresentam crescimento rápido são comumente encontradas e possuem maior adaptação às regiões Semiáridas, por possuírem um artifício de sobrevivência nessas regiões, sendo mais tolerantes à seca e se multiplicam rapidamente em um curto período de tempo úmido (Santos et al., 2007). Resultado semelhante foi relatado por Silva et al. (2015), trabalhando com isolados de bactérias de nódulos de feijão macassa nativas em solos provenientes de Petrolina –PE, e por Freitas et al. (2007), ao caracterizar isolados de rizóbios de jacatupé cultivados em solo salino do estado de Pernambuco, onde observaram que todos os isolados tiveram crescimento rápido.

O diâmetro, a forma e a superfície das colônias estão diretamente associados à produção de exopolissacarídeos, pois as colônias maiores que 2,0 mm, de forma irregular e superfície lisa geralmente apresentam moderada produção de

exopolissacarídeos. No entanto, quando há escassa produção de exopolissacarídeos, a superfície da colônia aparenta ter grumos sendo denominada como rugosa (Santos et al., 2007).

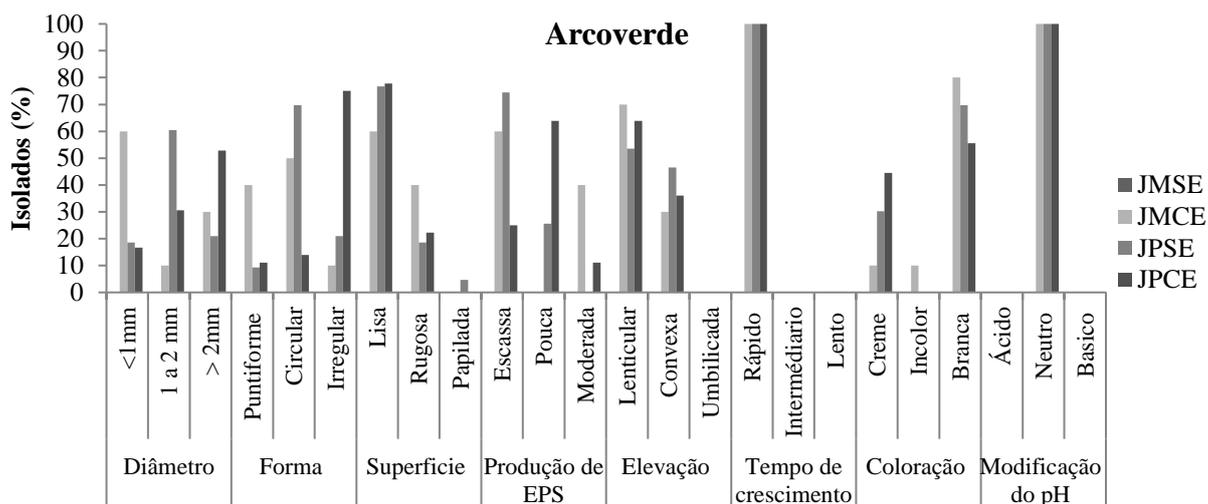
Os exopolissacarídeos (EPS) bacterianos desempenham importante papel na ecologia de bactérias, como as dos gêneros *Sinorhizobium* (Rinaudi et al., 2010), *Mesorhizobium* (Wang et al., 2008) e *Rhizobium* (Fujishige et al., 2008). Segundo Oliveira et al. (2014), os EPS são designados biologicamente para proteger as células microbianas de estresses ambientais, tais como dessecação, estresse osmótico, antibióticos, compostos tóxicos, além de aumentar a capacidade de absorção de água e nutrientes.

No presente estudo os isolados bacterianos apresentaram em sua maioria, escassa e pouca produção de EPS (Figura 10B). Apenas alguns isolados oriundos de nódulos da *M. tenuiflora* com esterco e *D. pernambucanus* com esterco apresentaram produção moderada de EPS. Segundo Duta et al. (2006), a produção de EPS por isolados de rizóbios depende das condições de cultivo das culturas bacterianas. Contudo, todas as bactérias foram submetidas às mesmas condições de meio de cultura.

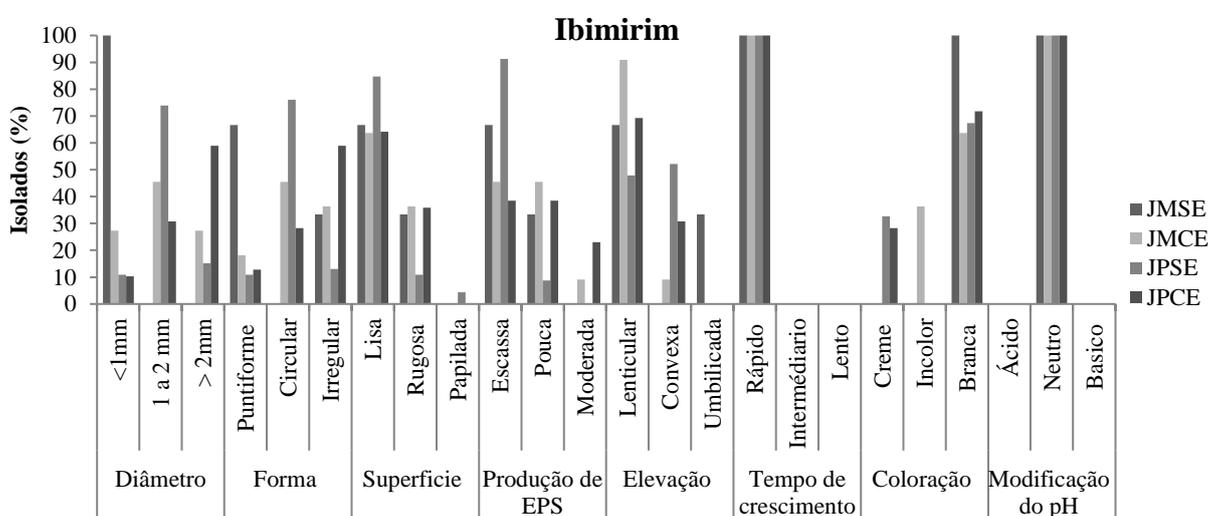
Observou-se que os isolados dos nódulos da *M. tenuiflora* sem esterco em sua grande maioria, formaram colônias com elevação convexa independente dos solos onde foram cultivados. A forma lenticular das colônias predominou em todos os tratamentos e a forma umbiculada nos tratamentos da *D. pernambucanus* com 9% nos solos provenientes de Serra Talhada (9%) e Ibimirim (33%). A coloração das colônias variou entre o creme, incolor e branco. A cor branca nas colônias foi observada com maior intensidade na espécie *D. pernambucanus*, que também foi a única espécie que apresentou a coloração incolor no tratamento em que as plantas iscas receberam esterco nos solos provenientes de Arcoverde (10%), Serra Talhada (12%) e Ibimirim (36%). Esses dados refletem a influência da espécie botânica sobre a cor das colônias e observa-se que o solo exerce pouca ou nenhuma influência nessa característica.

