

# Efeitos ambientais sobre a diversidade rizobiana e troca de sinais entre rizóbio e planta

---

Projeto submetido para solicitação de bolsa  
de Pesquisador Visitante Especial, edital  
2013, segunda chamada

**Mario Andrade Lira Junior**

**Maio de 2013**

## Conteúdo

|   |    |
|---|----|
| Conteúdo.....                               | 2  |
| Identificação da proposta .....             | 4  |
| Título.....                                 | 4  |
| Solicitante .....                           | 4  |
| Resumo .....                                | 4  |
| Qualificação do tema .....                  | 5  |
| Objetivos e metas.....                      | 8  |
| Objetivo geral .....                        | 8  |
| Objetivos específicos .....                 | 8  |
| Metas.....                                  | 9  |
| Metodologia .....                           | 9  |
| Amostragem.....                             | 10 |
| Obtenção e caracterização dos isolados..... | 11 |
| Resistência .....                           | 13 |
| Exudação.....                               | 14 |
| LCO .....                                   | 15 |
| Eficiência .....                            | 15 |
| Compatibilidade.....                        | 17 |
| Principais contribuições .....              | 17 |
| Científicas .....                           | 17 |
| Formação de recursos humanos.....           | 18 |
| Tecnológicas .....                          | 18 |
| Didáticas .....                             | 18 |
| Orçamento detalhado .....                   | 19 |
| Cronograma físico-financeiro .....          | 20 |

|   |    |
|---|----|
| Viagens de trabalho .....   | 20 |
| Identificação dos demais participantes no projeto .....                                   | 21 |
| Atividades específicas dos participantes .....  | 21 |
| Equipe nacional de pesquisadores .....  | 21 |
| Pesquisador Visitante Especial .....  | 22 |
| Bolsista de pós-doutorado.....  | 22 |
| Bolsistas de doutorado sanduíche .....  | 22 |
| Ganhos a serem obtidos pela UFRPE .....   | 23 |
| Identificação de parcerias já estabelecidas .....   | 23 |
| Disponibilidade de infra-estrutura e apoio técnico para o desenvolvimento do projeto..... | 24 |
| Estimativa dos recursos financeiros a serem aportados por outras fontes .....             | 24 |
| Literatura.....   | 25 |

## Identificação da proposta

### Título

Efeitos ambientais sobre a diversidade rizobiana para leguminosas forrageiras tropicais

### Solicitante

Mario de Andrade Lira Junior

### Resumo

A pecuária brasileira é principalmente baseada em pastagens, que em grande parte do Brasil apresentam problemas de degradação. A fixação biológica de nitrogênio por leguminosas forrageiras tem grande potencial para reduzir estes problemas. Esta depende da diversidade e densidade populacional rizobiana, muito variáveis. Como é inviável avaliar a população rizobiana de uma área antes do plantio, a inoculação com estirpes selecionadas permite reduzir os riscos da alta variabilidade da população rizobiana nativa. Para isto é necessário selecionar estirpes com alto potencial de fixação, o que por sua vez demanda a avaliação da biodiversidade rizobiana e de grande número de estirpes. Assim, este projeto visa avaliar a população rizobiana encontrada em 11 municípios do semiárido pernambucano, com base em amostras já coletadas em 299 pontos de coleta, totalizando cerca de 1200 amostras de solo coletadas junto a plantas de *Desmanthus*, *Macroptilium* e *Stylosanthes*. Estas amostras serão agrupadas com base em suas características de fertilidade e física, já determinadas, sendo selecionadas amostras representando os diferentes municípios e leguminosas para a inoculação de caupi (*Vigna unguiculata*) como planta isca. Os isolados obtidos serão caracterizados fenotipicamente e agrupados, com representantes de cada grupo a 100% de similaridade sendo usados para BOX-PCR. Os perfis de BOX-PCR serão utilizados para agrupamento e representantes dos novos grupos serão submetidos a sequenciamento dos genes 16S, recA, glnII nodA, nodD e nifK para identificação ao nível de espécie. Também será feito agrupamento separadamente para cada combinação grupo de solo de origem e leguminosa, e para cada grupo de solo. A primeira análise permitirá a avaliação do efeito da leguminosa sobre a biodiversidade rizobiana, utilizando os grupos

de solo como repetições verdadeiras o que permite a análise estatística. O segundo agrupamento permitirá análise de correlação entre características edafoclimáticas dos locais de origem e biodiversidade rizobiana. Isolados selecionados aleatoriamente para representar as características dos solos de origem serão avaliados quanto à sua resistência à acidez e alcalinidade do solo com pH na faixa de 4 a 9, acidez e alumínio na faixa de pH 4 a 6, com alumínio trocável entre 0 e 2  $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$  e salinidade para teores de  $\text{Na}^+$  entre 0 e 20  $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$ . A resistência será avaliada *in vitro* em duas etapas, sendo a primeira apenas resistência/sensitividade, determinando a proporção de resistentes, enquanto a segunda etapa utilizará os isolados considerados resistentes na primeira etapa, que serão cultivadas em meio líquido sendo avaliado o efeito do estresse abiótico sobre o desenvolvimento destes isolados. Isolados com diferentes padrões de resistência serão avaliados quanto à liberação de LCOs quando submetidos a estresse ambiental, após fornecimento de flavonoides exudados pelo caupi sob as mesmas condições. Os isolados utilizados para avaliação da resistência aos estresses ambientais serão avaliados quanto à eficiência simbiótica no caupi. A etapa final do projeto será avaliação da compatibilidade e eficiência simbiótica das estirpes eficientes com o caupi com todas as espécies de *Desmanthus*, *Macroptilium* e *Stylosanthes*.

## Qualificação do tema

A área total de pastagem nativas e cultivadas no Brasil em 2006 foi de pouco mais de 170 milhões de hectares (Ibge, 2010), sendo a base da alimentação animal para a produção de carne, leite e outros produtos. No entanto, parte apreciável destas pastagens apresenta algum estágio de degradação, geralmente devido a manejo inadequado do pastejo e/ou da fertilidade do solo. Dentre os nutrientes, geralmente os principais responsáveis pelo declínio dos pastos são as deficiências de N e P (Boddey *et al.*, 2004).

Deste modo, a introdução de leguminosas surge como uma alternativa interessante, devido à fixação de  $\text{N}_2$  atmosférico, pela simbiose entre a maior parte das leguminosas e bactérias tradicionalmente conhecidas como rizóbio, que apresenta grande variabilidade em sua capacidade de fixação biológica de nitrogênio; quanto à sua capacidade de sobrevivência no solo; e quanto à competitividade (Lima *et al.*, 2009; Torres *et al.*, 2009). Devido a esta variabilidade do microsimbionte, não se pode

garantir que haja uma população de alta capacidade fixadora, em números suficientes para permitir uma fixação de nitrogênio suficiente para boa produção de biomassa (Denton *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2009)

Como determinar a eficiência e tamanho da população rizobiana antes de implantar uma leguminosa não é viável, a prática da inoculação prévia das sementes começou a ser adotada no início do século XX (Albareda *et al.*, 2008). Para isto são selecionadas estirpes rizobianas com alta capacidade de fixação de nitrogênio na maior parte dos ambientes em que a leguminosa será implantada, com as sementes sendo inoculadas com este material (Araújo *et al.*, 2012).

Como a interação leguminosa-rizóbio é específica, dependente de intensa troca de sinais (Hirsch e Fujishige, 2012) e muito afetada por condições ambientais, há necessidade de obtenção de novas estirpes rizobianas (Deaker *et al.*, 2005). Além da importância tecnológica, esta busca constante por estirpes melhores também tem grande importância científica, ao melhorar o entendimento da diversidade rizobiana (Chagas Júnior *et al.*, 2010; Elboutahiri *et al.*, 2010; Pule-Meulenberg *et al.*, 2010; Risal *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Aserse *et al.*, 2012; Mothapo *et al.*, 2013).

Estes novos materiais devem ser obtidos por amostragem de áreas de ocorrência das leguminosas em estudo, preferencialmente seus centros de origem, onde se pode esperar encontrar a maior variabilidade tanto da planta quanto de seus micro-organismos associados, sejam eles patogênicos ou simbióticos (Andronov *et al.*, 2003). No caso de várias das leguminosas forrageiras com maior potencial de uso no mundo tropical, como representantes dos gêneros *Stylosanthes* e *Macroptilium* (Fernandes *et al.*, 2005; Shelton *et al.*, 2005; Chandra, 2009), um dos principais centros de origem é a caatinga nordestina (Date, 1997).

