



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PEDRO GUSTAVO LIMA GOMES

DIVERSIDADE MORFOFISIOLÓGICA E POTENCIAL DE
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE RIZOBACTÉRIAS
ISOLADAS DE *Leucaena leucocephala* DA AMAZÔNIA ORIENTAL

SÃO LUÍS/MA

2022

PEDRO GUSTAVO LIMA GOMES

**DIVERSIDADE MORFOFISIOLÓGICA E POTENCIAL DE
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE RIZOBACTÉRIAS
ISOLADAS DE *Leucaena leucocephala* DA AMAZÔNIA ORIENTAL**

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Maranhão para
obtenção do grau de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Orientador(a): Alana das Chagas Ferreira Aguiar

Coorientador(a): Katia Pereira Coelho

SÃO LUÍS/MA

2022

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Gomes, Pedro Gustavo Lima.

Diversidade morfofisiológica e potencial de promoção de crescimento de rizobactérias isoladas de *Leucaena leucocephala* da Amazônia oriental / Pedro Gustavo Lima Gomes. - 2022.

39 f.

Coorientador(a): KATIA PEREIRA COELHO.

Orientador(a): ALANA DAS CHAGAS FERREIRA AGUIAR.

Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, 2022.

1. Caracterização microbiológica. 2. FBN. 3. Leguminosae. I. AGUIAR, ALANA DAS CHAGAS FERREIRA. II. COELHO, KATIA PEREIRA. III. Título.

PEDRO GUSTAVO LIMA GOMES

**DIVERSIDADE MORFOFISIOLÓGICA E POTENCIAL DE
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE RIZOBACTÉRIAS
ISOLADAS DE *Leucaena leucocephala* DA AMAZÔNIA ORIENTAL**

Monografia apresentada à
Universidade Federal do Maranhão,
como requisito parcial para a
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Alana das Chagas Ferreira Aguiar

(Orientadora)

Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Prof^ª. Dr^ª. Kátia Pereira Coelho

(Co-orientadora)

Universidade Estadual do Maranhão - UEMA

Prof. Dr. Leonardo Teixeira Dall'Agnol

(Titular)

Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Ma. Juliana Lima Brito Souza

(Titular)

Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Profª. Drª. Ilisandra Zanandrea

(Suplente)

Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Profº. Dr. Juliano dos Santos

(Suplente)

Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Dedico este trabalho a minha família, meus amigos desde a escola, e meu grupo de amigos da faculdade “R&T”.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais e irmã que sempre me deram todo o apoio necessário para continuar a estudar, sempre me incentivando a seguir nos caminhos certos e fazendo o possível para eu alcançar o meu sucesso futuramente tanto na vida acadêmica quanto no pessoal. Nunca vou esquecer de todos os esforços pra me manter em uma educação melhor e me dar uma vida o mais confortável possível.

Aos meus amigos do adventista que me acompanharam desde o ensino fundamental e médio, viram meu crescimento e sempre estiveram dispostos a me ajudar. Amanda, minha confidente desde a escola, que sempre esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis da minha vida desde a infância até aqui e nunca mede esforços pra me ajudar, obrigado por tudo, você sabe que tem parte de você neste trabalho. Ana Beatriz por todo companheirismo de sempre, todas as vezes que você me chamou pra conversar, jogar ou um simplesmente perguntar como eu estava foram de extrema significância. Agradeço também à Safira que se dispôs a me ajudar em uma das etapas deste trabalho, e também por todas as palavras de conforto e momentos divertidos que me ajudaram em momentos de tensão.

Ao meu grupo de amigos “R&T” que a UFMA me trouxe, vocês são incríveis e serei sempre grato por ter vivenciado toda a experiência da graduação ao lado de vocês. Vocês foram meus pilares durante estes anos na UFMA, toda a vivência da faculdade não seria a mesma sem vocês, sempre lembrarei de todos os momentos divertidos e de grandes risadas no hall da biologia, indo pro R.U e os dias aleatórios que íamos para o cinema ou praia, assim como os dias tensos como provas e trabalhos, que com vocês se tornaram mais leves.

À minha amiga e alma gêmea, Marina Caldas, por sempre estar ao meu lado em todos os caminhos que eu desejava trilhar. Você foi essencial no desenvolvimento deste trabalho e na minha vida, a conexão que temos é indescritível, sempre serei grato por toda a força que você me deu, sempre lembrando do quanto eu era capaz de fazer qualquer coisa e seguir em frente, o tanto que você apostava em mim sempre me dava um gás pra não desistir. Obrigado por tanto!

À Samarah, Wesley e Priscya por todo o companheirismo de sempre, nossos momentos juntos foram e são sempre incríveis e sei que sempre posso contar com a

ajuda de vocês pra tudo, a disposição que vocês têm de sempre ajudar o próximo é algo que sempre admirei.

À Juliana Lima, um ser iluminado que foi o pilar desse projeto e logo se tornou uma das pessoas que eu mais admiro. Sou muito grato por todos os momentos que passamos, o quanto você me ajudou a realizar e entender todos este trabalho que fiz, por todas as palavras de conforto e ensinamentos que você me passou, pela viagem maravilhosa que fizemos ao te visitar, e por toda preocupação que você sempre tem comigo, sempre disposta a me escutar e aconselhar.

Ao Laboratório de Anatomia e Fisiologia Vegetal (LaFav), por ter possibilitado eu conhecer pessoas maravilhosas, por ter disponibilizado um ambiente tão confortável para que eu pudesse realizar todo o meu experimento de uma forma mais leve, e por ceder todos os equipamentos necessários pra realização deste trabalho.

À Prof^a Ilisandra Zanandrea, por ter me aceitado no laboratório e possibilitado que eu tivesse todo o acesso possível a pesquisas que me incentivaram a seguir na carreira acadêmica, sua forma leve de ensinar, estimular e sempre se preocupar conosco é algo admirável.

À Prof^a Alana das Chagas, por ter me aceitado como seu orientando e por ter me permitido conhecer outras áreas da biologia. Sou muito grato por sua orientação no começo da minha carreira acadêmica na UFMA e agora no final também foi essencial, sempre gentil e disposta a me ajudar da forma que fosse possível. Obrigado também por ter disponibilizado equipamentos e materiais que tornaram possível a realização deste trabalho.

À Prof^a Katia Pereira, por ter aceitado ser minha co-orientadora e se disponibilizado a me ajudar sempre que possível em todas as etapas deste trabalho, me ajudando sempre a entender todos os processos necessários, seu conhecimento foi essencial.

E por fim, mas não menos importante, gostaria de agradecer a mim mesmo, por toda a força que tive pra continuar até aqui mesmo em momentos turbulentos, e por sempre correr atrás para obter os melhores resultados pra este trabalho mesmo tudo dando errado.

RESUMO

A deficiência de nutrientes no solo é fator altamente limitante nos trópicos úmidos, principalmente nitrogênio (N) e fósforo (P), comprometendo a produtividade agrícola. As condições edafoclimáticas destas regiões contribuem para um solo mais pobre e uma acelerada decomposição da matéria orgânica, provocando uma rápida perda de nitrogênio e assim, uma necessidade de utilização de fertilizantes químicos nitrogenados, que podem causar grandes danos ao meio ambiente, devido ao uso exacerbado, suscitando em um manejo errôneo. Plantas da família Leguminosae são altamente importantes durante o ciclo do N, pois inúmeras espécies desta família possuem a capacidade de desenvolver associações simbióticas com bactérias fixadoras de nitrogênio que colonizam suas raízes, formando nódulos. Porém, o manejo apropriado e eficiente desta simbiose, visando aumentar a eficiência em culturas de interesse econômico, torna-se um desafio devido a fatores bióticos e abióticos, como por exemplo a competição com a microbiota nativa e circunstâncias ambientais. Logo, o incentivo à caracterização e identificação de rizobactérias com habilidade de promoção de crescimento vegetal através da fixação biológica de nitrogênio (FBN) e produção de fitormônios, é essencial para ter-se novas ferramentas de manejo que possibilitam um resultado eficiente na produção agrícola, além de manter a qualidade do solo e reduzir a utilização de técnicas poluentes.