Todas as colônias foram classificadas como neutras, ou seja, não modificaram o pH do meio. Resultados semelhantes foram encontrados por Martins et al. (2003) e Leite et al. (2009) avaliando diversidade de rizóbios em solos do Semiárido, onde os resultados obtidos demonstraram que há abundância de bactérias que não alteram o pH do meio de cultura. Contudo, tais resultados podem indicar presença de grupos bacterianos não isolados na região, podendo representar a ocorrência de espécies ainda não descritas.

A



B



C

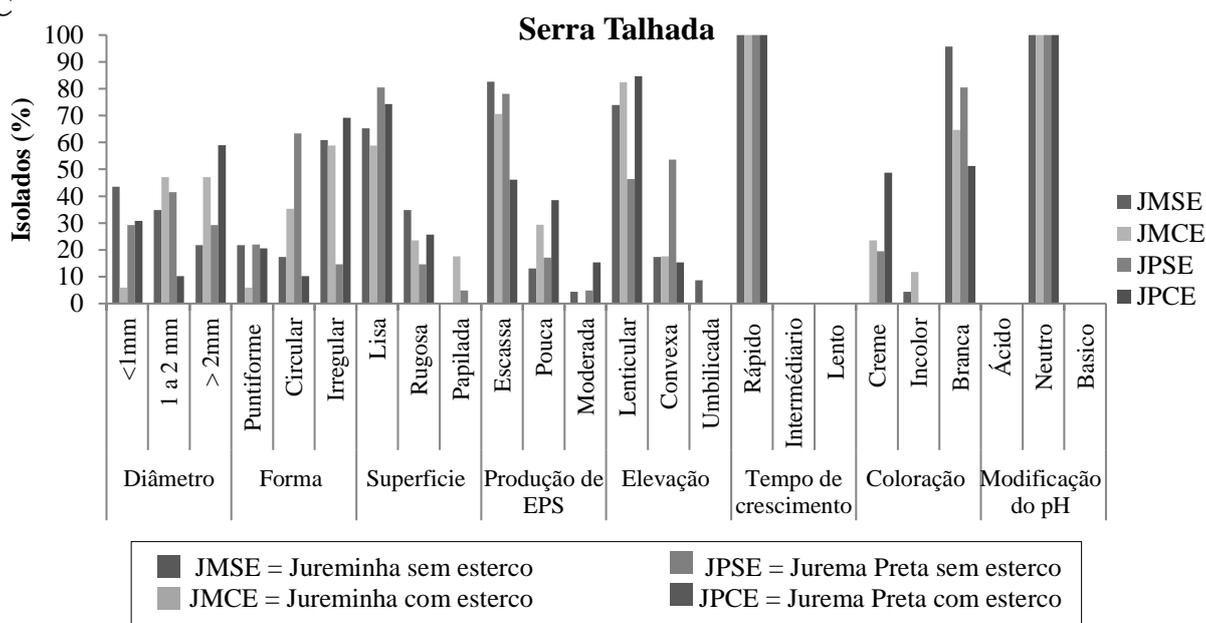


Figura 10B. Características culturais de isolados de rizóbios em meio LMA em (A) Arcoverde, (B) Ibimirim e (C) Serra Talhada.

Os índices de diversidade e equitabilidade obtidos a partir das características fisiológicas dos isolados de bacterianos (Tabela 6) foram considerados intermediários. Segundo Zanzini (2007), os valores gerados pelo índice de Shannon situam-se entre 1,5 e 3,5 e só raramente ultrapassam o valor de 4,5. Esses dois índices apresentaram-se ligeiramente maiores para a espécie *Mimosa tenuiflora* com esterco e *Desmanthus pernambucanus* sem esterco, ambos quando cultivada nos solos provenientes de Ibimirim.

Tabela 6. Diversidade cultural de isolados de rizóbios pelos índices Shanon e Equitabilidade de Pielou, em *M. tenuiflora* e *D. pernambucanus* cultivadas nos solos de Arcoverde, Ibimirim e Serra Talhada, Pernambuco.

Fabácea	Índices	
	Shannon	Pielou
<i>Mimosa tenuiflora</i> SE - Arcoverde	2,61	2,12
<i>Mimosa tenuiflora</i> CE - Arcoverde	2,64	2,14
<i>Desmanthus pernambucanus</i> SE - Arcoverde	-	-
<i>Desmanthus pernambucanus</i> CE - Arcoverde	2,63	2,14
<i>Mimosa tenuiflora</i> SE - Ibimirim	2,53	2,00
<i>Mimosa tenuiflora</i> CE - Ibimirim	2,68	2,17
<i>Desmanthus pernambucanus</i> SE - Ibimirim	2,40	2,22
<i>Desmanthus pernambucanus</i> CE - Ibimirim	2,66	2,16
<i>Mimosa tenuiflora</i> SE - Serra Talhada	2,63	2,09
<i>Mimosa tenuiflora</i> CE - Serra Talhada	2,63	2,13
<i>Desmanthus pernambucanus</i> SE - Serra Talhada	2,60	2,06
<i>Desmanthus pernambucanus</i> CE - Serra Talhada	2,66	2,11

SE = Sem esterco; CE = Com esterco; “-“ = não houve nodulação.

Os índices de diversidade de isolados de *Mimosa tenuiflora* sem esterco cultivados em solos de Ibimirim foram os mais altos em relação aos demais. Segundo Santos et al. (2007), a influência da fabácea na população de rizóbio é um fato comum e tem sido indicada como o fator importante para a composição da comunidade de rizóbios no solo. Os menores índices de diversidade de espécies foram observados nos isolados de *Desmanthus pernambucanus* sem esterco cultivados em solos de Ibimirim.