Este bioma se caracteriza, entre outros pontos, por grande diversidade de solos. Como as características do solo são reconhecidas como grandes fontes de diversidade bacteriana (Lombardi *et al.*, 2009; Ramírez-Bahena *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2009; Elboutahiri *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2010; Deng *et al.*, 2011), torna-se importante avaliar diversas combinações entre estes fatores, de modo a obter um “corte” o mais amplo possível da variabilidade existente, e, portanto a maior chance possível de obter materiais promissores.

No entanto, uma característica em comum da maioria dos trabalhos avaliando a diversidade microbiana é sua base relativamente estreita. Por exemplo, foram utilizados apenas quatro locais de coleta para avaliação do histórico de cultivo na diversidade de *Bradyrhizobium* simbiote do amendoim (*Arachis hypogaea*) na Argentina (Nievas *et al.*, 2012) com um total de 40 isolados, enquanto cinco pontos de coleta foram utilizados para avaliar o efeito de três regiões agroecológicas do Nepal sobre a diversidade rizobiana para *Vigna radiata* com base em somente 129 isolados (Risal *et al.*, 2011) ou o uso de apenas um campo experimental em cada uma de cinco regiões do Japão foi usado para avaliação da diversidade rizobiana para caupi (*Vigna unguiculata*) usando 100 estirpes (Sarr *et al.*, 2011). Já em uma avaliação da diversidade rizobiana para feijão na Etiópia foram examinadas 32 estirpes oriundas de 30 sites de coleta (Aserse *et al.*, 2012), enquanto apenas 25 estirpes serviram de base para comparar a diversidade rizobiana de *Medicago* das regiões sub-tropical e temperadas do Japão (Djedidi *et al.*, 2011b).

Por outro lado, algumas correntes de trabalho têm uma larga base de pontos de coleta e isolados, tais como os 98 grids de coleta e 1890 isolados obtidos com siratro (*Macroptilium atropurpureum*) como planta isca (Lima *et al.*, 2009). Isto permite que o efeito de diferentes usos do solo seja avaliado por meio de testes estatísticos, e portanto possa ter o nível de confiança nas conclusões determinado estatisticamente.

Um ponto que não tem sido investigado é o efeito das condições ambientais sobre o perfil de emissões de lipo-chito-oligossacarídeos (LCO) por parte dos rizóbios, e a possível consequência desta emissão sobre eficiência e capacidade simbiótica destas bactérias com diferentes parceiros. Já se sabe, por exemplo, que quando a soja é cultivada em solos com temperatura abaixo de 17,5°C há redução na exudação de flavonoides, com impacto na simbiose com *Bradyrhizobium* (Zhang *et al.*, 2002; Duzan *et al.*, 2004; Mabood e Smith, 2005), mas há um crescente conjunto de trabalhos indicando que este efeito também é observado para outras leguminosas e outros estresses ambientais (Lira Junior *et al.*, 2003; Mabood *et al.*, 2006a; Mabood *et al.*, 2006b; Miransari e Smith, 2007; Almaraz *et al.*, 2009; Miransari e Smith, 2009; Dardanelli *et al.*, 2012; Ghasem *et al.*, 2012; Ferguson *et al.*, 2013).

No entanto, a vasta maioria da literatura trata do efeito ambiental sobre a exudação de flavonoides pela leguminosa, ao mesmo tempo em que pouco ou nada da literatura trata de leguminosas tropicais, com a exceção de trabalhos com *Phaseolus* no

início dos trabalhos sobre troca de sinais (Phillips *et al.*, 1990; Hungria *et al.*, 1992). Outro ponto interessante em que a literatura ainda é relativamente escassa é sobre o efeito dos LCOs produzidos por rizóbios quando aplicados diretamente à leguminosa, inclusive com efeitos na parte aérea ou em não-leguminosas (Khan *et al.*, 2012; Kidaj *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Marks *et al.*, 2013), o que merece ser mais explorado tendo em vista o potencial para uso biotecnológico.

Assim, este projeto consiste de um levantamento da diversidade rizobiana para as leguminosas nativas dos gêneros *Desmanthus*, *Macroptilium* e *Stylosanthes* no semiárido pernambucano, avaliando o efeito de características edafo-climáticas sobre a diversidade e capacidade simbiótica, e o efeito desta diversidade e de estresses ambientais sobre a emissão de LCOs por estas bactérias *in vitro*

## Objetivos e metas

### Objetivo geral

Avaliar a diversidade rizobiana existente para espécies nativas dos gêneros *Desmanthus*, *Macroptilium* e *Stylosanthes*, como possível fonte de estirpes de alto potencial para produção de inoculantes, bem como o efeito de diferentes condições edáficas no solo de origem sobre a resistência bacteriana aos estresses ambientais mais frequentes *in vitro* e o efeito da diversidade e dos estresses sobre a exudação de LCOs *in vitro*.

### Objetivos específicos

Avaliar o efeito de características edafo-climáticas do ambiente de origem sobre a diversidade rizobiana.

Avaliar o efeito de características edafo-climáticas do ambiente de origem sobre a resistência a diferentes estresses ambientais *in vitro*

Avaliar o efeito de características edafo-climáticas do ambiente de origem sobre a eficiência simbiótica dos isolados rizobianos em caupi.

Avaliar a compatibilidade simbiótica de isolados obtidos com caupi como planta isca com espécies nativas de *Desmanthus*, *Macroptilium* e *Stylosanthes*.

Avaliar o efeito de estresses ambientais *in vitro* sobre a exudação de flavonoides por caupi.



Avaliar o efeito de estresses ambientais *in vitro* sobre a exudação de LCOs por diferentes isolados rizobianos de caupi.

Avaliar o efeito de flavonoides excretados por caupi sob diferentes estresses ambientais sobre a exudação de LCOs por diferentes isolados rizobianos de caupi.

Relacionar o perfil de LCOs exudados e compatibilidade simbiótica de isolados rizobianos de caupi com espécies nativas de *Desmanthus*, *Macroptillium* e *Stylosanthes*.

## Metas

Obter 500 isolados rizobianos utilizando o caupi como planta isca, caracterizá-los e avaliar sua diversidade e eficiência simbiótica.

Identificar e recomendar pelo menos duas estirpes com potencial para uso na produção de inoculantes para cada espécie de forrageira avaliada.

## Metodologia

Este projeto pode ser dividido nas seguintes etapas: amostragem do solo (amostragem); obtenção de isolados e sua caracterização morfo-fisiológica e genética (isolamento e caracterização); avaliação da resistência a estresses ambientais em função da origem do isolado (resistência); avaliação do efeito de estresses ambientais sobre a exudação de flavonoides por caupi (exudação); avaliação do efeito de estresses ambientais e adição de flavonoides sobre a exudação de LCOs (LCO); avaliação do efeito do ambiente de origem sobre a eficiência simbiótica em caupi (eficiência) avaliação de compatibilidade e capacidade simbiótica dos isolados rizobianos obtidos com caupi com *Desmanthus*, *Macroptillium* e *Stylosanthes* (compatibilidade), .. Assim, a metodologia será descrita seguindo estes diferentes aspectos.

Este projeto é um componente de macro-projeto em desenvolvimento na UFRPE para avaliação de ocorrência, diversidade e potencial forrageiro de leguminosas nativas do semiárido pernambucano, já em andamento, com financiamento de BNB, CAPES, CNPq e FACEPE, obtido pelos diferentes integrantes para seus respectivos sub-projetos. Assim sendo, a etapa de amostragem e caracterização do solo já foi realizada, sendo incluída neste projeto para permitir o entendimento das atividades, ao

passo que a obtenção de isolados e caracterização está em andamento, sendo tema de dissertações de mestrado de orientados do solicitante.

## Amostragem

Foram realizadas coletas de solo em 11 municípios representativos do semiárido de Pernambuco: Santa Cruz (microregião de Araripina), Parnamirim (Salgueiro), Serra Talhada (Sertão do Pajeú), Sertânia (Sertão do Moxotó), Petrolina (Petrolina), Floresta (Itaparica), Tupanatinga (Vale do Ipanema), Jataúba (Vale do Ipojuca), Santa Cruz do Capibaribe (Alto Capibaribe), Bom Jardim (Médio Capibaribe) e Caetés (Garanhuns).