Palavras-chave: Leguminosae; FBN; Caracterização microbiológica.

ABSTRACT

Soil nutrient deficiencies are highly limiting factors in the humid tropics, mainly nitrogen (N) and phosphorus (P), compromising agricultural productivity. The edaphoclimatic conditions of these regions contribute to a poorer soil and an accelerated decomposition of organic matter, causing a rapid loss of nitrogen and thus a need to use chemical nitrogen fertilizers, which can cause great damage to the environment due to exacerbated and erroneous management. . Plants of the Leguminosae family are highly important during the N cycle, as numerous species of this family have the ability to develop symbiotic associations with nitrogen-fixing bacteria that colonize nodules in their roots. However, the appropriate and efficient management of this symbiosis, with a view to an efficient increase in crops of economic interest, becomes a challenge due to biotic and abiotic

factors, such as competition with the native microbiota and environmental circumstances. Therefore, encouraging the characterization and identification of rhizobacteria with the ability to promote plant growth through FBN and production of phytohormones is essential to have new management tools that allow an efficient result in agricultural production, in addition to maintaining the quality of the crop. soil and reduce the use of polluting techniques.

Keywords: Leguminosae; BNF; microbiological characterization.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	5
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	6
REFERÊNCIAS.....	10
ARTIGO.....	16
RESUMO.....	16
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3 RESULTADOS.....	21
4 CONCLUSÕES.....	31
5 REFERÊNCIAS.....	31
ANEXO.....	35

INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N) é um elemento químico encontrado em abundância na atmosfera, sendo fundamental para a sobrevivência de plantas e animais, e atua principalmente na formação de biomoléculas. Para as plantas, o nitrogênio é considerado um fator limitante, e tem um papel crítico nos diversos tipos de cultivo. Em virtude disso, fertilizantes nitrogenados têm sido cada vez mais utilizados, o que pode acarretar consequências negativas ao meio ambiente, como a acidificação e eutrofização do ecossistema (CANFIELD et al., 2010; GRUBER et al., 2008; GALLOWAY et al., 2008;).

Embora o nitrogênio seja farto na atmosfera, as plantas e animais não são capazes de assimilá-lo diretamente na forma gasosa. O processo no qual o nitrogênio atmosférico é transformado em outro composto capaz de ser absorvido, é chamado de fixação biológica de nitrogênio (FBN), esse processo é a forma natural mais conhecida de assimilação desse elemento, e apenas determinadas leguminosas são capazes de realizar este processo. Neste processo, algumas rizobactérias presentes no solo são capazes de se associar às raízes de plantas leguminosas, onde ocorre a redução do nitrogênio e a fixação biológica, além de promoverem o crescimento vegetativo por meio da produção e excreção de hormônios (GUIMARÃES et al., 2012; DAI et al., 2012; MARTINS et al. 2003; BREDEMEIER et al., 2000;).

A região amazônica maranhense é um local predisposto a ter um déficit de nutrientes como o nitrogênio, devido às suas condições edafoclimáticas como: altos índices pluviométricos, altas temperaturas e o solo geralmente formado por rochas sedimentares por efeito do desgaste do solo e das rochas locais (AGUIAR et al., 2011; MARTINS et al., 2011). Perante essas circunstâncias, torna-se comum o uso excessivo de fertilizantes nitrogenados, e a utilização de técnicas como o cultivo de corte e queima, que é comumente utilizado na Amazônia Maranhense de forma errônea, tornando-se insustentável e ocasionando a degradação do solo pela perda da matéria orgânica devido às queimadas frequentes (REGO e KATO, 2018). Desta forma, para contornar essas situações têm-se utilizado os sistemas agroflorestais como o cultivo em aleias, no qual utilizam espécies arbóreas como as leguminosas em associação com culturas agrícolas para obter-se um equilíbrio ecológico da propriedade (ABDO et al., 2008).

A leucena, é uma espécie introduzida e bem adaptada às condições edafoclimáticas, e o seu cultivo e de outras leguminosas torna-se relevante pela capacidade de retenção de

macronutrientes, produção abundante de matéria orgânica e conseqüentemente melhoria na qualidade do solo e no cultivo de outras plantas no local, benefícios diretamente relacionados com as bactérias em simbiose com esta planta (SOUSA et al. 2018; EIRAS et al., 2011).

Frente as adversidades, torna-se importante o conhecimento das rizobactérias simbiontes da leucena nestes solos para que haja a seleção dos microrganismos com melhor capacidade de promoção de crescimento vegetativo desta leguminosa ou de outras espécies de plantas, resultando em alta produção de matéria orgânica e conseqüente melhoria na ciclagem de nutrientes do solo e recuperação da área degradada.

O reconhecimento da diversidade de rizobactérias é possível através da análise dos dados fenotípicos que se dá a partir da avaliação dos caracteres morfológicos, fisiológicos e bioquímicos dos isolados encontrados e sua habilidade de se adaptar aos diversos fatores abióticos, o que contribui com informações que possibilitam a descrição de novos gêneros e espécies de rizobactérias, e também corroboram com o conhecimento dos vários comportamentos dos diferentes grupos bacterianos (STRALIOTTO e RUMJANECK, 1999). Esta prática torna-se importante também para estabelecer o potencial econômico das rizobactérias, visto que há inúmeras dificuldades no estabelecimento de um inoculante devido à suscetibilidade das bactérias a fatores bióticos e abióticos (STREETER, 1994; MENDONÇA et al., 2020).

Sendo assim, a investigação da diversidade morfofisiológica de rizóbios nativos, sua capacidade de sobrevivência as diferentes condições do solo, e habilidade de nodulação de espécies de leguminosas, em solos da região amazônica oriental, juntamente com testes de eficiência simbiótica com estirpes comerciais e isolados nativos, tornam-se essenciais para o reconhecimento dos isolados com maior potencial a se tornarem inoculantes de leucena, podendo ser utilizada na recuperação de áreas degradadas e no cultivo associado com outras plantas de interesse econômico no local.

REFERENCIAL TEÓRICO

Rizobactérias e promoção de crescimento

As rizobactérias são microrganismos não-patogênicos que colonizam a rizosfera e apresentam efeitos benéficos às plantas. Estes microrganismos são conhecidos desde o século dezenove na agricultura devido à sua importância no crescimento e rendimento

vegetativo, devido a isto essas bactérias são conhecidas como Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCPs) (HARTHMAN, 2007). Dentre os benefícios que as rizobactérias podem trazer estão: a capacidade de acelerar a germinação da semente, fixação biológica de nitrogênio, produção de hormônios de crescimento vegetal e sideróforos, habilidade de inibir o crescimento de patógenos do solo produzindo uma diversidade de antibióticos, e biorremediação de solos contaminados. Além disso, estes microrganismos também podem induzir a resistência do sistema imune da planta para ter-se um controle eficaz de doenças (MELO, 1998). Todos estes benefícios causados pelas bactérias são capazes de desempenhar um efeito sobre o crescimento vegetal, que é possível ser observado através da altura, matéria seca ou produtividade da planta, podendo ser detectada na maioria dos pontos dos aspectos avaliados. Vários estudos já foram realizados sobre o tópico e sobre diferentes espécies de planta, como por exemplo em trabalhos de Nandakumar et al. (2001) em arroz, Fatima et al (2006) com soja, além de outros. Ju et al. (2019) em alfafa, Ayuso-Calles et al. (2020) em alface e Rafique et al. (2021) em grão-de-bico.