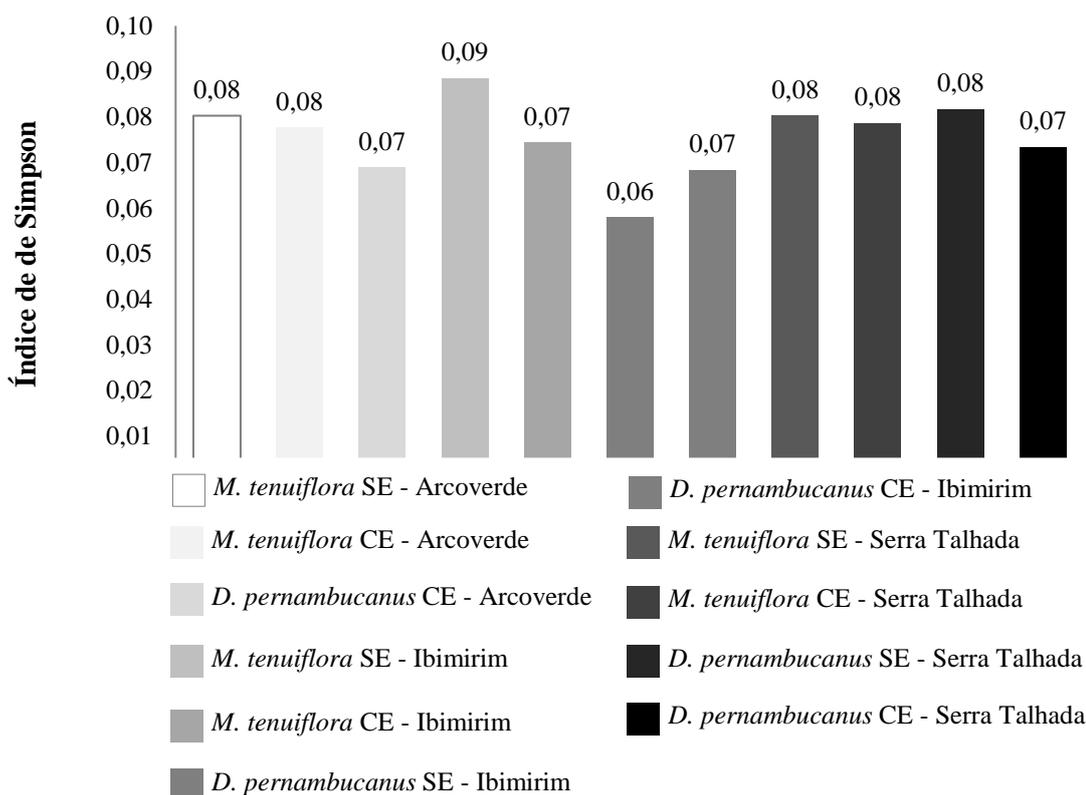
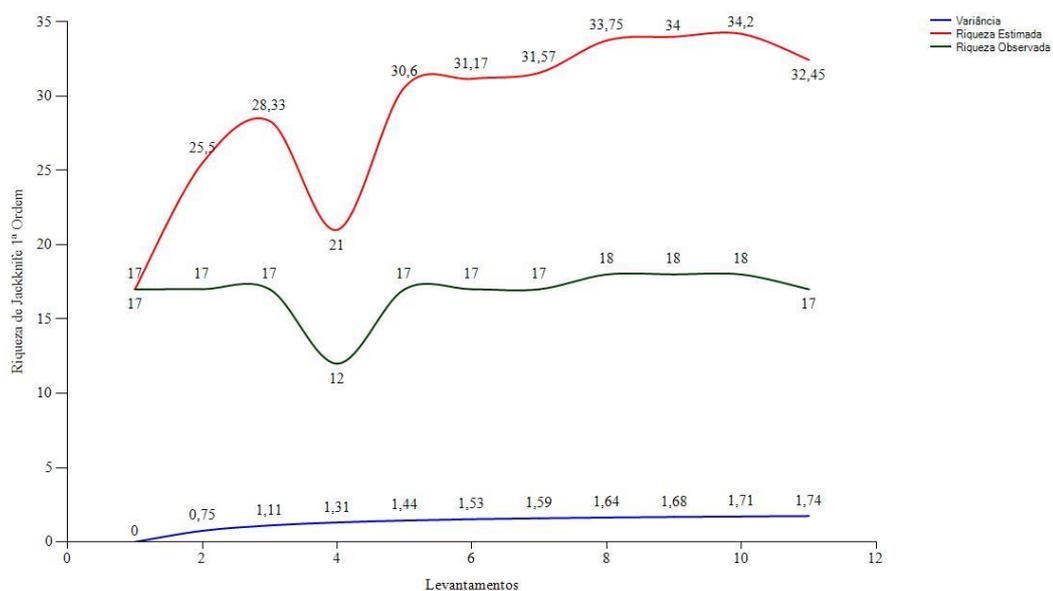


Figura 11B. Índice de Dominância de Simpson de isolados de rizóbios nativos das espécies *Mimosa tenuiflora* e *Desmanthus pernambucanus* cultivadas em solos coletados do Semiárido pernambucano.

A riqueza das espécies foi avaliada segundo o modelo não paramétrico de jackknife 1ª ordem (Figura 12B), este estimador baseia-se na presença ou ausência de espécies únicas numa dada comunidade, ao invés de levar em consideração a abundância das espécies (Smith & Pontius, 2006). A riqueza estimada de rizóbios foi crescente em relação às espécies botânicas *Mimosa tenuiflora*, e *Desmanthus pernambucanus*. Os maiores resultados de riqueza foram observados em *Desmanthus pernambucanus* sem esterco e *Mimosa tenuiflora* com esterco ambos cultivada em solos de Serra Talhada.