Para cada município, foram identificados os tipos de solo existentes, com base no Zoneamento Agroecológico do Estado de Pernambuco (Silva *et al.*, 2001). A maior área de ocorrência de cada tipo de solo foi utilizada para realização da amostragem, com definição das rotas de coleta em cada área utilizando o Google Earth®(Google Inc., 2010). Foram realizadas coletas em três a cinco pontos em cada área selecionada por município, com distância entre pontos variável de acordo com o tamanho da área a ser amostrada, totalizando 299 pontos de coleta. Em cada ponto de coleta foram realizadas coletas individuais junto a plantas de *Desmanthus*, *Macroptilium* e *Stylosanthes*, ou se nenhuma foi localizada, do solo nu, totalizando aproximadamente 1200 amostras simples.

Estas coletas foram geralmente realizadas à beira das estradas, e identificadas com coordenadas geográficas e altitude, com o auxílio de GPS. Esta amostra foi dividida em três partes, sendo a primeira utilizada para a fase de isolamento, enquanto a segunda parte foi utilizada para a formação de uma amostra composta para cada ponto de coleta destinado às caracterizações de física e fertilidade do solo (Barreto *et al.*, 1997; Embrapa, 1999) (Tabela 1) enquanto o remanescente foi preservado para uso posterior.

Os resultados das análises de solo serão utilizados para análise de agrupamento utilizando o SAS 9.2 para seleção de amostras representativas para a fase de isolamento. Dentro de cada grupo serão escolhidas, quando possível, amostras com pelo menos 50 km de distância (Deng *et al.*, 2011) e de forma proporcional entre o número de amostras do grupo e as diferentes leguminosas próximas das quais as amostras foram coletadas.

## Obtenção e caracterização dos isolados

Os isolados estão sendo obtidos utilizando o caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) como planta-isca. Plântulas foram pré-germinadas em vermiculita esterilizada por três a cinco dias e em seguida transplantadas para vasos de Leonard (Santos *et al.*, 2009), com mistura de areia e vermiculita na parte superior e solução nutritiva de Hoagland sem nitrogênio (Hoagland e Arnon, 1950) e inoculadas com dois gramas de solo das amostras obtidas inicialmente.

**Tabela 1** - Caracterização física e de fertilidade do solo de 299 amostras compostas dos diferentes solos de 11 municípios do semiárido pernambucano

|                |                                    | Média±Int. Conf. 5% | Mínimo | Mediana | Máximo  |
|----------------|------------------------------------|---------------------|--------|---------|---------|
| Teor de Argila |                                    | 1,05±0,08           | 0,41   | 0,90    | 1,97    |
| Teor de Silte  | dag.kg <sup>-1</sup>               | 33,16±4,04          | 9,50   | 15,98   | 74,00   |
| Teor de Areia  |                                    | 70,65±3,27          | 38,75  | 78,51   | 94,67   |
| pH             |                                    | 6,44±0,11           | 4,00   | 6,44    | 8,60    |
| Ca + Mg        |                                    | 6,28±0,45           | 0,30   | 5,30    | 23,95   |
| Ca             |                                    | 5,28±0,38           | 0,30   | 4,50    | 22,45   |
| Al             |                                    | 0,05±0,02           | 0,00   | 0,00    | 1,30    |
| H + Al         | cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> | 2,91±0,08           | 1,60   | 2,75    | 7,06    |
| Na             |                                    | 0,27±0,1            | 0,00   | 0,14    | 15,24   |
| K              |                                    | 0,31±0,03           | 0,00   | 0,23    | 2,19    |
| P              | mg dm <sup>-3</sup>                | 44,64±11,04         | 0,00   | 18,00   | 1212,00 |
| C.O.           |                                    | 7,71±0,55           | 0,00   | 7,20    | 23,23   |
| M.O.           | dag.kg <sup>-1</sup>               | 13,3±0,95           | 0,00   | 12,41   | 40,04   |

Aos 30 dias após inoculação as plantas foram colhidas e os nódulos destacados, limpos e conservados em tubos com sílica-gel. Quando do isolamento, os nódulos de cada tubo foram reidratados, e em seguida imersos em álcool 95% para quebra da tensão capilar superficial, seguido por esterilização por imersão em hipoclorito de sódio 5% por cinco minutos, e lavados em água destilada esterilizada. O isolamento será conduzido em placas de Petri com meio 79, com azul de bromotimol (Vincent, 1970).

A caracterização morfológica, em andamento, será baseada na velocidade de aparecimento de colônias isoladas, forma, cor, brilho, superfície, borda e tamanho da colônia, produção e consistência de muco, absorção de corantes e modificação do pH do meio de cultura (Vincent, 1970), conforme **Tabela 2**. A caracterização fenotípica será utilizada para agrupamento dos isolados, através de UPGMA ao nível de 100% de similaridade, sem levar a origem do isolado em consideração. Estirpes representativas de cada grupo serão submetidas a BOX-PCR (Binde *et al.*, 2009; Menna *et al.*, 2009)

para formação de grupos de estirpes ao nível de 50% de similaridade (Aserse *et al.*, 2012).

Uma estirpe aleatoriamente escolhida de cada grupo de estirpes será submetida ao sequenciamento completo dos genes housekeeping 16S, recA e glnII (Zhang *et al.*, 2011; Aserse *et al.*, 2012) e dos genes simbióticos nodA, nodD e nifK (Djedidi *et al.*, 2011a; Djedidi *et al.*, 2011b; Aserse *et al.*, 2012), utilizando PCR, conforme procedimento padronizado na literatura (Taurian *et al.*, 2006). As seqüências serão alinhadas utilizando Mega5 (Tamura *et al.*, 2011), seguido por comparação com o GenBank para identificação no nível de espécie, quando possível.

**Tabela 2.** Descritores utilizados na caracterização morfológica dos isolados

| Características culturais | Valores possíveis |          |                  |            |             |
|---------------------------|-------------------|----------|------------------|------------|-------------|
| Absorção de corante       | Sim               |          | Não              |            |             |
| Tempo de crescimento      | $\leq 3$ dias     |          | $> 3$ dias       |            |             |
| Diâmetro da colônia       | $\leq 2$ mm       |          | $> 2$ mm         |            |             |
| Forma                     | Circular          |          | Puntiforme       |            | Irregular   |
| Cor                       | Incolor           | Branca   | Bege             | Amarela    | Rosa        |
| Elevação                  | Plana             | Lente    | Convexa          | Umbilicada | Umbonada    |
| Borda                     | Inteira           | Ondulada | Lobada           | Denteada   | Filamentosa |
| Transparência             | Transparente      |          | Semi-translúcida |            | Opaca       |
| Superfície                | Rugosa            |          | Lisa             |            | Papilosa    |
| Consistência do muco      | Seca              | Aquosa   | Gomosa           | Viscosa    | Butírica    |
| Produção de muco          | Escasso           | Pouco    | Moderado         | Abundante  |             |
| Modificação do pH         | Ácido             |          | Neutro           |            | Alcalino    |

Os agrupamentos com base na caracterização morfológica também serão realizados individualmente para os diferentes grupos de solo dos quais os isolados foram obtidos, e dos gêneros próximos dos quais a amostra inicial foi coletada. Isto permitirá a avaliação da diversidade utilizando os índices de diversidade de Shannon-Weaver (Shannon e Weaver, 1949), de uniformidade de Pielou (Pielou, 1959), de dominância de Simpson (Simpson, 1949) e ACE de riqueza (Chao e Shen, 2003), todas considerando o grupo fenotípico como a espécie e o isolado como o indivíduo, todos

utilizando o PAST (Hammer *et al.*, 2001). Além disto, será utilizada a relação grupos/isolados (Nievas *et al.*, 2012).

Será feita análise de correlação linear entre todas as variáveis de física e fertilidade do solo e diversidade rizobiana bem como correlação canônica entre as características de diversidade, fertilidade e física do solo e análise de componentes principais.

Os grupos de solo serão considerados como repetições para os gêneros próximos dos quais as amostras foram coletadas, sendo realizada análise descritiva para avaliação da diversidade relativa dos gêneros.