A fixação biológica de nitrogênio é um dos principais fatores que influenciam neste crescimento da planta, porém em estudos realizados por Hafeez et al (2004) mostraram que as cepas de rizóbios promoveram o crescimento do algodão devido a eficaz absorção de nutrientes como cálcio e potássio, associada com o crescimento radicular. Este efeito é em função de um dos principais causadores do desenvolvimento vegetativo, o ácido indol acético, hormônio produzido pelas RPCPs que promove o alongamento das células vegetais e regula o crescimento da planta, ocasionando então um aumento da superfície radicular e conseqüentemente uma maior absorção de nutrientes do solo e um aumento de locais de infecções dos microrganismos (AMARAL et al., 2017).

Ratz e colaboradores (2017) realizaram estudos com milho e soja, e relataram que após a inoculação das rizobactérias no cultivo de milho houve um aumento da massa seca da raiz, além de um aumento na concentração de nitrogênio (N) e potássio (K), enquanto ensaios com a soja resultaram em um aumento da produção de massa seca da parte aérea, número de vagens e sementes. Pesquisas já feitas em plantas não leguminosas como o rabanete, também evidenciaram essa capacidade quanto à promoção de crescimento da planta, visto que se verificou um aumento de 15% da matéria seca dos rabanetes após a inoculação destes microrganismos (AUTON et al., 1998).

Utilização da Leucena para a recuperação de áreas degradadas, agricultura de interesse econômico e pecuária

A *Leucaena leucocephala* (Lam), está entre uma das leguminosas mais cultivadas ao redor do mundo, devido a grande quantidade de regiões de planície nos trópicos e subtropicais. Entre os anos 70 e 80, esta planta ficou conhecida como “árvore milagrosa”, devido sua capacidade de sobrevivência e por ser muito forrageira e nutritiva (SHELTON e BREWBAKER, 1994). Esta leguminosa pode ser uma grande árvore com tronco irregular, coroa espalhada, ou um arbusto ramificado. Ela pode ser utilizada para inúmeras finalidades, como madeira, lenha, forragem e adubo verde (Parrotta, 1992). A leucena é uma planta resistente, sobrevivendo a um período consideravelmente longo de estiagem e carência hídrica, sendo encontrada em zonas subtropicais e tropicais como por exemplo a região amazônica maranhense. A espécie é fortemente utilizada em sistemas agrícolas em razão da sua capacidade de melhorar as condições do solo e favorecer o crescimento de outras plantas nativas ou de interesse econômico ao seu redor, devido a produção de matéria seca e FBN, corroborando na ciclagem de nutrientes do solo (PEREIRA FILHO et al., 2000; DRUMOND et al., 2010; QUEIROZ, 2006).

O impacto do melhoramento do solo através do reflorestamento com leucena já foi constatado através do aumento da população microbiana nos solos de *L. leucocephala* em comparação com solo sem vegetação, onde houve um acréscimo nas atividades respiratórias e urease destes microrganismos, podendo ser em razão do aumento de carbono orgânico no solo promovido por esta leguminosa (VALPASSOS et al., 2007). Além disso, a sua habilidade de tolerância à seca, melhor regeneração depois de queimadas e um crescimento mais eficiente em florestas secas subtropicais, tornam esta leguminosa um recurso próspero para a restauração destas regiões (WOLFE e VAN BLOEM, 2012).

Em relação a pecuária, estudos já realizados por Harrison et al. (2015) apresentaram resultados onde a leucena além de possuir uma aptidão para intensificar a produção animal, é capaz de reduzir a emissão de gases do efeito estufa através da mitigação da irradiação de metano entérico ruminante, sendo também uma planta que otimiza de forma sustentável a produção de carne bovina em sistemas de pastagem. Já em trabalhos realizados com caprinos leiteiros, relatam a importância da leucena como fonte

de nitrogênio, podendo ser inserida como suplemento alimentar sem resultados prejudiciais nestes animais (ONDIEK et al., 2000).

Seleção de estirpes promotoras de crescimento para o uso em leguminosas

Algumas espécies de leguminosas arbóreas, como a *Leucena leucocephala*, são consideradas espécies promíscuas, ou seja, tem capacidade se associar a mais de um gênero de rizobactéria (SOUZA et al., 2007; SILVEIRA, 2007). Sendo assim ela é importante para ter-se informações da diversidade de rizóbios nativos da Amazônia Maranhense, dado que ela pode ser introduzida em diversos locais do mundo e nodular com uma grande variedade de rizóbios, trazendo então elementos importantes para a identificação e caracterização dessas comunidades.

Apesar da leucena ser considerada uma espécie promíscua, isso não significa que sempre haverá uma grande capacidade de fixação biológica de nitrogênio, visto que muitos nódulos formados podem não ser eficientes, como já visto em estudo de Bala et al. (2001). A capacidade das rizobactérias fixarem o nitrogênio em simbiose com as leguminosas têm sido alvo de estudo de pesquisadores devido a sua importância agrícola (SILVA 2003; CARVALHO 2003). Estudos de Smyth *et al.* (1991) verificam a competência da substituição dos adubos minerais pelos adubos verdes devido à simbiose com rizobactérias. Contudo, agentes como temperatura, umidade, componentes do solo, manejo das culturas, entre outros, influenciam tanto na simbiose, quanto na biomassa vegetal proporcionada pelas leguminosas em associação com culturas de importância econômica, sendo a temperatura um dos fatores mais interferentes em solos tropicais (VARGAS E HUNGRIA, 1997; RAO e MATHUVA, 2000).

Em estudo de Bhargava *et al.* (2016), as rizobactérias tiveram seu crescimento máximo a 28 °C, e baixo ou nenhum crescimento em temperaturas acima de 40 graus, em razão da temperatura ter um efeito críticos em quase todas as fases de crescimento da planta e das bactérias simbiontes (HUNGRIA E VARGAS, 2000), constatando que a fixação biológica de nitrogênio em leguminosas tropicais possui limites de temperatura. Pesquisas como essa envolvendo a população de rizobactérias são de grande importância, visto que o processo de seleção e inserção de novos inoculantes mais aptos na eficiência simbiótica e sobrevivência ao meio, dependem do conhecimento dos caracteres morfofisiológicos e adaptativos, fornecendo também informações de sua taxonomia (ZILLI, 2001; AMORIM et al., 2019).

REFERÊNCIAS

ABDO, M. T. V. N.; VALERI, S. V.; MARTINS, A. L. M.. **Sistemas Agroflorestais e Agricultura familiar: uma parceria interessante.** Revista Tecnologia & Inovação Agropecuária, São Paulo, p.50-59, 2008.

AGUIAR, A. C. F. et al. (2011). **Efficiency of an agrosystem designed for family farming in the pre-Amazon region.** Renewable Agriculture and Food Systems, 26(1), 24–30. doi:10.1017/S1742170510000396.

AMARAL, P. P.; et al. **Promotores de crescimento na propagação de caroba.** Pesquisa Florestal Brasileira, [S. l.], v. 37, n. 90, p. 149–157, 2017. DOI: 10.4336/2017.pfb.37.90.1402.

AMORIM, Marineide Rodrigues do et al. **Caracterização de rizóbios noduladores de feijão-fava (*Phaseolus lunatus*L.) em solos de três estados do nordeste brasileiro.** Colloquium Agrariae, [S.L.], v. 15, n. 6, p. 11-20, 5 dez. 2019. Associação Prudentina de Educação e Cultura (APEC) <http://dx.doi.org/10.5747/ca.2019.v15.n6.a331>.

Antoun, H., et al. **Potential of Rhizobium and Bradyrhizobium species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.).** Molecular Microbial Ecology of the Soil. Developments in Plant and Soil Sciences, vol 83, 1998.

AYUSO-CALLES, Miguel *et al.* **Rhizobium laguerreae Improves Productivity and Phenolic Compound Content of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) under Saline Stress Conditions.** Foods, [S.L.], v. 9, n. 9, p. 1166, 24 ago. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/foods9091166>.

BALA, A. et al. **Symbiotic specificity of tropical tree rhizobia for host legumes.** New Phytologist, [S.L.], v. 149, n. 3, p. 495-507, mar. 2001. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00059.x>.