- | | |
|--|---|
| 1 - <i>M. tenuiflora</i> SE - Arcoverde | 7 - <i>D. pernambucanus</i> CE - Ibimirim |
| 2 - <i>M. tenuiflora</i> CE - Arcoverde | 8 - <i>M. tenuiflora</i> SE - Serra Talhada |
| 3 - <i>D. pernambucanus</i> CE - Arcoverde | 9 - <i>M. tenuiflora</i> CE - Serra Talhada |
| 4 - <i>M. tenuiflora</i> SE - Ibimirim | 10 - <i>D. pernambucanus</i> SE - Serra Talhada |
| 5 - <i>M. tenuiflora</i> CE - Ibimirim | 11 - <i>D. pernambucanus</i> CE - Serra Talhada |
| 6 - <i>D. pernambucanus</i> SE - Ibimirim | |

Figura 12B. Índice de Riqueza de Espécies Jackknife 1ª Ordem de isolados de rizóbios nativos das espécies *Mimosa tenuiflora* e *Desmanthus pernambucanus* cultivadas em três regiões do Semiárido pernambucano.

De todos os isolados bacterianos avaliados fenotipicamente apenas onze apresentaram produção de EPS moderada. Esses foram avaliados quanto a sua capacidade de produzirem compostos indólicos (CI) (Tabela 7). Cinco dos onze isolados bacterianos foram capazes de produzir CI quando cultivados em meio de cultura LM sem adição de triptofano. Evidenciando que mesmo em ambientes com pequena concentração de triptofano são capazes de produzir CI e possivelmente serem promotores de crescimento vegetal. Em meio de cultura sem enriquecimento com triptofano, os valores médios de CI produzidos pelas bactérias variam entre 19 e 112,3 μg de CI mL^{-1} de caldo de cultura. A estirpe JMCE IBI J3R2 3 foi a bactéria mais produtiva (112,3 μg . mL^{-1}), seguida pela JPCE S.T. J1R2 2, com 87, 5 μg . mL^{-1} , ambas estirpes são oriundas dos nódulos de *D. pernambucanos* cultivada em solo proveniente de Ibimirim com adição de esterco e de nódulos da *M. tenuiflora* cultivada em solo proveniente de Serra Talhada com adição de esterco, respectivamente. Contudo, em

meio de cultura LM enriquecido com 7 mg de triptofano L⁻¹, todas estipes foram estimuladas a produzirem CI.

Tabela 7. Produção de compostos indólicos (CI) por isolados bacterianos oriundos de nódulos de *M. tenuiflora* e *D. pernambucanus*, cultivados em meio de cultura Levedura Manitol (LM), enriquecidos ou não com triptofano.

Isolado	CI sem Triptofano ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CI com Triptofano ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
JMSE S.T. J3R2 3	62,7	172,8
JMCE ARC J3R1 4	-21,2	20,9
JMCE IBI J3R2 3	112,3	520,5
JPSE S.T. J1R1 3	-34,2	242,3
JPSE S.T. J2R1 1	19	349,9
JPCE ARC J2R1 1	-30,5	182,5
JPCE ARC J3R3 4	-1,5	171,6
JPCE IBI J1R1 1	67,3	313,8
JPCE IBI J1R2 6	-10,5	169,8
JPCE S.T. J1R2 2	87,5	152,4
JPCE S.T. J3R2 2	-39,6	178,5

Chagas Jr. et al. (2009), avaliando a produção de CI por isolados que apresentaram colônias de 2-3 mm de diâmetro provenientes de nódulos de caupi, verificaram uma grande variação na produção de CI nas diferentes concentrações de L-triptofano (de 0 a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), com um aumento significativo na produção de CI de acordo com a elevação na concentração do triptofano, desacatando 38 isolados com produção acima de 100 $\mu\text{g. mL}^{-1}$.

Machado et al. (2013), avaliando a produção de CI por rizóbios e o efeito da inoculação dos rizóbios em gramíneas forrageiras puderam relatar que todos os rizóbios foram capazes de produzir CI, mesmo num ambiente com pequena concentração de triptofano e quando suplementados com triptofano esta capacidade foi elevada, sendo a maior quantidade observada de 171.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e todos rizóbios avaliados também promoveram o crescimento de vegetal. Zakharova et al. (1999) e Halda-Alija (2003) observaram em seus experimentos que algumas espécies bacterianas diazotróficas eram capazes de produzir CI na ausência de LTriptofano.

Estudos realizados por Longatti et al. (2013), com estirpes de Burkholderia e Rhizobium isolados de solos da Amazônia, destacaram que todas as estirpes analisadas foram capazes de sintetizar AIA em meio suplementado com L-triptofano e doze estirpes sintetizaram AIA em meio sem a suplementação de L-triptofano variando suas concentrações de 0 a 12,59 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Conclusão

Desmantus pernambucanus e *Mimosa tenuiflora* possuem capacidade de nodular em solos do semiárido, porém essa capacidade depende do tipo de solo.

Adubação com esterco não aumenta o número dos nódulos das plantas *Mimosa tenuiflora*, porém aumenta o número de nódulos das *Desmantus pernambucanus*.

A estirpe JMCE IBI J3R2 3 foi a bactéria mais produtiva, seguida pela JPCE S.T. J1R2 2, ambas são capazes de produzir compostos indólicos sem adição de triptofano.

Referências

ARAÚJO, E.R.; SILVA, T.O.; MENEZES, R.S.C. et al. Biomassa e nutrição mineral de forrageiras cultivadas em solos do semiárido adubados com esterco. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.15, p.890-895, 2011.

ASGHAR, H.N. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in Brassica juncea L. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 35, p. 231-237, 2002.

BAKKE, I.A.; FREIRE, A.L.O; BAKKE, A.O.; ANDRADE, A.P., BRUNO, A.R.L. Water and sodium chloride effects on mimosa tenuiflora (willd.) poiret seed germination. **Revista Caatinga**. v.19:3, p.261-267, 2006.

CHAGAS JÚNIOR, A.F., OLIVEIRA, L.A., OLIVEIRA, N.A. Tolerância à acidez e alumínio tóxico por isolados de rizóbios de solos no Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v.39, n.2, p.467 – 470, 2009.

DUTA, F.P.; FRANCA, F.P. DE LOPES LMD. Optimization of culture conditions for exopolysaccharides production in Rhizobium sp. using the response surface method. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.9, p.391-399, 2006.

FRED EB, WAKSMAN SA. Yeast extract-mannitol agar for laboratory manual of general microbiology. New York, McGraw Hill, 145 p. 1928.

FREITAS, A.D.S.; VIEIRA, C.L.; SANTOS, C.E.R.S.; STAMFORD, N.P.; CATANHO, M.C.; LYRA, P. Caracterização de rizóbios isolados de jacatupé cultivado em solo salino do estado de Pernambuco, Brasil. *Bragantia*. v.66(3), p.497-504, 2007.