### **Resistência**

A resistência das estirpes será avaliada *in vitro* quanto à tolerância a acidez e alcalinidade do solo com pH na faixa de 4 a 9, acidez e alumínio na faixa de pH 4 a 6, com alumínio trocável entre 0 e 2  $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$  e salinidade para teores de  $\text{Na}^+$  entre 0 e 20  $\text{cmol}_c.\text{dm}^{-3}$ , com estes níveis definidos com base na Tabela 1.

As avaliações de resistência serão formadas por duas fases sequenciais. Na primeira fase constarão de avaliação qualitativa resistência/sensibilidade, em que o crescimento do isolado no meio YMA modificado de acordo com o teste será considerado o indicador de resistência. A segunda fase constará de crescimento apenas dos isolados resistentes em meio de cultura, para avaliar efeito do fator ambiental sobre a taxa de crescimento.

Na primeira fase os isolados serão cultivados em meio YM, em tubos eppendorf com 1 ml de capacidade, e meio YMA será inoculado com 20 isolados por placa usando o método da gota (Alikhani *et al.*, 2006), com os isolados separados por velocidade de crescimento (Oliveira, 2011). As placas serão mantidas a aproximadamente 28 C até cinco dias após o pleno crescimento dos isolados nas placas em condições ótimas (pH próximo à neutralidade, sem salinidade). O experimento será conduzido em triplicata, com a inoculação inicial a partir de diferentes tubos eppendorf.

Será determinada a proporção de isolados resistentes a cada nível do fator ambiental, e realizada regressão considerando esta proporção como variável dependente, para cada agrupamento de solos de que os isolados foram originários.

Na segunda fase, os isolados considerados resistentes serão cultivados em tubos de penicilina com 20 ml de capacidade com meio YM modificado de acordo com o tratamento, sob agitação rotativa e temperatura de aproximadamente 28 C pelo mesmo período utilizado na primeira fase. O crescimento bacteriano será acompanhado através de avaliações a cada dois dias da absorbância no comprimento de 620 nm. As taxas de crescimento serão padronizadas para cada isolado com base no crescimento em condições ideais, para criar um índice de efeito do estresse ambiental.

Será realizada avaliação de regressão entre o nível de estresse ambiental e o índice de efeito do estresse para as estirpes resistentes, também para cada agrupamento de solos de origem dos isolados.

Serão realizadas regressões entre os indicadores de resistência em meio sólido e líquido e as características dos solos de que os isolados foram obtidos, para avaliar como o ambiente de origem afeta a resistência rizobiana a estresses abióticos.

## **Exudação**

Será utilizado o caupi variedade IPE Miranda 207 cujas sementes serão desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio a 5%, seguido por lavagem em água destilada esterilizada diversas vezes e colocadas para germinar em papel de germinação esterilizado umedecido com água destilada esterilizada.

As plântulas serão cultivadas em tubos de Gibson com solução nutritiva ajustada para as mesmas condições ambientais utilizadas na fase Resistência por cinco dias, em experimentos separados para cada condição ambiental. A cada dia a solução nutritiva será completamente substituída, sendo conservada por nitrogênio líquido imediatamente após a substituição. Além disto, cada tubo terá duas fitas de filtro de acetato de celulose, sendo um substituído a cada dia e o outro permanecendo por todo o período. Após a remoção as fitas serão armazenadas em nitrogênio líquido.

Os exudados radiculares serão fracionados por HPLC com coluna ODS. O solvente A será água com pH 3,3 ajustado por ácido acético e o B será uma mistura acetonitrila:metanol (20:25, v:v). O gradiente iniciará com 30% de solvente B, aumentando ao longo de 25 min para 60% de solvente B e terminando com eluição isocrática, sempre com fluxo de 1,0 mL/min. O eluente será monitorado na faixa de 195 a 365 nm com detetor de arranjo de diodos, e o espectro analisado pelo software do

sistema, combinado com sua função integradora baseada em flavonoides puros. O método será baseado em Bolaños-Vásquez e Werner (1997).

A produção de flavonoides em cada experimento individual e no conjunto de todos os experimentos será utilizada para análise de agrupamento, através da consideração de cada composto como uma variável binária e determinação do coeficiente de Jacqard para análise de agrupamento e avaliação do efeito dos estresses ambientais sobre os flavonoides exudados por caupi.

## LCO

Os isolados considerados mais resistentes e mais susceptíveis a cada estresse ambiental na fase Resistência serão avaliados sob as mesmas condições daquela fase, com ou sem adição de diferentes níveis dos flavonoides purificados na fase Exudação. Para cada flavonoide será determinada curva para definição de efeito do flavonoide sobre a resistência do isolado.

Além disto, as culturas bacterianas serão utilizadas para extração dos LCOs produzidos sob os diferentes estresses ambientais, conforme descrito em Wang *et al.* (2012). A extração será iniciada por particionamento em n-butanol para HPLC a 40%, sob agitação a 150 rpm por 30 min. A fração orgânica será coletada e evaporada a 50°C em evaporador rotatório a vácuo. O remanescente será redissolvido em acetonitrila 18%, carregado em coluna C18 e eluído três vezes com 10 mL de acetonitrila 30%, seguida por eluição com 10 mL de acetonitrila a 60%. Este último eluente será utilizado para determinação dos LCOs e será fracionado por HPLC com detector a 214 nm e autoamostrador usando coluna de fase reversa C18 por 60 min com gradiente linear de acetonitrila de 18 a 60%. O material de todos os picos será coletado, liofilizado, recromatografado e o novo pico coletado.

A análise será conduzida de forma semelhante à fase anterior.

## Eficiência

Isolados representativos serão escolhidos por amostragem dentro de cada grupo fenotípico ao nível de 100% de similaridade formado para cada grupo de amostras de origem, conforme descrito no isolamento e caracterização.

Esta avaliação será conduzida em vasos de Leonard modificados (Santos *et al.*, 2009) utilizando solução nutritiva de Hoagland sem N (Hoagland e Arnon, 1950). Além

dos isolados selecionados serão incluídos tratamentos controle não inoculados sem N e recebendo 100 mg de N, e inoculados com as estirpes recomendadas para produção de inoculantes para o caupi (Brasil, 2011).

Será utilizado o caupi variedade IPE Miranda 207 cujas sementes serão desinfestadas superficialmente com hipoclorito de sódio a 5%, seguido por lavagem em água destilada esterilizada diversas vezes e colocadas para germinar diretamente no vaso de Leonard. Cada semente será inoculada com 2 ml de meio de cultura YM com aproximadamente  $10^8$  células.ml<sup>-1</sup> um dia após o plantio, com inóculo preparado separadamente para cada repetição. O experimento será conduzido no delineamento em blocos casualizados com três repetições, sendo repetido separadamente.

As plantas serão cultivadas durante 45 dias, após o que serão colhidas, separadas em parte aérea, raízes e nódulos, que serão contados, e as partes colocadas para secar em estufa de circulação forçada a 60 C por quatro dias, e em seguida pesadas. Em seguida toda a planta será moída para determinação do teor de N, e do nitrogênio total. Além disto serão determinadas as eficiência relativa ao nitrogênio (ERN) e eficiência relativa às recomendadas (ERR), conforme as equações abaixo

$$ERN (\%) = \frac{MSPA \text{ planta inoculada}}{MSPA \text{ controle com N}} \times 100$$

$$ERR(\%) = \frac{MSPA \text{ planta inoculada}}{MSPA \text{ recomendadas}} \times 100$$

Os dados serão submetidos a quatro análises independentes. A primeira constará de análise de variância e teste de Scott-Knott, considerando os isolados como tratamentos, para avaliação da eficiência simbiótica de cada um, e avaliação dos mais promissores.

A segunda análise não incluirá as testemunhas e vai considerar os isolados como efeito aleatório, enquanto os grupos fenotípicos a 100% de similaridade no conjunto de todos os isolados serão considerados como efeito fixo.

A terceira análise também não incluirá as testemunhas e vai considerar os isolados como efeito aleatório, mas o efeito fixo será o grupo de amostras de origem, para avaliar o possível efeito de características edáficas sobre a eficiência de populações rizobianas sob condições controladas. Também será realizada análise de correlação canônica entre as variáveis edáficas e de eficiência simbiótica. A quarta análise será



semelhante à terceira, mas o efeito fixo serão as diferentes leguminosas próximas das quais as amostras foram coletadas.