BHARGAVA, Y. et al. **Phenotypic, Stress Tolerance and Plant Growth Promoting Characteristics of Rhizobial Isolates from Selected Wild Legumes of Semiarid Region, Tirupati, India.** Advances In Microbiology, [S.L.], v. 06, n. 01, p. 1-12, 2016. Scientific Research Publishing, Inc.. <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2016.61001>.

BREDEMEIER, C. et al. **Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas.** Ciência Rural, [S.L.], v. 30, n. 2, p. 365-372, abr. 2000. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782000000200029>.

CANFIELD, D. E. et al. **The Evolution and Future of Earth's Nitrogen Cycle.** Science, [S.L.], v. 330, n. 6001, p. 192-196, 7 out. 2010. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1186120>.

Carvalho, F.G. 2003. **Variabilidade de Isolados de Estirpes de Bradyrhizobium spp. recomendadas para cultura da soja.** Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Rio Grande do Sul. 104 p

DAI, J. et al. **Genetic diversity and phylogeny of rhizobia isolated from Caragana microphylla growing in desert soil in Ningxia, China.** Genetics And Molecular Research, [S.L.], v. 11, n. 3, p. 2683-2693, 2012. Genetics and Molecular Research. <http://dx.doi.org/10.4238/2012.june.25.5>.

DRUMOND, M. A. et al.; **(Leucaena leucocephala): Uma leguminosa de uso múltiplo para o semiárido brasileiro.** Embrapa Semiárido, 2010.

EIRAS, P.P. et al. **Utilização de leguminosas na adubação verde para a cultura de milho.** InterSciencePlace, v.17, n.4, p.96–124, 2011.

FATIMA, Zarrin; et al. **Effect of Rhizobium strains and phosphorus on growth of soybean Glycine max and survival of Rhizobium and P solubilizing bacteria.** Pakistan Journal of Botany, v. 38, n. 2, p. 459, 2006.

GALLOWAY, J. N. et al. **Transformation of the Nitrogen Cycle: recent trends, questions, and potential solutions.** Science, [S.L.], v. 320, n. 5878, p. 889-892, 16 maio 2008. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1136674>.

GRUBER, N., et al. **Uma perspectiva do sistema terrestre do ciclo global de nitrogênio.** Nature 451, 293-296 (2008). <https://doi.org/10.1038/nature06592>

GUIMARÃES, A. A. et al. **Genetic and symbiotic diversity of nitrogen-fixing bacteria isolated from agricultural soils in the western amazon by using cowpea as the trap plant.** Applied and Environmental Microbiology, v. 78, p. 6726–6733, 2012.

HAFEEZ, F. Y. et al. **Rhizobial inoculation improves seedling emergence, nutrient uptake and growth of cotton.** Australian Journal Of Experimental Agriculture, [S.L.], v. 44, n. 6, p. 617, 2004.

HARRISON, Matthew T. et al. **Improving greenhouse gas emissions intensities of subtropical and tropical beef farming systems using Leucaena leucocephala.** Agricultural Systems, v. 136, p. 138-146, 2015.

Harthmann, O. E. L. et al. **Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas.** Agropecuária Catarinense, 20(3), 51-53, 2007.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. **Environmental factors affecting grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil.** Field Crops Research, v.65, p.151-164, 2000.

JU, Wenliang *et al.* **Impact of co-inoculation with plant-growth-promoting rhizobacteria and rhizobium on the biochemical responses of alfalfa-soil system in**

copper contaminated soil. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, [S.L.], v. 167, p. 218-226, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.10.016>.

MARTINS, C. et al., **Ciclos globais de carbono, nitrogênio e enxofre: a importância na Química da atmosfera.** Cadernos temáticos de química nova na escola, São Paulo, n. 5, p. 28-41, nov. 2003.

MARTINS, M. B et al. **Amazônia Maranhense: Diversidade e Conservação.** Belém: MPEG, 328 p, 2011.

MENDONÇA, Johny Jesus et al. **Diversidade, mecanismos de atuação e potencial agrícola de bactérias promotoras de crescimento de plantas, usando milho como cultura exemplo.** *Pesquisa Agropecuária Pernambucana*, Brasil, v. 25, n. 2, jan. 2021. ISSN 2446-8053.

MELO, I.S. **Rizobacterias promotoras de crescimento de plantas: descrição e potencial de uso na agricultura.** *Ecologia Microbiana*. EMBRAPA Meio Ambiente, Jaguariuna, p. 86-116, 1998.

NANDAKUMAR, R.; BABU, S.; VISWANATHAN, R.; RAGUCHANDER, T. & SAMIYAPPAN, R. **Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by *Pseudomonas fluorescens*** *Soil Biol. Biochem.*, 33:603-612,2001.

ONDIEK, J. O. et al. **Use of *Leucaena leucocephala* and *Gliricidia sepium* as nitrogen sources in supplementary concentrates for dairy goats offered Rhodes grass hay.** *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, v. 13, n. 9, p. 1249-1254, 2000.

Parrotta, J.A. (1992) ***Leucaena Leucocephala* (Lam.) de Wit *Leucaena*, Tantan.** SO-ITFSM-52. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station, New Orleans, Louisiana.

PEREIRA FILHO, I. A et al. **Uso da leucena como fonte alternativa de adubo nitrogenado para o cultivo do milho.** In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 23., 2000, Uberlândia. Resumo em Anais de Congresso. Sete Lagoas: ABMS: Embrapa Milho e Sorgo; Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 2000. p. 114.

QUEIROZ, L. R. **Leguminosas como fonte de nitrogênio para a cultura do milho, em campos dos Goytacazes-RJ.** 72 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, abril de 2006.

RAFIQUE, Munazza *et al.* **The Combined Effects of Gibberellic Acid and Rhizobium on Growth, Yield and Nutritional Status in Chickpea (*Cicer arietinum* L.).** *Agronomy*, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 105, 8 jan. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/agronomy11010105>.

RAO, M.R.; MATHUVA, M.N.. **Legumes for improving maize yields and income in semi-arid Kenya.** Agriculture, Ecosystems & Environment, [S.L.], v. 78, n. 2, p. 123-137, abr. 2000.

REGO, A. K. C.; KATO, O. R. **Agricultura de corte e queima e alternativas agroecológicas na Amazônia.** Novos Cadernos NAEA, v. 20, n. 3, 2018.

SHELTON, Herbert Max; BREWBAKER, James L. **Leucaena leucocephala-the most widely used forage tree legume. Forage tree legumes in tropical agriculture.**(Eds. RC Gutteridge and HM Shelton). CAB International. Wallingford, UK, v. 15, 1994.

Silva, V.N. **Resposta da co-inoculação Bradyrhizobium x Paenibacillus na nodulação e desenvolvimento do caupi (Vigna unguiculata [L.] Walp).** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, Pernambuco. 90 p, 2003.

SILVEIRA, A. P. D. da et.al. **Microbiota do solo e qualidade ambiental.** Campinas: Instituto Agronômico, 2007. 312 p.

SMYTH, T.J.; CRAVO, M.S.; MELGAR, R.J. **Nitrogen supplied to corn by legumes in a Central Amazon Oxisol.** Tropical Agriculture , v.68, n.4, p.366-372, 1991.

SOUSA, R. M. et al. **Indicadores visuais de qualidade do solo em agroecossistemas familiares maranhenses.** ACTA TECNOLÓGICA v.13, nº 1, p. 109-119, 2018

SOUZA, L. A. G. et al . **Desenvolvimento e nodulação natural de leguminosas arbóreas em solos de Pernambuco.** Pesq. agropec. bras., Brasília , v. 42, n. 2, p. 207-217, Feb. 2007 .

STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N.G. **Aplicação e evolução dos métodos moleculares para o estudo da biodiversidade do rizóbio.** Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1999. 70p. (Documentos 93)

STREETER, J.G. **Failure of inoculant rhizobia to overcome the dominance of indigenous strains for nodule formation.** Canadian Journal of Microbiology, v. 40, p.513-512. 1994

VALPASSOS, M. A. R. et al. **Recovery of soil microbiological properties in a degraded area planted with Corymbia citriodora and Leucaena leucocephala.** Scientia Agricola, v. 64, n. 1, p. 68-72, 2007.