FREITAS, A.D.S; SAMPAIO, E.V.S.B. Fixação biológica do N₂ em leguminosas arbóreas da Paraíba e de Pernambuco. In: MENEZES, R.S.C.; SAMPAIO, E.V.S.B.; SALCEDO, I.H. (Eds.) Fertilidade do solo e produção de biomassa no semi-árido. Recife: Editora UFPE, p.27-46, 2008.

FREITAS, A.D.S; SILVA, T.O.; MENEZES, R.S.C.; SAMPAIO, E.V.S.B.; ARAUJO, E.R.; FRAGA, V.S.; Nodulação e fixação de nitrogênio por forrageiras da caatinga cultivadas em solos do semiárido paraibano. **R. Bras. Zootec.**, v.40, n.9, p.1856-1861, 2011.

FUJISHIGE, N.A.; LUM, M.R.; DE HOFF PL, WHITELEGGE JP, FAULL KF, HIRSCH AM. Rhizobium common nod genes are required for biofilm formation. **Molecular Microbiology**, v.67, p.504-515, 2008.

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

HALDA-ALIJA, L. Identification of índole-3-acetic acid producing freshwater wetland rhizosphere bacteria associated with Juncus effusus L. Cambridge **Journal of Microbiology**, v. 49, p. 781-787, 2003.

HUNGRIA M, ARAÚJO RS, **Manual de métodos empregados em estudo de microbiologia agrícola**. EMBRAPA Documentos, v.46, p.1-519, 1994.

HUNGRIA M. & SILVA K.; **Manual de curadores de germoplasma – Microorganismo: Rizóbios e Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia; Brasília, DF; 2011.

LEITE, J; SEIDO, S.L.; PASSOS, S.R.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G. & MARTINS, L.M.V. Biodiversity of rhizobia associated with cowpea cultivars in soil of the lower half of the São Francisco River Valley. **R. Bras. Ci. Solo**, v.33, p.1215-1226, 2009.

MACHADO, R. G.; SÁ, E. L. S.; BRUXEL, M.; GIONGO, A.; SANTOS, N. S.; NUNES, A. S. Indoleacetic Acid Producing Rhizobia Promote Growth of Tanzania grass (*Panicum maximum*) and Pensacola grass (*Paspalum sauriae*). **International Journal Of Agriculture & Biology**, v. 15, n. 5, 2013.

MARTINS, L.M.V. Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de “Rizóbio”. **Comunicado Técnico: Embrapa**, n.19, p.14, 1997.

MARTINS, L.M.V.; RANGEL, F.W.; XAVIER, G.R.; RIBEIRO, J.R.A.; MORGADO, L.B.; NEVES, M.C.P. & RUMJANEK, N.G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: A strategy for improving grain yield in the semi- arid region of Brazil. **Biol. Fert. Soils**, v.38, p.333-339, 2003.

MEDEIROS, E.V., MARTINS, C.M., LIMA, J.A.M., FERNANDES, Y.T.D., OLIVEIRA, V.R., BORGES, W.L., Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do Estado do Rio Grande do Norte. **Actasciagron**.v.3, p. 793, 2009.

MELLONI, R.; MOREIRA, F.M.S.; NÓBREGA, R.S.A; SIQUEIRA, J.O.O. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.30, p. 235-246, 2006.

MOREIRA, F.M.S., Siqueira, J.O. Microbiologia e bioquímica do solo. 2a ed. UFLA, Lavras-MG, p.729, 2006.

OLIVEIRA, C. S., LIRA JUNIOR, M.A.; STAMFORD, N.P.; KUKLINSKY-SOBRAJ J; MOREIRA, F.M.S,. Exopolysaccharides and abiotic stress tolerance in Bacterial isolates from “sabiá” nodules. **Revista Caatinga**, v.27(4), p.240 – 245, 2014.

PIELOU, E. C., The use of point to plant distances in the study of the pattern of plant populations. **Journal Ecologic**. v.47, p. 607-613, 1959.

RINAUDI, L.V.; SORROCHE, F.; ZORREGUIETA, Á.; GIORDANO, W. Analysis of the mucR gene regulating biosynthesis of exopolysaccharides: implications for biofilm formation in *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. **FEMS Microbiology Letters**, v.302, p.15-21, 2010.

SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G.; BORGES, W. L.; BEZERRA, R. V.; FREITAS, A. D. S. Diversidade de rizóbios

capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. Recife, v. 2, p. 249-256, 2007.

SANTOS, S. N.; KAVAMURA, V. N.; SILVA, I. S. M.; ANDROEOTE, F. D., Plant Growth Promoter Rhizobacteria in Plants Inhabiting Harsh Tropical Environments and Its Role in Agricultural Improvements. D.K. Maheshwari (ed.), **Plant Growth and Health Promoting Bacteria**, Microbiology Monographs, 2010.

SHANNON, C.E., (1948) A Mathematical Theory of Communication. System technical Journal. v.27, p. 379-423.

SILVA, A. F.; MENEZES, K. A.; AGUIAR, A. C.; SANTOS, A. B.; OLIVEIRA, X. B.; SENA, P. T. S.; SEIDO, S. L.; MARTINS, L. M. V.; FERNANDES JUNIOR, P.I.; Características Fenotípicas de Bactérias de Nódulos de Feijão-caupi Nativas de um Argissolo Vermelho Amarelo em Petrolina, PE. Parte de livro: **Embrapa Semiárido**, 2015.

SMITH, D. C., Pontius JS, Jackknife Estimator of Species Richness with S-PLUS. Journal of Statistical Software, v.15 (3), p.1-12, 2006.

SOUTO, P. C.; SOUTO, J. S.; MIRANDA, J. R. P. SANTOS RV, ALVES AR. Comunidade microbiana e mesofauna edáficas em solo sob caatinga no semiárido da Paraíba. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v.32(32), p. 51-160, 2008.

SPRENT, J. Evolution and diversity in the legume-rhizobium symbiosis: chaos theory. **Plant and Soil**. Dordrecht, v. 161, p. 1-10, 1994.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems, **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 240–245, 2002.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford, Blackwell Scientific. 164p. 1970.