## **Compatibilidade**

Os isolados que formarem nódulos na etapa de avaliação de eficiência serão utilizados para avaliação de compatibilidade, em que experimentos separados serão conduzidos para cada espécie de *Desmanthus*, *Macropodium* e *Stylosanthes* identificada com base em outros segmentos do projeto.

Para cada experimento serão adotados os controles não inoculado sem N e com N, na mesma dose do primeiro experimento, além de controles inoculados com as estirpes recomendadas para caupi e para espécies do mesmo gênero (Brasil, 2011).

Cada experimento será conduzido em vaso de Leonard, sob as mesmas condições do experimento de avaliação de eficiência, e com as mesmas determinações e avaliações estatísticas. Todos os experimentos serão conduzidos separadamente duas vezes.

## **Principais contribuições**

### **Científicas**

Determinar o efeito de características edafoclimáticas sobre a diversidade, resistência a fatores abióticos e eficiência de populações rizobianas, com a possibilidade de determinação do nível de confiança estatístico nas afirmativas, diferentemente de grande parte da literatura neste campo.

Determinar o efeito de diferentes estresses ambientais sobre a exudação de flavonoides por caupi, informação aparentemente inexistente na literatura até o momento.

Determinar o efeito de diferentes flavonoides e estresses ambientais sobre o espectro e quantidade de LCOs exudados por diferentes isolados rizobianos para caupi. A literatura encontrada no tema de modo geral não avalia o efeito de estresses ambientais e variabilidade genética bacteriana sobre a exudação de LCOs.

Publicação de artigos em periódicos com fator de impacto relevante para a área, e em congressos de âmbito nacional e internacional.

Participação em editais de agências de fomento

### **Formação de recursos humanos**

Orientação de estudantes de iniciação científica, mestrado e doutorado em temas ligados à biodiversidade rizobiana, sendo os mesmos incluídos como co-autores nas publicações derivadas do projeto.

Os estudantes de doutorado deverão acompanhar o processo de orientação dos estudantes de iniciação científica, de modo a iniciarem o entendimento do processo de formação de recursos humanos.

Supervisão de pós-doutores, que deverão participar como co-orientadores de estudantes de mestrado e doutorado, bem como atuar como orientadores na iniciação científica, adquirindo assim experiência na formação de recursos humanos e na solicitação de editais.

### **Tecnológicas**

Seleção de estirpes visando sua indicação para produção de inoculantes comerciais.

Obtenção de LCOs purificados que poderão ser avaliados para fins biotecnológicos em etapas posteriores.

### **Didáticas**

A cada visita do bolsista será ministrado alternadamente um curso intensivo em Troca de sinais planta x micro-organismo (a ser oferecido pelo Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo) ou em Culturas Bioenergéticas (oferecido pelo Programa de Pós-Graduação em Agronomia – Melhoramento Genético de Plantas. Ambos os programas são da UFRPE, e serão abertas inscrições a outros interessados. Também serão oferecidos cursos de menor duração em propriedade intelectual e transferência de tecnologia, bem como em escrita científica.

Todos os cursos reverterão em créditos (à razão de um crédito por cada 15 horas/aula para os discentes envolvidos), e serão ministrados em inglês.

## Orçamento detalhado

| Item   | Número | Custo em dólares | Custo unitário | Cotação do dólar | Total          |
|--|--------|------------------|----------------|------------------|----------------|
| Benefícios diretos ao bolsista                           |        |                  |                |                  |                |
| Mensalidade  | 6      |                  |                | R\$ 14.000,00    | R\$ 84.000,00  |
| Passagens Montreal-Recife-Montreal (classe executiva)    | 6      |                  |                | R\$ 8.500,00     | R\$ 51.000,00  |
| Sub-total  |        |                  |                |                  | R\$ 135.000,00 |
| Outras bolsas  |        |                  |                |                  |                |
| Pós-doutorado  | 36     |                  |                | R\$ 4.100,00     | R\$ 147.600,00 |
| Doutorado Sanduíche                                      | 30     | CAD 1.470,00     |                | R\$ 2,50         | R\$ 88.200,00  |
| Sub-total  |        |                  |                |                  | R\$ 235.800,00 |
| Despesas de Custeio                                      |        |                  |                |                  |                |
| Manutenção de equipamento e laboratório                  |        |                  |                |                  |                |
|  |        |                  |                |                  | R\$ 6.000,00   |
| Editoração de artigos em inglês                          | 4      | \$ 300,00        |                | R\$ 2,50         | R\$ 3.000,00   |
| Taxa de publicação de artigos                            | 3      | \$ 1.200,00      |                | R\$ 2,50         | R\$ 9.000,00   |
| Sequenciamento de DNA (sequência de até 800 pb)          | 300    | \$ 5,00          |                | R\$ 2,50         | R\$ 3.750,00   |
| Diárias  |        |                  |                |                  |                |
| Nacionais  | 25     |                  | R\$ 320,00     |                  | R\$ 8.000,00   |
| Reagentes, vidrarias, gases e colunas para cromatografia |        |                  |                |                  |                |
|  |        |                  |                |                  | R\$ 20.000,00  |
| Total anual  |        |                  |                |                  | R\$ 49.750,00  |
| Total de custeio   |        |                  |                |                  | R\$ 149.250,00 |
| Total geral  |        |                  |                |                  | R\$ 542.100,00 |



## Identificação dos demais participantes no projeto

| Pesquisador              | Instituição                         | Linha de pesquisa     | CPF         | Lattes  |
|--------------------------|-------------------------------------|-----------------------|-------------|---|
| Alexandre C. L. Mello    | UFRPE                               | Forragicultura        | 83613099420 | <a href="http://lattes.cnpq.br/7703594344797645">http://lattes.cnpq.br/7703594344797645</a> |
| Ana D. S. Freitas        | UFRPE                               | Microbiologia do solo | 45705550472 | <a href="http://lattes.cnpq.br/6734173724110965">http://lattes.cnpq.br/6734173724110965</a> |
| Donald L. Smith          | McGill University, Montreal, Canadá | Troca de sinais       |             | Não tem   |
| José C. B. Dubeux Junior | UFRPE                               | Forragicultura        | 59351721434 | <a href="http://lattes.cnpq.br/1270836627145510">http://lattes.cnpq.br/1270836627145510</a> |
| Krisle Silva             | EMBRAPA Roraima                     | Genética molecular    | 03749811911 | <a href="http://lattes.cnpq.br/6054219772789607">http://lattes.cnpq.br/6054219772789607</a> |
| Márcia V. B. Figueiredo  | IPA Microb. Solo                    | Microbiologia do solo | 12792667400 | <a href="http://lattes.cnpq.br/4447130248390665">http://lattes.cnpq.br/4447130248390665</a> |
| Maria C. C. P. Lyra      | IPA Genoma                          | Genética molecular    | 58835571472 | <a href="http://lattes.cnpq.br/1927568921068851">http://lattes.cnpq.br/1927568921068851</a> |
| Mario A. Lira            | UFRPE/IPA                           | Forragicultura        | 00213527472 | <a href="http://lattes.cnpq.br/8556313890479383">http://lattes.cnpq.br/8556313890479383</a> |
| Mércia V. F. Santos      | UFRPE                               | Forragicultura        | 40535083468 | <a href="http://lattes.cnpq.br/9565465836878202">http://lattes.cnpq.br/9565465836878202</a> |
| Newton P. Stamford       | UFRPE Agronomia                     | Microbiologia do solo | 00510700497 | <a href="http://lattes.cnpq.br/9468744050761278">http://lattes.cnpq.br/9468744050761278</a> |

Estudantes de Iniciação Científica, Mestrado e Doutorado a definir nos cursos de Agronomia, PPGs Agronomia – Ciências do Solo e Agronomia – Melhoramento Genético de Plantas, ainda a serem definidos. Bolsista Pós-doutorado a ser definido por edital específico.

## Atividades específicas dos participantes

### Equipe nacional de pesquisadores

Discussão e coordenação das atividades de pesquisa, conjuntamente com o Prof. D. L. Smith, sob a coordenação geral do solicitante.