Vargas, M.A.T. & M. Hungria. **Biologia dos solos dos cerrados.** Embrapa-CPAC, Planaltina, DF. 524 p, 1997.

WOLFE, B.T.; VAN BLOEM, S. J. **Subtropical dry forest regeneration in grass-invaded areas of Puerto Rico: understanding why Leucaena leucocephala dominates and native species fail.** Forest Ecology and Management, v. 267, p. 253-261, 2012.

ZILLI, J. E. **Caracterização e seleção de estirpes de rizóbio para inoculação de caupi [vigna unguiculata (l) walp] em áreas de Cerrado.** Universidade Federal Rural Rio de Janeiro, Seropédica, RJ (Dissertação de Mestrado), 94p., 2001.

MANUSCRITO

Pedro Gustavo Lima Gomes; Kátia Pereira Coelho; Alana das
Chagas Ferreira Aguiar.

**DIVERSIDADE MORFOFISIOLÓGICA E POTENCIAL DE
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE RIZOBACTÉRIAS
ISOLADAS DE *Leucaena leucocephala* DA AMAZÔNIA ORIENTAL**

A SER SUBMETIDO À REVISTA DE ESTUDOS AMBIENTAIS

DIVERSIDADE MORFOFISIOLÓGICA E POTENCIAL DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE RIZOBACTÉRIAS ISOLADAS DE *Leucaena leucocephala* DA AMAZÔNIA ORIENTAL

MORPHOPHYSIOLOGICAL DIVERSITY AND GROWTH-PROMOTING POTENTIAL OF ISOLATED RHIZOBACTERIA OF *Leucaena leucocephala* FROM THE EASTERN AMAZON

Pedro Gustavo Lima Gomes ¹

Kátia Pereira Coelho ²

Alana das Chagas Aguiar ³

¹ Discente da Universidade Federal do Maranhão, São Luís - MA, Brasil. E-mail para correspondência: pedrogustavo@gmail.com

² Pesquisadora de Pós-doutorado na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, Brasil. E-mail para correspondência: katiapc04@gmail.com

³ Docente da Universidade Federal do Maranhão, São Luís - MA, Brasil. E-mail para correspondência: alana.aguiar@ufma.br

ARTIGO

Diversidade morfofisiológica e potencial de promoção de crescimento de rizobactérias isoladas de *Leucaena leucocephala* da Amazônia oriental

Morphophysiological diversity and growth-promoting potential of isolated rhizobacteria of *Leucaena leucocephala* from the eastern Amazon

RESUMO

O objetivo deste estudo foi isolar, caracterizar e avaliar a diversidade morfofisiológica de rizobactérias nativas simbiotes de leucena na região amazônica do Maranhão, além de analisar a tolerância das estirpes indígenas a fatores abióticos e sua eficiência em promover o crescimento vegetal em comparação com a adubação nitrogenada e um inoculante comercial. As estirpes foram isoladas, caracterizadas morfofisiologicamente e submetidas a testes de tolerância a fatores abióticos como NaCl (nas concentrações de 1%, 2% e 3%), temperatura de 45 °C e pH ácido (pH 5,0) e alcalino (pH 9,0), e posteriormente foram testadas suas habilidades de promoção de crescimento e capacidade nodulífera em leucena. Das 75 estirpes isoladas, a maioria foram de crescimento rápido, acidificaram o meio de cultura, tinham a coloração amarela e possuíam colônias pequenas com o diâmetro menor que 1 mm. Os isolados indígenas tiveram um crescimento satisfatório em todos os testes de tolerância, crescendo nos primeiros três dias. Não houve diferença significativa entre os parâmetros de crescimento vegetal quando comparado a inoculação das estirpes nativas com os demais tratamentos, porém a eficiência relativa das estirpes indígenas foi similar ao tratamento com adubação nitrogenada e a estirpe N8A2IS2 se sobressaiu tendo um melhor desempenho quanto a eficiência relativa.

Palavras chave: Rizobactérias, Fixação biológica de nitrogênio, Promoção de crescimento vegetal, tolerância a fatores abióticos.

ABSTRACT

The aim of this study was to isolate, characterize and evaluate the morphophysiological diversity of symbiotic native rhizobacteria of Leucaena in the Amazon region of Maranhão, in addition to analyzing the tolerance of indigenous strains to abiotic factors and their efficiency in promoting plant growth compared to nitrogen fertilization. and a commercial inoculant. The strains were isolated, morphophysiologicaly characterized and subjected to tolerance tests to abiotic factors such as NaCl (at concentrations of 1%, 2% and 3%), temperature of 45 °C and acid (pH 5.0) and alkaline (pH 9), and subsequently tested its growth-promoting abilities and leucaena nodular capacity. Of the 75 strains isolated, most were fast growing, acidified the culture medium, had a yellow color and had small colonies with a diameter smaller than 1 mm. Indigenous isolates had satisfactory growth in all tolerance tests, growing within the first three days. There was no significant difference between the plant growth parameters when comparing the inoculation of native strains with the other treatments,

however the relative efficiency of the indigenous strains was similar to the treatment with nitrogen fertilization and the N8A2IS2 strain stood out with a better performance in terms of relative efficiency.

Keywords: Rhizobacteria, Biological nitrogen fixation, Promotion of plant growth, tolerance to abiotic factors

1 INTRODUÇÃO

Na Amazônia Maranhense há presença de inúmeros produtores familiares que utilizam o sistema de corte e queima como técnica de preparo do solo, direcionado para a agricultura de subsistência. Porém, estudos revelam que esta técnica altera a composição da atmosfera e a ciclagem de nutrientes do solo, considerada então uma ameaça ao equilíbrio do ecossistema, em virtude da alta queima de matéria orgânica e baixa reposição de nutrientes (ZILLI *et al.*, 2009; GUALTER *et al.*, 2011; DENNIS, 2013). Devido a estas consequências, outras técnicas de cultivo, como o sistema de cultivo em aleias, são propostas como uma via alternativa e mais sustentável, no qual utilizam plantas como as leguminosas com intuito de reduzir o impacto ambiental e aumentar a produtividade agrícola (AGUIAR *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2018)

A utilização das leguminosas como adubo verde, tem associação direta com a relação simbiótica com rizobactérias, visto que estes microrganismos são capazes de promover o crescimento da planta por meio da fixação biológica de nitrogênio (FBN), aumentando a quantidade de matéria seca e assim contribuindo na ciclagem de nutrientes do solo, favorecendo então as culturas de interesse econômico (BERRADA *et al.*, 2014; ESPINDOLA *et al.*, 2005). Além da FBN, as rizobactérias possuem diversos mecanismos que promovem o crescimento vegetal e uma boa produtividade da cultura, como: controle biológico de doenças, indução de resistência a patógenos, produção de fitormônios, solubilização de fosfato entre outros (VIEIRA JÚNIOR *et al.*, 2013). Neste processo deve-se levar em consideração a capacidade da estirpe competir com os outros microrganismos nativos, visto que algumas estirpes comerciais podem não ter essa capacidade e não serem adaptadas a diferentes tipos de solo, portanto não sendo capaz de colonizar o ambiente por motivo das condições climáticas da região ou competitividade com a microbiota local (FERNANDES JÚNIOR *et al.*, 2008).