VORSTER, B. J., SCHLÜTER U, PLESSIS M, WYK S, MAKGOPA ME, INCUBE, QUAIN MD, KUNERT K, FOYER CH. The Cysteine Protease–Cysteine Protease Inhibitor System Explored in Soybean Nodule Development. **Agronomy**, n.3, p. 550-570, 2013.

WANG, P.; ZHONG, Z.; ZHOU, J.; CAI, T.; ZHU, J. Exopolysaccharide biosynthesis is important for *Mesorhizobium tianshanense*: plant host interaction. **Archives of Microbiology**, v.189, p.525-530, 2008.

ZAKHAROVA, E.A.; SHCHERBAKOV, A.A.; BRUDNIK, V.V.; SKRIPKO, N.G.; BULKHIN, N.S.; IGNATOV, V.V. Biosynthesis of indol-3-acetic acid in *Azospirillum brasiliense*: insights from quantum chemistry. **European Journal of Biochemistry**, v. 259, p. 572-576, 1999.

ZANZINI, A. C. S., Descritores de riqueza e diversidade em espécies em estudos ambientais. Lavras: UFLA/FAEPE, 43p, 2007.

APÊNDICE

Continuação...

Jureminha SEM ADUBAÇÃO				*NÃO NODULOU / PERDEU POR CONTAMINAÇÃO											
ISOLADO	Diâmetro			Forma da colônia			Superfície da colônia			Produção de muco			Elevação da colônia		
	<1mm	1 a 2 mm	> 2mm	Puntiforme	Circular	Irregular	Lisa	Rugosa	Papilada	Escassa	Pouca	Moderada	Lenticular	Convexa	Umbilicada
S.T. J2R1 1															
S.T. J2R1 2															
S.T. J2R1 3		1				1		1		1			1		
S.T. J2R1 4		1				1		1		1			1		
S.T. J2R1 5	1					1		1		1			1		
S.T. J2R1 6															
S.T. J2R2 1															
S.T. J2R2 2															
S.T. J2R2 3															
S.T. J2R2 4															
S.T. J2R2 5															
S.T. J2R2 6															
S.T. J2R3 1		1			1		1			1				1	
S.T. J2R3 2		1				1	1			1			1		
S.T. J2R3 3			1			1	1			1			1		
S.T. J2R3 4		1			1		1			1				1	
S.T. J2R3 5	1			1				1		1					1
S.T. J2R3 6		1			1		1			1			1		
S.T. J3R1 1															
S.T. J3R1 2															
S.T. J3R1 3															
S.T. J3R2 1	1					1		1		1			1		
S.T. J3R2 2		1				1	1	1			1		1		
S.T. J3R2 3			1			1	1					1		1	

S.T. J1R3 6											
S.T. J2R1 1											
S.T. J2R1 2											
S.T. J2R1 3	1						1			1	
S.T. J2R1 4	1						1			1	
S.T. J2R1 5	1						1			1	
S.T. J2R1 6											
S.T. J2R2 1											
S.T. J2R2 2											
S.T. J2R2 3											
S.T. J2R2 4											
S.T. J2R2 5											
S.T. J2R2 6											
S.T. J2R3 1	1						1			1	
S.T. J2R3 2	1						1			1	
S.T. J2R3 3	1						1			1	
S.T. J2R3 4	1						1			1	
S.T. J2R3 5	1						1			1	
S.T. J2R3 6	1						1			1	
S.T. J3R1 1											
S.T. J3R1 2											
S.T. J3R1 3											
S.T. J3R2 1	1						1			1	
S.T. J3R2 2	1						1			1	
S.T. J3R2 3	1						1			1	
S.T. J3R2 4											
S.T. J3R2 5	1						1			1	

ANEXO

ANEXO A – REGRAS PARA TRAMITAÇÃO DE ARTIGOS NA REVISTA PESQUISA AGROPECUÁRIA BRASILEIRA

Organização do artigo científico

- O texto deve ser digitado no editor de texto Microsoft Word, em espaço duplo, fonte Times New Roman, corpo 12, folha formato A4, com margens de 2,5 cm e com páginas e linhas numeradas;
- O artigo científico deve ter, no máximo, 20 páginas, incluindo-se as ilustrações (tabelas e figuras), que devem ser limitadas a seis, sempre que possível.

A ordenação do artigo deve ser feita da seguinte forma:

- Artigos em português - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Referências, tabelas e figuras;
- Artigos em inglês - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Abstract, Index terms, título em português, Resumo, Termos para indexação, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, tables, figures;
- Artigos em espanhol - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumen, Términos para indexación; título em inglês, Abstract, Index terms, Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias, cuadros e figuras;
- O título, o resumo e os termos para indexação devem ser vertidos fielmente para o inglês, no caso de artigos redigidos em português e espanhol, e para o português, no caso de artigos redigidos em inglês.

Título

- Deve representar o conteúdo e o objetivo do trabalho e ter no máximo 15 palavras, incluindo-se os artigos, as preposições e as conjunções;
- Deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito;

- Deve ser iniciado com palavras chaves e não com palavras como “efeito” ou “influência”;
- Não deve conter nome científico, exceto de espécies pouco conhecidas; neste caso, apresentar somente o nome binário;
- Não deve conter subtítulo, abreviações, fórmulas e símbolos;
- As palavras do título devem facilitar a recuperação do artigo por índices desenvolvidos por bases de dados que catalogam a literatura.

Nomes dos autores

- Grafar os nomes dos autores com letra inicial maiúscula, por extenso, separados por vírgula; os dois últimos são separados pela conjunção “e”, “y” ou “and”, no caso de artigo em português, espanhol ou em inglês, respectivamente;
- O último sobrenome de cada autor deve ser seguido de um número em algarismo arábico, em forma de expoente, entre parênteses, correspondente à chamada de endereço do autor.

Endereço dos autores

- São apresentados abaixo dos nomes dos autores, o nome e o endereço postal completos da instituição e o endereço eletrônico dos autores, indicados pelo número em algarismo arábico, entre parênteses, em forma de expoente;
- Devem ser agrupados pelo endereço da instituição;
- Os endereços eletrônicos de autores da mesma instituição devem ser separados por vírgula.