Continuação das atividades de pesquisa durante os períodos em que o bolsista não estará no Brasil

Possível co-orientação de orientados do bolsista em programas de pós-graduação da McGill University que venham a desenvolver parte de suas atividades de pesquisa no Brasil

Desenvolvimento de novos projetos conjuntos de pesquisa e fortalecimento dos vínculos institucionais entre UFRPE e McGill University

### **Pesquisador Visitante Especial**

Co-orientação de discentes de doutorado, em particular no que tange à troca de sinais entre leguminosas e rizóbio sob condições de estresse ambiental, incluindo sua recepção e orientação na McGill University

Realização de cursos intensivos em trocas de sinais e culturas bioenergéticas quando de suas estadias no Brasil

Desenvolvimento dos trabalhos de pesquisa através da orientação ao bolsista de pós-doutorado, em particular nas técnicas ligadas diretamente à troca de sinais.

Participação na análise e escrita dos dados, bem como na discussão de outros trabalhos da equipe.

Discussão de outros projetos conjuntos com membros desta equipe, bem como potencialmente outros intercâmbios e submissões de projetos conjuntos a outras fontes de financiamento.

### **Bolsista de pós-doutorado**

Adaptação e desenvolvimento de técnicas de identificação de potenciais moléculas na troca de sinais entre leguminosas e rizóbio

Co-orientação de bolsistas de iniciação científica, mestrado e doutorado ligados ao projeto, em particular no aspecto de troca de sinais

Contatos cotidianos com o pesquisador visitante para desenvolvimento da atividade de pesquisa

Participação na discussão de outros trabalhos de pesquisa entre os membros da equipe

### **Bolsistas de doutorado sanduíche**

Serão enviados dois bolsistas para doutorado sanduíche, cada um por doze meses. O primeiro deverá concentrar suas atividades na identificação de sinais moleculares exudados pela planta, enquanto o segundo deverá concentrar-se na identificação de nod factors exudados pelo rizóbio. Em ambos os casos, espera-se que o

bolsista adquira experiência em outras atividades de pesquisa do laboratório com membros da equipe de alunos do bolsista.

Merece destaque a característica multinacional desta equipe que deverá colaborar no desenvolvimento da capacidade de trabalho em equipe do doutorando.

## **Ganhos a serem obtidos pela UFRPE**

O prof. D. L. Smith tem larga experiência internacional em pesquisa, como pode ser observado claramente em seu currículo anexado à proposta. Mais importante, no entanto, o mesmo tem demonstrado a capacidade de transformar resultados de pesquisa científica em biologia em produtos tecnológicos com patentes sendo disputadas no mercado americano.

Embora a UFRPE esteja procurando se desenvolver neste sentido, esta ainda não é prática comum na universidade, em particular no Departamento de Agronomia, em que a pesquisa será desenvolvida. Assim, a vinda do Dr. Smith será útil, além do aspecto científico propriamente dito, poderá acarretar a geração de produtos tecnológicos, com patente solicitada no Brasil, no Canadá, ou nos Estados Unidos.

Além das atividades diretamente ligadas ao projeto, o Dr. Smith é o Coordenador da BiofuelNet Canada (<http://www.biofuelnet.ca/>) uma rede de instituições líderes na pesquisa em bioenergia que inclui diversas empresas líderes mundiais, bem como instituições de ensino e pesquisa líderes em todo o Canadá.

A UFRPE já participa de memorando de entendimento com a BiofuelNet, em parceria com outras instituições pernambucanas, mas os contatos mais aprofundados desenvolvidos durante este projeto deverão ampliar esta colaboração também no que tange a esta rede, e potencialmente com as demais instituições participantes da mesma.

## **Identificação de parcerias já estabelecidas**

Há laços fortes estabelecidos entre departamentos e unidades acadêmicas da UFRPE, além dos já incluídos no projeto, que permitem o acesso a equipamentos não disponíveis no laboratório do solicitante. O mesmo ocorre com instalações do Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA, nos termos do convênio IPA-UFRPE.

A parceria com a EMBRAPA Roraima é função do estágio pós-doutoral do solicitante na UFLA na fase em que a Dra. Krisle Silva estava realizando seu doutorado,

e os laços com a equipe da Profa. Fátima. M. S. Moreira continuam, bem como com diversos dos seus orientados.

Além destes laços, quando necessário, a equipe tem recebido apoio, como estirpes de referência, por exemplo, das EMBRAPAs Agrobiologia e Soja, bem como da Fundação Estadual De Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul, e de outras instituições conforme necessário.

Finalmente a vinculação com a McGill University vem do doutorado do solicitante ter sido realizado sob a orientação do Prof. Smith, em troca de sinais, e que será submetido pedido de proposta a ser submetida ao edital Pesquisador Visitante Sênior da CAPES para desenvolvimento de trabalho em troca de sinais entre leguminosa e rizóbio e seu possível impacto na mitigação de efeitos ambientais adversos.

## **Disponibilidade de infra-estrutura e apoio técnico para o desenvolvimento do projeto**

O Laboratório de Diversidade Microbiana do Departamento de Agronomia da UFRPE, sob a responsabilidade do solicitante, tem toda a infraestrutura necessária para a realização do projeto. Grande parte dos orientados de iniciação científica, mestrado e doutorado do solicitante irão trabalhar em aspectos específicos do projeto geral, tal como o plano de trabalho apresentado para a solicitação de bolsa de iniciação científica.

## **Estimativa dos recursos financeiros a serem aportados por outras fontes**

Serão solicitadas bolsas de iniciação científica tanto através de editais da FACEPE quanto através do programa PIBIC CNPq-UFRPE (com recursos do CNPq, da UFRPE-REUNI e recursos próprios da UFRPE). A previsão é que entre três e cinco bolsistas atuem em diferentes segmentos deste projeto, totalizando nesta modalidade entre R\$ 43200,00 e R\$ 72000,00 reais em bolsas ao longo de todo o projeto.

Além disto, estudantes de mestrado e doutorado também terão seus projetos de dissertação e mestrado vinculados a este projeto, com bolsas obtidas também junto à FACEPE, através de seus editais específicos, e pelas cotas de bolsas CAPES e CNPq



dos Programas de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo e Agronomia – Melhoramento Genético de Plantas em que o solicitante atua como orientador.

Quanto a recursos de custeio além de taxas de bancada referentes aos estudantes de pós-graduação atuando no projeto, serão feitos pedidos de financiamento através de editais de fomento, à medida em que sejam disponibilizados. Eventual necessidade de aquisição de novos equipamentos poderá ser atendida através da participação em editais específicos, bem como pela inclusão de subprojetos nos editais institucionais, tais como o Pró-Equipamentos da CAPES.

## Literatura

ALBAREDA, M.; RODRÍGUEZ-NAVARRO, D. N.; CAMACHO, M.; TEMPRANO, F. J. Alternatives to peat as a carrier for rhizobia inoculants: Solid and liquid formulations. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 11, p. 2771-2779, 2008.

ALIKHANI, H. A.; SALEH-RASTIN, N.; ANTOUN, H. Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. **Plant and Soil**, v. 287, n. 1, p. 35-41, 2006.

ALMARAZ, J. J.; MABOOD, F.; ZHOU, X.; STRACHAN, I.; MA, B.; SMITH, D. L. Performance of agricultural systems under contrasting growing season conditions in south-western Quebec. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 195, n. 5, p. 319-327, // 2009.

ANDRONOV, E. E.; TEREFEWORK, Z.; ROUMIANTSEVA, M. L.; DZYUBENKO, N. I.; ONICHTCHOUK, O. P.; KURCHAK, O. N.; DRESLER-NURMI, A.; YOUNG, J. P. W.; SIMAROV, B. V.; LINDSTRÖM, K. Symbiotic and genetic diversity of *Rhizobium galegae* isolates collected from the *Galega orientalis* gene center. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 1067-1074, 2003.

ARAÚJO, A. S. F.; LEITE, L. F. C.; IWATA, B. F.; LIRA JUNIOR, M. A.; XAVIER, G. R.; FIGUEIREDO, M. B. V. Microbiological process in agroforestry systems. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 32, n. 1, p. 215-216, 2012.

ASERSE, A. A.; RASANEN, L. A.; ASSEFA, F.; HAILEMARIAM, A.; LINDSTROM, K. Phylogeny and genetic diversity of native rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Ethiopia. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 120-31, Mar 2012.

BARRETO, W. O.; PAULA, J. L. D.; DUARTE, M. N. **Manual de Métodos de Análise de Solos**. Brasília EMBRAPA, 1997.