Atualmente existe uma série de estudos com intuito de reconhecimento das rizobactérias simbiontes de *Leucaena leucocephala* (Leucena), visto que a coleta de informações desses microrganismos pode colaborar com uma maior ação promotora de crescimento vegetal, auxiliar na redução da utilização de fertilizantes nitrogenados nos cultivos de interesse econômico e contribuir para restauração de áreas degradadas (SILVA *et al.*, 2012; CARVALHO *et al.*, 1999; ARAÚJO *et al.*, 2010; RAMOS *et al.*, 2013). Além disso, a identificação desses microrganismos auxilia na seleção de estirpes mais adaptadas às condições edafoclimáticas, tendo a capacidade de sobreviver ao meio ambiente e a competição com outras bactérias (COELHO, 2011). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi isolar, caracterizar e avaliar a diversidade morfofisiológica de

rizobactérias nativas simbiontes da leguminosa arbórea *Leucaena leucocephala*, além de analisar a tolerância das estirpes isoladas a fatores abióticos e sua eficiência em promover o crescimento da planta em comparação com a adubação nitrogenada e um inoculante comercial.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Características do local de coleta e obtenção dos nódulos radiculares

A coleta e isolamento dos nódulos foram realizados por Souza (2021), aplicando um método que se resume na coleta do solo de duas regiões diferentes de Pedro do Rosário, um município do estado do Maranhão localizado entre as coordenadas 2° 58' 38" S e 45° 20' 47" O, e posteriormente semeando sementes de leucena (*Leucaena leucocephala*) como planta-isca para a captura das bactérias presentes no solo e consecutivamente a coleta dos nódulos radiculares formados.

A região de Pedro do Rosário tem seu território totalmente composto pelo bioma Amazônia e ambos os locais onde foram coletadas as amostras de solo são manejadas por agricultores familiares. Pressupõe-se que há uma microbiota diferente nessas duas áreas em razão da diferença espacial entre os locais e pelo manejo do solo de ambos, visto que área 1 é classificada como uma área de roça no toco, onde não houve cultivo há mais de 10 anos e recentemente passou pelo processo de corte e queima, já a área 2 é classificada como uma pastagem degradada.

2.2 Isolamento e caracterização morfológica das estirpes de rizóbio a partir dos nódulos de *Leucaena*

Para dar início ao isolamento das bactérias dos nódulos, eles foram hidratados em água autoclavada durante 2 horas e precisaram ser desinfestados para eliminar possíveis contaminações. Após hidratados cada nódulo foi mantido por 30 segundos em álcool 70% (v/v), em seguida 3 minutos na solução de peróxido de hidrogênio 3,5% (v/v) e para finalizar, 4 lavagens em água destilada autoclavada. Os nódulos foram comprimidos com uma pinça até que o líquido interior dos nódulos entrasse em contato com o meio YMA (yeast-mannitol-agar) contendo azul de bromotimol (Vincent, 1970), e durante 15 dias avaliamos as placas de petri contendo o material dos nódulos. Posteriormente as colônias crescidas foram isoladas em meio sólido YMA a temperatura ambiente dentro de 7 dias.

As rizobactérias obtidas na etapa de isolamento foram descritas morfofisiologicamente de acordo com as variáveis presentes no formulário de avaliação morfofisiológica do Manual de Curadores de Germoplasma - Microrganismos (Hungria e Silva, 2011), sendo as seguintes características selecionadas para o presente estudo: tempo de crescimento de colônias isoladas (rápido: 1-3 dias; intermediário: 4-5 dias; lento: 6 a 9 dias; muito lento: acima de 10 dias); reação ao pH em meio YMA com azul de bromotimol (ácido, básico, neutro); diâmetro, cor, produção de muco, consistência e característica óptica. A estirpe comercial (SEMIA 6153 - *Bradyrhizobium japonicum*) utilizada como referência também foi descrita morfológicamente para ser utilizada como parâmetro

em todos os testes realizados neste trabalho. Esta estirpe foi disponibilizada pela Coleção SEMIA de Rizóbios do Laboratório de Microbiologia Agrícola da DDP/SEAPI, Porto Alegre, Brasil. Posteriormente a esta etapa de caracterização, a diversidade das estirpes foi representada por um dendrograma que agrupou as estirpes de acordo com seu grau de similaridade. Foi utilizado o método de agrupamento aglomerativo hierárquico UPGMA (Unweighted Pair Group Methodizing Arithmetic Averages), e o grau de similaridade foi avaliado a partir do índice de Jaccard. Utilizou-se o programa R (R Development Core Team, 2014) para gerar o dendrograma, juntamente com os pacotes "gclus" (Hurley, 2019) e "dendextend" (Galili, 2015) para realizar a análise de cluster.

2.3 Testes Fisiológicos

Os 25 isolados selecionados para a autenticação e a estirpe comercial foram expostos a três testes fisiológicos, sendo eles: tolerância à salinidade, pH e alta temperatura. Todos os testes fisiológicos foram realizados em quadruplicatas e contendo uma alíquota de meio líquido com material bacteriano, com o auxílio de uma alça de platina flambada.

A tolerância à salinidade foi determinada em placas contendo meio YMA acrescido de 1%, 2% e 3% de NaCl com o pH entre 6,8 a 7. Este teste foi mantido em temperatura ambiente durante 9 dias (Coelho, 2011).

Para o teste de tolerância a altas temperaturas, as bactérias foram transferidas para placas de petri contendo meio YMA com pH entre 6,8 e 7, e mantidas em uma estufa de secagem com temperatura de 45° C durante 7 dias, adaptada com uma bandeja contendo água para umidificação da estufa (Coelho, 2011).

No teste de pH os isolados foram submetidos a meios com alto nível de acidez (pH 5) e alcalinidade (pH 9) regulados com ácido acético (absoluto) e hidróxido de potássio (1M), posteriormente foram mantidas em temperatura ambiente durante 7 dias.

2.4 Autenticação das Estirpes

Feito uma matriz binária baseada nas características fenotípicas e posteriormente o dendrograma de similaridade, foram selecionados 25 isolados para a autenticação baseado nos grupos formados no dendrograma. Neste teste foi avaliado a capacidade de promoção do desenvolvimento vegetativo de leucena a partir da inoculação destas estirpes. Os inoculantes foram preparados em meio líquido, sob agitação constante por 24 horas., estes foram inoculados em sementes desinfestadas de leucena postas em papel de germinação encharcado em solução nutritiva (Hoagland & Arnon) integrada em um recipiente estéril de vidro. O experimento foi inteiramente casualizado com 3 repetições de cada tratamento, sendo eles: tratamento controle contendo solução com baixo teor de nitrogênio e nenhuma inoculação; tratamento com alto teor de nitrogênio e nenhuma inoculação; tratamento com baixo teor de nitrogênio e inoculação de estirpe comercial (SEMIA 6153); tratamento com baixo teor de nitrogênio e inoculação das estirpes isoladas adquiridas dos nódulos.



Figura 1: Teste de autenticação realizado em casa de vegetação.

O teste de autenticação foi conduzido em casa de vegetação (Figura 1) ao decorrer de 45 dias e feito a reposição de solução nutritiva de acordo com o volume contido no recipiente. Após a retirada do experimento foram avaliados parâmetros de desenvolvimento das mudas como: altura e diâmetro da parte aérea; massa seca da raiz e da parte aérea (quantificados após secagem na estufa a 55°C por 72hrs). Em seguida, os valores da massa seca da parte aérea (MSPA) dos isolados e do tratamento com alto teor de nitrogênio, foram postos em um cálculo de eficiência relativa para averiguar o acúmulo da massa seca de ambos os tratamentos.

$$Efr = (MSPA_{\text{inoculado}} / MSPA_{\text{com N}}) \times 100$$

Utilizando o software R, os parâmetros de crescimento vegetal foram sujeitos ao teste Shapiro-Wilk para averiguar se os dados tinham uma distribuição normal. Constatado que não havia uma distribuição normal entre eles, foi necessário utilizar o teste não paramétrico Kruskal-Wallis (Kruskal e Wallis, 1952) para analisar se havia diferença significativa entre todos os parâmetros avaliados, ou seja, se o desenvolvimento vegetal era diferente de acordo com os tratamentos utilizados. Foi utilizado o pacote “agricolae” (Mendiburu, 2021) para o teste de análise de Kruskal-Wallis.