Resumo

- O termo Resumo deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda, e separado do texto por travessão;
- Deve conter, no máximo, 200 palavras, incluindo números, preposições, conjunções e artigos;
- Deve ser elaborado em frases curtas e conter o objetivo, o material e os métodos, os resultados e a conclusão;

- Não deve conter citações bibliográficas nem abreviaturas;
- O final do texto deve conter a principal conclusão, com o verbo no presente do indicativo.

Termos para indexação

- A expressão Termos para indexação, seguida de dois-pontos, deve ser grafada em letras minúsculas, exceto a letra inicial;
- Os termos devem ser separados por vírgula e iniciados com letra minúscula;
- Devem ser no mínimo três e no máximo seis, considerando-se que um termo pode possuir duas ou mais palavras;
- Não devem conter palavras que componham o título;
- Devem conter o nome científico (só o nome binário) da espécie estudada;
- Devem, preferencialmente, ser termos contidos no AGROVOC: Multilingual Agricultural Thesaurus ou no Índice de Assuntos da base SciELO.

Introdução

- A palavra Introdução deve ser centralizada e grafada com letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito;
- Deve apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto;
- O último parágrafo deve expressar o objetivo de forma coerente com o descrito no início do Resumo.

Material e Métodos

- A expressão “Material e Métodos” deve ser centralizada e grafada em negrito; os termos Material e Métodos devem ser grafados com letras minúsculas, exceto as letras iniciais;
- Deve ser organizado, de preferência, em ordem cronológica;

- Deve apresentar a descrição do local, a data e o delineamento do experimento, e indicar os tratamentos, o número de repetições e o tamanho da unidade experimental;
- Deve conter a descrição detalhada dos tratamentos e variáveis;
- Deve-se evitar o uso de abreviações ou as siglas;
- Os materiais e os métodos devem ser descritos de modo que outro pesquisador possa repetir o experimento;
- Devem ser evitados detalhes supérfluos e extensas descrições de técnicas de uso corrente;
- Deve conter informação sobre os métodos estatísticos e as transformações de dados;
- Deve-se evitar o uso de subtítulos; quando indispensáveis, grafá-los em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda da página.

Resultados e Discussão

- A expressão Resultados e Discussão deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial;
- Todos os dados apresentados em tabelas ou figuras devem ser discutidos;
- As tabelas e figuras são citadas sequencialmente;
- Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto, mas discutidos em relação aos apresentados por outros autores;
- Evitar o uso de nomes de variáveis e tratamentos abreviados;
- Dados não apresentados não podem ser discutidos;
- Não deve conter afirmações que não possam ser sustentadas pelos dados obtidos no próprio trabalho ou por outros trabalhos citados;
- As chamadas às tabelas ou às figuras devem ser feitas no final da primeira oração do texto em questão; se as demais sentenças do parágrafo referirem-se à mesma tabela ou figura, não é necessária nova chamada;
- Não apresentar os mesmos dados em tabelas e em figuras;
- As novas descobertas devem ser confrontadas com o conhecimento anteriormente obtido.

Conclusões

- O termo Conclusões deve ser centralizado e grafado em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial;
- Devem ser apresentadas em frases curtas, sem comentários adicionais, com o verbo no presente do indicativo;
- Devem ser elaboradas com base no objetivo do trabalho;
- Não podem consistir no resumo dos resultados;
- Devem apresentar as novas descobertas da pesquisa;
- Devem ser numeradas e no máximo cinco.

Agradecimentos

- A palavra Agradecimentos deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial;
- Devem ser breves e diretos, iniciando-se com “Ao, Aos, À ou Às” (pessoas ou instituições);
- Devem conter o motivo do agradecimento.

Referências

- A palavra Referências deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial;
- Devem ser de fontes atuais e de periódicos: pelo menos 70% das referências devem ser dos últimos 10 anos e 70% de artigos de periódicos; - Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 6023 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir;
- Devem ser apresentadas em ordem alfabética dos nomes dos autores, separados por ponto-e-vírgula, sem numeração;
- Devem apresentar os nomes de todos os autores da obra;
- Devem conter os títulos das obras ou dos periódicos grafados em negrito;
- Devem conter somente a obra consultada, no caso de citação de citação;

- Todas as referências devem registrar uma data de publicação, mesmo que aproximada;
- Devem ser trinta, no máximo.

Exemplos:

- Artigos de Anais de Eventos (aceitos apenas trabalhos completos)

AHRENS, S. A fauna silvestre e o manejo sustentável de ecossistemas florestais. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE MANEJO FLORESTAL, 3., 2004, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, 2004. p.153-162.

- Artigos de periódicos

SANTOS, M.A. dos; NICOLÁS, M.F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.67-75, 2006.

- Capítulos de livros

AZEVEDO, D.M.P. de; NÓBREGA, L.B. da; LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S.; BELTRÃO, N.E. de M. Manejo cultural. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.121-160.

- Livros

OTSUBO, A.A.; LORENZI, J.O. **Cultivo da mandioca na Região Centro-Sul do Brasil**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 116p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Sistemas de produção, 6).

- Teses

HAMADA, E. **Desenvolvimento fenológico do trigo (cultivar IAC 24 - Tucuruí), comportamento espectral e utilização de imagens NOAA-AVHRR**. 2000. 152p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- Fontes eletrônicas

EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. **Avaliação dos impactos econômicos, sociais e ambientais da pesquisa da Embrapa Agropecuária Oeste**: relatório do ano de 2003. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 97p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 66). Disponível em: Acesso em: 18 abr. 2006.

Citações

- Não são aceitas citações de resumos, comunicação pessoal, documentos no prelo ou qualquer outra fonte, cujos dados não tenham sido publicados. - A autocitação deve ser evitada. - Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 10520 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir;

Redação das citações dentro de parênteses;

- Citação com um autor: sobrenome grafado com a primeira letra maiúscula, seguido de vírgula e ano de publicação;
- Citação com dois autores: sobrenomes grafados com a primeira letra maiúscula, separados pelo "e" comercial (&), seguidos de vírgula e ano de publicação;
- Citação com mais de dois autores: sobrenome do primeiro autor grafado com a primeira letra maiúscula, seguido da expressão et al., em fonte normal, vírgula e ano de publicação;
- Citação de mais de uma obra: deve obedecer à ordem cronológica e em seguida à ordem alfabética dos autores;
- Citação de mais de uma obra dos mesmos autores: os nomes destes não devem ser repetidos; colocar os anos de publicação separados por vírgula;
- Citação de citação: sobrenome do autor e ano de publicação do documento original, seguido da expressão “citado por” e da citação da obra consultada;
- Deve ser evitada a citação de citação, pois há risco de erro de interpretação; no caso de uso de citação de citação, somente a obra consultada deve constar da lista de referências.