BINDE, D. R.; MENNA, P.; BANGEL, E. V.; BARCELLOS, F. G.; HUNGRIA, M. Rep-PCR fingerprinting and taxonomy based on the sequencing of the 16S rRNA gene of 54 elite commercial rhizobial strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, n. 5, p. 897-908, 2009.

BODDEY, R. M. R.; MACEDO, R. M.; TARRÉ, E.; FERREIRA, E.; OLIVEIRA, O. C.; REZENDE, C. P.; CANTARUTTI, R. B.; PEREIRA, J. M.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Nitrogen cycling in *Brachiaria* pastures: the key to understanding the process of pasture decline. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 103, p. 389-403, 2004.

BOLAÑOS-VÁSQUEZ, M. C.; WERNER, D. Effects of *Rhizobium tropici*, *R. etli*, and *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* on nod gene-inducing flavonoids in root exudates of *Phaseolus vulgaris*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 10, n. 3, p. 339-346, // 1997.

BRASIL, S. D. D. A.-M. D. A. P. E. A. **Instrução Normativa N°13, de 24 de março de 2011**. Diário Oficial da União - Seção 1. Brasília: Imprensa Nacional. 58, 25 de março de 2011: 3-7 p. 2011.

CHAGAS JÚNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N. Caracterização fenotípica de rizóbio nativos isolados de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi. **Acta Scientiarum.Agronomy**, v. 32, n. 1, p. 161-169, 2010.

CHANDRA, A. Diversity among *Stylosanthes* species: Habitat, edaphic and agro-climatic affinities leading to cultivar development. **Journal of Environmental Biology**, v. 30, n. 4, p. 471-478, 2009.

CHAO, A.; SHEN, T. J. Nonparametric estimation of Shannon's index of diversity when there are unseen species in sample. **Environmental and Ecological Statistics**, v. 10, n. 4, p. 429-443, 2003.

DARDANELLI, M. S.; DE CÓRDOBA, F. J. F.; ESTÉVEZ, J.; CONTRERAS, R.; CUBO, M. T.; RODRÍGUEZ-CARVAJAL, M. T.; GIL-SERRANO, A. M.; LÓPEZ-BAENA, F. J.; BELLOGÍN, R.; MANYANI, H.; OLLERO, F. J.; MEGÍAS, M. Changes in flavonoids secreted by *Phaseolus vulgaris* roots in the presence of salt and the plant growth-promoting rhizobacterium *Chryseobacterium balustinum*. **Applied Soil Ecology**, v. 57, p. 31-38, // 2012.

DATE, R. A. The contribution of R & D on root-nodule bacteria to future cultivars of tropical forage legumes. **Tropical Grasslands**, v. 31, n. 4, p. 350-354, 1997.

DEAKER, R.; ROUGHLEY, R. J.; KENNEDY, I. R. Legume seed inoculation technology-a review. **Soil Biology and Biochemistry**, 2005.

DENG, Z. S.; ZHAO, L. F.; KONG, Z. Y.; YANG, W. Q.; LINDSTRÖM, K.; WANG, E. T.; WEI, G. H. Diversity of endophytic bacteria within nodules of the *Sphaerophysa salsula* in different regions of Loess Plateau in China. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 76, n. 3, p. 463-475, 2011.

DENTON, M. D.; PEARCE, D. J.; BALLARD, R. A.; HANNAH, M. C.; MUTCH, L. A.; NORNG, S.; SLATTERY, J. F. A multi-site field evaluation of granular inoculants for legume nodulation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, n. 12, p. 2508-2516, 2009.

DJEDIDI, S.; YOKOYAMA, T.; OHKAMA-OHTSU, N.; RISAL, C. P.; ABDELLEY, C.; SEKIMOTO, H. Stress Tolerance and Symbiotic and Phylogenetic Features of Root Nodule Bacteria Associated with Medicago Species in Different Bioclimatic Regions of Tunisia. **Microbes and Environments**, v. 26, n. 1, p. 36-45, 2011a.

DJEDIDI, S.; YOKOYAMA, T.; TOMOOKA, N.; OHKAMA-OHTSU, N.; RISAL, C. P.; ABDELLEY, C.; SEKIMOTO, H. Phenotypic and genetic characterization of rhizobia associated with alfalfa in the Hokkaido and Ishigaki regions of Japan. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, n. 6, p. 453-61, Sep 2011b.

DUZAN, H. M.; ZHOU, X.; SOULEIMANOV, A.; SMITH, D. L. Perception of Bradyrhizobium japonicum Nod factor by soybean [ Glycine max (L.) Merr.] root hairs under abiotic stress conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 408, p. 2641-2646, 2004.

ELBOUTAHIRI, N.; THAMI-ALAMI, I.; UDUPA, S. M. Phenotypic and genetic diversity in Sinorhizobium meliloti and S. medicae from drought and salt affected regions of Morocco. **Bmc Microbiology**, v. 10, p. -, Jan 20 2010.

EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos**. Brasília EMBRAPA, 1999.

FERGUSON, B. J.; LIN, M. H.; GRESSHOFF, P. M. Regulation of legume nodulation by acidic growth conditions. **Plant Signaling and Behavior**, v. 8, n. 3, p. e23426.1-e23426.5, // 2013.

FERNANDES, C. D.; GROF, B.; CHAKRABORTY, S.; VERZIGNASSI, J. R. Estilosantes Campo Grande in Brazil: A tropical forage legume success story. **Tropical Grasslands**, v. 39, n. 4, p. 223-223, 2005.

FERREIRA, P. A. A.; SILVA, M. A. P.; CASSETARI, A.; RUFINI, M.; MOREIRA, F. M. S.; ANDRADE, M. J. B. Inoculação com cepas de rizóbio na cultura do feijoeiro. **Ciência Rural**, v. 39, n. 7, p. 2210-2212, 2009.

GHASEM, F.; POUSTINI, K.; BESHARATI, H.; MOHAMMADI, V. A.; ABOOEI MEHRIZI, F.; GOETTERT, M. Pre-incubation of *Sinorhizobium meliloti* with luteolin, methyl jasmonate and genistein affecting alfalfa (*Medicago sativa* L.) growth, nodulation and nitrogen fixation under salt stress conditions. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 14, n. 6, p. 1255-1264, // 2012.

GOOGLE INC. **Google Earth 5**. Mountain View: Google Inc. 2010.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 9pp, 2001.

HIRSCH, A. M.; FUJISHIGE, N. A. Molecular Signals and Receptors: Communication Between Nitrogen-Fixing Bacteria and Their Plant Hosts. In: WITZANY, G. e BALUŠKA, F. (Ed.). **Biocommunication of plants**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, v.14, 2012. p.255-280. (Signaling and Communication in Plants). ISBN 978-3-642-23523-8.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley: California Agricultural Experiment Station, 1950. 32  
Acesso em: -32676/////.

HUNGRIA, M.; JOHNSTON, A. W.; PHILLIPS, D. A. Effects of flavonoids released naturally from bean ( *Phaseolus vulgaris* ) on nodD-regulated gene transcription in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 5, n. 3, p. 199-203, 1992.

IBGE. Utilização das terras - área de pastagens (ha) Brasília, 2010. Acesso em: 07/08/2010.

KHAN, W.; ZHAI, R.; SOULEIMANOV, A.; CRITCHLEY, A. T.; SMITH, D. L.; PRITHIVIRAJ, B. Commercial Extract of *Ascophyllum nodosum* Improves Root Colonization of Alfalfa by Its Bacterial Symbiont *Sinorhizobium meliloti*. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 43, n. 18, p. 2425-2436, // 2012.

KIDAJ, D.; WIELBO, J.; SKORUPSKA, A. Nod factors stimulate seed germination and promote growth and nodulation of pea and vetch under competitive conditions. **Microbiological Research**, v. 167, n. 3, p. 144-150, // 2012.

LIMA, A. S.; NÓBREGA, R. S. A.; BARBERI, A.; SILVA, K.; FERREIRA, D. F.; MOREIRA, F. M. S. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macroptilium atropurpureum* ). **Plant and Soil**, v. 319, n. 1, p. 127-145, 2009.

LIRA JUNIOR, M. A.; COSTA, C.; SMITH, D. L. Effects of addition of flavonoid signals and environmental factors on nodulation and nodule development in the pea (*Pisum sativum*)–*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* symbiosis. **Australian Journal of Soil Research**, v. 41, p. 267-276, 2003.