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização morfofisiológica e diversidade das estirpes

Obtivemos 31 isolados de leucena da área 1 e 44 da área 2 resultantes da riscagem dos nódulos, um total de 75 estirpes. Estes isolados em sua maioria foram de crescimento rápido (81,57%), acidificaram o meio de cultura (81,57%), tinham a coloração amarela (61,84%), além de serem caracterizadas como colônias pequenas com o diâmetro menor que 1 mm (86,84%). Em relação a produção de muco 43,42% das estirpes produziram moderadamente, enquanto apenas 6,57% produziram de forma abundante. A consistência do muco produzido foi variada, não tendo uma diferença significativa entre as características butírica (26,31%), viscosa (22,36%), gomosa (22,36%) e aquosa (19,73%), porém a consistência seca (9,21%) apareceu em menor quantidade. Quanto a óptica houve um predomínio de colônias opacas (55,26%) e translúcidas (42,10%), sendo apenas 2,63% consideradas transparentes (Tabela 1).

A alteração do pH no meio de cultura YMA é utilizada para diferenciação dos gêneros de rizóbios, onde *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* são capazes de acidificar o meio, e em contrapartida *Azorhizobium* e *Bradyrhizobium* alcalinizam o meio. A habilidade de rápido crescimento, acidificação do meio YMA e produção de muco, são relacionados a rizobactérias pertencentes ao gênero *Rhizobium* (Lima *et al* 2012). Desde a década de 70, estudos reportam que a habilidade de um rápido crescimento e acidificação do meio de cultura desempenha uma vantagem competitiva das estirpes quando comparado com isolados de crescimento lento e que alcalinizam o meio, principalmente com associação à capacidade saprofítica e colonização dos locais de infecção (Bushby & Marshall, 1977)

O dendograma construído (Fig. 2) com as características morfofisiológicas dos 75 isolados de ambas as áreas resultou na formação de 13 grupos. O grupo I, representado apenas pela estirpe N7A2LIS3, é o grupo que possui a maior dissimilaridade entre os demais. O grupo IX foi o mais abundante contendo 30 isolados, englobando estirpes das duas áreas, e os grupos I, VIII e XII, foram os menores e menos diversos contendo apenas uma estirpe representante. Os grupos VI e XII possuem estirpes apenas da área 1, enquanto os grupos I, VIII e XI possuem apenas representantes da área 2. As áreas apresentaram diversidade parecida, uma vez que a área 1 foi representada em dez grupos e a área 2 em onze dos 13 agrupamentos. O grupo IX foi o que apresentou um maior número de isolados com 100% de similaridade, um total de 17 estirpes. Porém, apenas um par de isolados similares correspondiam a áreas diferentes (N8A2LIS1 e N6A1LIS3), todas as outras estirpes similares eram da mesma área (A1 ou A2). Após a identificação de isolados similares em todos os grupos, o número de estirpes morfológicamente distintas reduziu de 75 para 40. O grupo IX com 30 representantes, apresentou apenas 13 estirpes com caracteres diversos, sendo o grupo mais diverso.

Figura 1: Dendrograma de similaridade com base em características morfoculturais dos isolados de nódulos da *Leucaena leucocephala* da região amazônica maranhense.

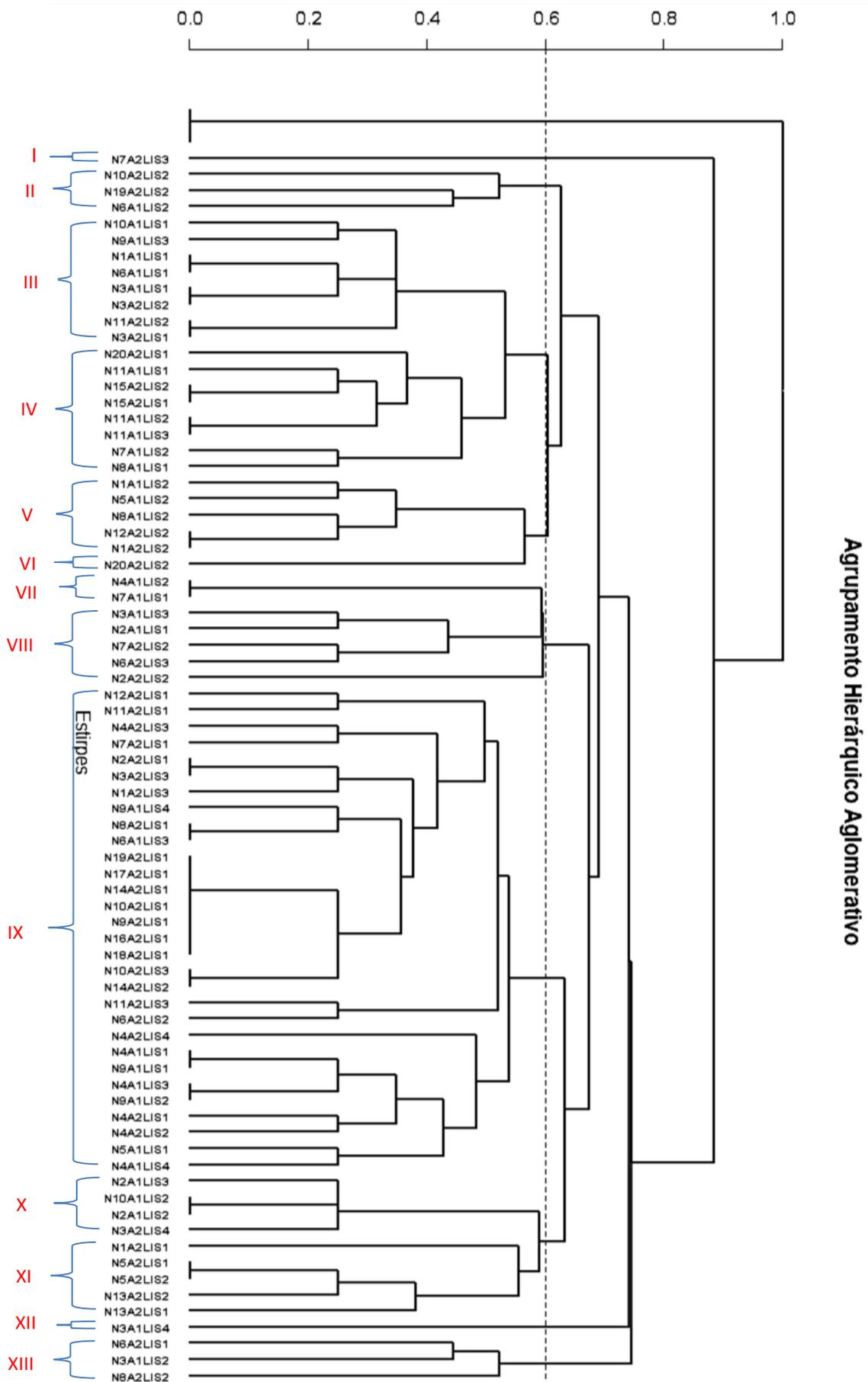


Tabela 1. Grupos morfoculturais de rizóbios baseado nas sete características fenotípicas das colônias. *TC = tempo de crescimento, D = diâmetro, pH = alteração do pH do meio, MUCO = produção de muco, CONS = consistência do muco, ÓPTICA = passagem de luz pela colônia, COR = cor da colônia, N° = número de estirpes.