Redação das citações fora de parênteses

- Citações com os nomes dos autores incluídos na sentença: seguem as orientações anteriores, com os anos de publicação entre parênteses; são separadas por vírgula.

Fórmulas, expressões e equações matemáticas

- Devem ser iniciadas à margem esquerda da página e apresentar tamanho padronizado da fonte Times New Roman;
- Não devem apresentar letras em itálico ou negrito, à exceção de símbolos escritos convencionalmente em itálico.

Tabelas

- As tabelas devem ser numeradas sequencialmente, com algarismo arábico, e apresentadas em folhas separadas, no final do texto, após as referências;
- Devem ser autoexplicativas;
- Seus elementos essenciais são: título, cabeçalho, corpo (colunas e linhas) e coluna indicadora dos tratamentos ou das variáveis;
- Os elementos complementares são: notas de rodapé e fontes bibliográficas;
- O título, com ponto no final, deve ser precedido da palavra Tabela, em negrito; deve ser claro, conciso e completo; deve incluir o nome (vulgar ou científico) da espécie e das variáveis dependentes;
- No cabeçalho, os nomes das variáveis que representam o conteúdo de cada coluna devem ser grafados por extenso; se isso não for possível, explicar o significado das abreviaturas no título ou nas notas de rodapé;
- Todas as unidades de medida devem ser apresentadas segundo o Sistema Internacional de Unidades;
- Nas colunas de dados, os valores numéricos devem ser alinhados pelo último algarismo;
- Nenhuma célula (cruzamento de linha com coluna) deve ficar vazia no corpo da tabela; dados não apresentados devem ser representados por hífen, com uma nota de rodapé explicativa;
- Na comparação de médias de tratamentos são utilizadas, no corpo da tabela, na coluna ou na linha, à direita do dado, letras minúsculas ou maiúsculas, com a indicação em nota de rodapé do teste utilizado e a probabilidade;

- Devem ser usados fios horizontais para separar o cabeçalho do título, e do corpo; usá-los ainda na base da tabela, para separar o conteúdo dos elementos complementares. Fios horizontais adicionais podem ser usados dentro do cabeçalho e do corpo; não usar fios verticais;
- As tabelas devem ser editadas em arquivo Word, usando os recursos do menu Tabela; não fazer espaçamento utilizando a barra de espaço do teclado, mas o recurso recuo do menu Formatar Parágrafo.

Notas de rodapé das tabelas

- Notas de fonte: indicam a origem dos dados que constam da tabela; as fontes devem constar nas referências;
- Notas de chamada: são informações de caráter específico sobre partes da tabela, para conceituar dados. São indicadas em algarismo arábico, na forma de expoente, entre parênteses, à direita da palavra ou do número, no título, no cabeçalho, no corpo ou na coluna indicadora. São apresentadas de forma contínua, sem mudança de linha, separadas por ponto;
- Para indicação de significância estatística, são utilizadas, no corpo da tabela, na forma de expoente, à direita do dado, as chamadas ns (não significativo); * e ** (significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente).

Figuras

- São consideradas figuras: gráficos, desenhos, mapas e fotografias usados para ilustrar o texto;
- Só devem acompanhar o texto quando forem absolutamente necessárias à documentação dos fatos descritos;
- O título da figura, sem negrito, deve ser precedido da palavra Figura, do número em algarismo arábico, e do ponto, em negrito;
- Devem ser autoexplicativas;
- A legenda (chave das convenções adotadas) deve ser incluída no corpo da figura, no título, ou entre a figura e o título;
- Nos gráficos, as designações das variáveis dos eixos X e Y devem ter iniciais maiúsculas, e devem ser seguidas das unidades entre parênteses;

- Figuras não originais devem conter, após o título, a fonte de onde foram extraídas; as fontes devem ser referenciadas;
- O crédito para o autor de fotografias é obrigatório, como também é obrigatório o crédito para o autor de desenhos e gráficos que tenham exigido ação criativa em sua elaboração. As unidades, a fonte (Times New Roman) e o corpo das letras em todas as figuras devem ser padronizados;
- Os pontos das curvas devem ser representados por marcadores contrastantes, como: círculo, quadrado, triângulo ou losango (cheios ou vazios);
- Os números que representam as grandezas e respectivas marcas devem ficar fora do quadrante;
- As curvas devem ser identificadas na própria figura, evitando o excesso de informações que comprometa o entendimento do gráfico;
- Devem ser elaboradas de forma a apresentar qualidade necessária à boa reprodução gráfica e medir 8,5 ou 17,5 cm de largura;
- Devem ser gravadas nos programas Word, Excel ou Corel Draw, para possibilitar a edição em possíveis correções;
- Usar fios com, no mínimo, 3/4 ponto de espessura;
- No caso de gráfico de barras e colunas, usar escala de cinza (exemplo: 0, 25, 50, 75 e 100%, para cinco variáveis);
- Não usar negrito nas figuras;
- As figuras na forma de fotografias devem ter resolução de, no mínimo, 300 dpi e ser gravadas em arquivos extensão TIF, separados do arquivo do texto;
- Evitar usar cores nas figuras; as fotografias, porém, podem ser coloridas.

Notas Científicas

- Notas científicas são breves comunicações, cuja publicação imediata é justificada, por se tratar de fato inédito de importância, mas com volume insuficiente para constituir um artigo científico completo.

Apresentação de Notas Científicas

- A ordenação da Nota Científica deve ser feita da seguinte forma: título, autoria (com as chamadas para endereço dos autores), Resumo, Termos para indexação,

título em inglês, Abstract, Index terms, texto propriamente dito (incluindo introdução, material e métodos, resultados e discussão, e conclusão, sem divisão),

Referências, tabelas e figuras;

- As normas de apresentação da Nota Científica são as mesmas do Artigo Científico, exceto nos seguintes casos:
- Resumo com 100 palavras, no máximo;
- Deve ter apenas oito páginas, incluindo-se tabelas e figuras;
- Deve apresentar, no máximo, 15 referências e duas ilustrações (tabelas e figuras).