LOMBARDI, M. L. C. D.; MOREIRA, M.; AMBROSIO, L. A.; CARDOSO, E. J. B. N. Occurrence and Host Specificity of Indigenous Rhizobia from Soils of São Paulo State, Brazil. **Scientia Agricola**, v. 66, n. 4, p. 543-548, Jul-Aug 2009.

MABOOD, F.; GRAY, E. J.; LEE, K. D.; SUPANJANI; SMITH, D. L. Exploiting inter-organismal chemical communication for improved inoculants. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 86, n. 4, p. 951-966, // 2006a.

MABOOD, F.; SMITH, D. L. Pre-incubation of *Bradyrhizobium japonicum* with jasmonates accelerates nodulation and nitrogen fixation in soybean (*Glycine max*) at optimal and suboptimal root zone temperatures. **Physiologia Plantarum**, v. 125, n. 3, p. 311-323, // 2005.

MABOOD, F.; ZHOU, X.; LEE, K. D.; SMITH, D. L. Methyl jasmonate, alone or in combination with genistein, and *Bradyrhizobium japonicum* increases soybean (*Glycine max* L.) plant dry matter production and grain yield under short season conditions. **Field Crops Research**, v. 95, n. 2-3, p. 412-419, 2006b.

MARKS, B. B.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M.; MEGÍAS, M. Biotechnological potential of rhizobial metabolites to enhance the performance of *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* inoculants with soybean and maize. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 21-21, 2013.

MENNA, P.; PEREIRA, A. A.; BANGEL, E. V.; HUNGRIA, M. Rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. **Symbiosis**, v. 48, n. 1-3, p. 120-130, 2009.

MIRANSARI, M.; SMITH, D. L. Overcoming the stressful effects of salinity and acidity on soybean nodulation and yields using signal molecule genistein under field conditions. **Journal of Plant Nutrition**, v. 30, n. 12, p. 1967-1992, // 2007.

\_\_\_\_\_. Alleviating salt stress on soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) - *Bradyrhizobium japonicum* symbiosis, using signal molecule genistein. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 2, p. 146-152, Mar-Apr 2009.

MOTHAPO, N. V.; GROSSMAN, J. M.; MAUL, J. E.; SHI, W.; ISLEIB, T. Genetic diversity of resident soil rhizobia isolated from nodules of distinct hairy vetch (*Vicia villosa* Roth) genotypes. **Applied Soil Ecology**, v. 64, n. 0, p. 201-213, 2// 2013.

NIEVAS, F.; BOGINO, P.; NOCELLI, N.; GIORDANO, W. Genotypic analysis of isolated peanut-nodulating rhizobial strains reveals differences among populations

obtained from soils with different cropping histories. **Applied Soil Ecology**, v. 53, n. 1, p. 74-82, 2012.

OLIVEIRA, C. S. **Caracterização fenotípica de isolados rizobianos de sabiá nativos de um argissolo sob diferentes coberturas vegetais**. 2011. Dissertação (MSc). Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Ciência do Solo, UFRPE, Recife.

PHILLIPS, D. A.; HARTWIG, U. A.; MAXWELL, C. A.; JOSEPH, C. M.; WERY, J.; HUNGRIA, M.; TSAI, S. M. Host legume control of nodulation by flavonoids. In: GRESSHOFF, P. M.; ROTH, L. E., *et al* (Ed.). **Nitrogen fixation: achievements and objectives**. New York: Chapman and Hall, 1990. p.331-338.

PIELOU, E. C. The use of point to plant distances in the study of the pattern of plant populations. **Journal of Ecology**, v. 47, n. 3, p. 607-613, 1959.

PULE-MEULENBERG, F.; BELANE, A.; KRASOVA-WADE, T.; DAKORA, F. Symbiotic functioning and bradyrhizobial biodiversity of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) in Africa. **Bmc Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 89, 2010.

RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; VELÁZQUEZ, E.; FERNÁNDEZ-SANTOS, F.; PEIX, A.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; MATEOS, P. F. Phenotypic, genotypic, and symbiotic diversities in strains nodulating clover in different soils in Spain. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 10, p. 1207-1216, 2009.

RISAL, C. P.; DJEDIDI, S.; DHAKAL, D.; OHKAMA-OHTSU, N.; SEKIMOTO, H.; YOKOYAMA, T. Phylogenetic diversity and symbiotic functioning in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) bradyrhizobia from contrast agro-ecological regions of Nepal. **Systematic and Applied Microbiology**, n. 0, Dec 15 2011.

SANTOS, C. E. R. S.; BEZERRA, R. V.; FREITAS, A. D. S.; SEIDO, S. L.; MARTINS, L. M. V.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. **Modificação de vasos de Leonard com garrafas descartáveis tipo Pet**. Comunicado Técnico. CNPAB, E.-. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB. 124 2009.

SARR, P. S.; YAMAKAWA, T.; SAEKI, Y.; GUISSÉ, A. Phylogenetic diversity of indigenous cowpea bradyrhizobia from soils in Japan based on sequence analysis of the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer (ITS) region. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 285-292, 2011.

SHANNON, C. E.; WEAVER, W. **The mathematical theory of communication**. Urbana: University of Illinois Press, 1949. 117.

SHELTON, H. M.; FRANZEL, S.; PETERS, M. Adoption of tropical legume technology around the world: Analysis of success. **Tropical Grasslands**, v. 39, n. 4, p. 198-209, 2005.

SILVA, F. B. R.; SANTOS, J. C. P.; SILVA, A. B.; CAVALCANTI, A. C.; SILVA, F. H. B. B.; BURGOS, N.; PARAHYBA, R. B. V.; OLIVEIRA NETO, M. B.; SOUZA NETO, N. C.; ARAÚJO FILHO, J. C.; LOPES, O. F.; LUZ, L. R. Q. P.; LEITE, A. P.; SOUZA, L. G. M. C.; SILVA, C. P.; VAREJÃO-SILVA, M. A.; BARROS, A. H. C. **Zoneamento Agroecológico do Estado de Pernambuco**. Recife: Embrapa Solos - Unidade de Execução de Pesquisa e Desenvolvimento/Governo do Estado de Pernambuco (Secretaria de Produção Rural e Reforma Agrária) 2001.

SIMPSON, E. H. Measurement of diversity [16]. **Nature**, v. 163, n. 4148, p. 688, 1949.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, 2011.

TAURIAN, T.; IBAÑEZ, F.; FABRA, A.; AGUILAR, O. M. Genetic diversity of rhizobia nodulating *Arachis hypogaea* L. in central Argentinean soils. **Plant and Soil**, v. 282, n. 1-2, p. 41-52, 2006.

TEIXEIRA, F. C. P.; BORGES, W. L.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Characterization of indigenous rhizobia from Caatinga. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 201-208, 2010.

TORRES, A. R.; CURSINO, L.; MURO-ABAD, J. I.; GOMES, E. A.; DE ARAÚJO, E. F.; HUNGRIA, M.; CASSINI, S. T. A. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from the state of Minas Gerais, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 852-856, 2009.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970.

WANG, H.; MAN, C. X.; WANG, E. T.; CHEN, W. X. Diversity of rhizobia and interactions among the host legumes and rhizobial genotypes in an agricultural-forestry ecosystem. **Plant and Soil**, v. 314, n. 1-2, p. 169-182, 2009.

WANG, N.; KHAN, W.; SMITH, D. L. Changes in soybean global gene expression after application of lipo-chitoooligosaccharide from *Bradyrhizobium japonicum* under sub-optimal temperature. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, // 2012.

ZHANG, H.; PRITHIVIRAJ, B.; SOULEIMANOV, A.; D'AOUST, F.; CHARLES, T. C.; DRISCOLL, B. T.; SMITH, D. L. The effect of temperature and genistein concentration on lipo-chitoooligosaccharide (LCO) production by wild-type and mutant strains of *Bradyrhizobium japonicum*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, n. 8, p. 1175-1180, 2002.

ZHANG, S.; XIE, F.; YANG, J.; LI, Y. Phylogeny of bradyrhizobia from Chinese cowpea miscellany inferred from 16s rRNA, atpD, glnII, and 16S-23S intergenic spacer sequences. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 316-327, 2011.