CARACTERÍSTICAS								
GRUPOS	TC	D	pH	MUCO	CONS.	ÓPTICA	COR	N°
I	lenta	<1	alcalina	escasso	aquosa	transparente	incolor	1
II	muito lenta. lenta	<1	acida	pouco, escasso, moderado	aquosa, butírica	opaca	creme	3
III	rapida	<1	acida	moderado	gomosa, aquosa	opaca, transparente , translúcida	creme	8
IV	rapida, muito lenta	<1	neutra, acida	pouco, moderado	gomosa, aquosa	translúcida, opaca,	creme, amarela	8
V	rapida	entre 1 e 2, <1	acida, alcalina, neutra	pouco, escasso	seca, butírica	opaca	creme, amarela	5
VI	rapida	<1	neutra	escasso	seca	opaca	amarela	1
VII	rapida, intermediária	entre 1 e 2, <1	alcalina, acida	escasso, moderado	butírica, gomosa	opaca, translúcida	amarela	2
VIII	rapida	entre 1 e 2	acida	moderado	viscosa	opaca	amarela	5
IX	rapida, intermediária, muito lenta	entre 1 e 2, <1	acida	moderado, pouco, escasso	gomosa, butírica, aquosa, viscosa, seca	opaca, translúcida	amarela, creme	30
X	intermediária, lenta, rapida	entre 1 e 2, <1	acida	escasso, moderado	butírica, viscosa	translúcida, opaca	amarela	4
XI	rapida, intermediária	entre 1 e 2, <1	acida	escasso, abundante, moderado	gomosa, viscosa, aquosa	translúcida, opaca	incolor, amarela	5
XII	intermediária	<1	acida	abundante	viscosa	translúcida	creme	1
XIII	rapida, lenta	menor que 1	acida, alcalina	abundante, pouco	gomosa, butírica	translúcida	amarela, incolor	3

As características presentes em cada grupo e que os diferenciam são mostrados na Tabela 1, onde é possível observar que a maioria dos grupos tem uma variedade de caracteres. Os grupos IX e XI são os mais diversos, possuindo um número maior de características (18 e 15 respectivamente), enquanto os grupos I, VI, VIII e XII são os menos diversos, possuindo apenas uma característica comum a todos.

3.2 Testes Fisiológicos

No presente estudo, dos 40 isolados distintos morfologicamente, 25 estirpes nativas foram selecionadas de acordo com o grau de similaridade do dendograma para o teste de autenticação juntamente com a estirpe comercial SEMIA 6153 (Tabela 2).

Tabela 2. Caracterização das estirpes quanto a resistência a fatores abióticos. (*MR = muito rápido (1 dia), R = rápido (2-3 dias), I = intermediário (4-5 dias), L = lento (5-10 dias) e X = sem crescimento.)

ESTIRPES	NaCl (1%)	NaCl (2%)	NaCl (3%)	Temperatura (45°C)	pH (5%)	pH (9%)
SEMIA 6153	MR	MR	MR	MR	C (1-3 dias)	C (1-3 dias)
N1A1 IS2	MR	MR	MR	MR	C (1-3 dias)	C (1-3 dias)
N3A1 IS3	MR	MR	R	R	C (1-3 dias)	C (1-3 dias)
N3A1 IS4	MR	MR	MR	MR	C (1-3 dias)	C (1-3 dias)
N4A1 IS2	MR	R	MR	MR	C (1-3 dias)	C (1-3 dias)
N4A1 IS4	R	R	MR	MR	C (1-3 dias)	C (1-3 dias)
N6A1 IS2	MR	R	MR	MR	C (1-3 dias)	C (1-3 dias)
N8A1 IS1	MR	MR	R	R	C (1-3 dias)	C (1-3 dias)
N10A1 IS1	MR	MR	MR	MR	C (1-3 dias)	C (1-3 dias)
N1A2 IS1	MR	MR	MR	MR	C (1-3 dias)	C (1-3 dias)
N2A2 IS2	MR	MR	MR	MR	C (1-3 dias)	C (1-3 dias)
N3A2 IS2	R	R	MR	MR	C (1-3 dias)	C (1-3 dias)
N4A2 IS4	MR	R	MR	MR	C (1-3 dias)	C (1-3 dias)
N6A2 IS1	MR	R	MR	MR	C (1-3 dias)	C (1-3 dias)
N6A2 IS3	MR	MR	MR	MR	C (1-3 dias)	C (1-3 dias)
N7A2 IS3	MR	MR	R	R	C (1-3 dias)	C (1-3 dias)
N8A2 IS2	MR	X	MR	MR	C (1-3 dias)	C (1-3 dias)
N10A2 IS2	MR	MR	R	R	C (1-3 dias)	C (1-3 dias)
N11A2 IS1	MR	MR	R	R	C (1-3 dias)	C (1-3 dias)
N11A2 IS2	R	R	MR	MR	C (1-3 dias)	C (1-3 dias)
N11A2 IS3	MR	MR	MR	MR	C (1-3 dias)	C (1-3 dias)
N12A2 IS1	MR	MR	R	R	C (1-3 dias)	C (1-3 dias)
N13A2 IS1	MR	MR	MR	MR	C (1-3 dias)	C (1-3 dias)
N15A2 IS1	R	MR	R	R	C (1-3 dias)	C (1-3 dias)
N20A2 IS1	R	R	X	X	C (1-3 dias)	C (1-3 dias)
N20A2 IS2	MR	MR	MR	MR	C (1-3 dias)	C (1-3 dias)

No teste de tolerância à salinidade, todos os isolados cresceram no meio com concentração de 1% de NaCl. Os isolados N4A1LIS4, N3A2LIS2, N11A2LIS2, N15A2LIS1 e N20A2LIS1 tiveram o crescimento rápido com aparecimento de colônias a partir do terceiro dia, enquanto todos as outras estirpes apresentaram o crescimento muito rápido (1º dia). Esta tolerância ao estresse salino torna-se uma característica complexa pois envolve não só a habilidade da bactéria de tolerar este estresse como também a velocidade da resposta a se adaptar a essas mudanças ambientais (Ali *et al.*, 2009). Arbi *et al.* (2015) relata que esta adaptação à tolerância salina está associada à tolerância à seca nestes ambientes em determinadas épocas do ano.

Nas concentrações de 2% e 3% de NaCl, apenas 1 isolado em cada teste não apresentou resistências ao nível de salinidade, sendo a estirpe N8A2LIS2 no teste de 2% e a N20A2LIS1 em 3%. Entretanto, a estirpe N8A2LIS2 teve o crescimento muito rápido em 1% e 3% de NaCl, é provável que durante a repicagem do isolado na placa de petri tenha sido inoculado um número menor de células bacterianas, fazendo com que a inibição de crescimento pelo nível de salinidade tenha sido mais eficiente. As estirpes que foram ao teste nas duas concentrações (2% e 3%), exibiram o crescimento muito rápido ou rápido, demonstrando uma adaptação favorável a este fator. Divergente dos resultados encontrados, Nogales *et al.* (2009) observou que o aumento da concentração de sal no meio tem efeito retardante no crescimento das colônias nas primeiras 24 a 48 horas, devido a toxicidade direta através do estresse osmótico. Thrall *et al.* (2008) e Ali *et al.* (2009) também relataram em seus estudos que com o aumento das concentrações de NaCl houve um efeito negativo na taxa de crescimento das rizobactérias, e que na ausência da salinidade os mesmos apresentam crescimento reduzido, concluindo que a tolerância ao estresse salino e a taxa de crescimento estão correlacionados positivamente. Esta tolerância a altos níveis de estresse salino em todas os isolados de rizobactérias indígenas pode ser devido à adaptação fisiológica ao solo nativo (BHARGAVA *et al.*, 2016), já que todas as estirpes foram retiradas da mesma região geográfica e ambos os locais apresentavam solo degradado. Análogo aos resultados expostos, estudos de Hashem *et al.*, (1998) relataram que estirpes indígenas de *Leucena* também apresentaram crescimento significativo em meio de cultura com 3% de NaCl, podendo tolerar também meios acima de 4% de salinidade.

Ambos os solos estudados neste trabalho apresentavam uma característica ácida, o que pode ter levado a seleção destes microrganismos mais resistentes a altos níveis de salinidade. A utilização de rizobactérias resistentes a este fator limitante podem levar a bioestimulação da planta, podendo induzir uma tolerância sistêmica e reduzir os danos causado pelo excesso de sais (SILVA *et al.*, 2019; LIMA *et al.*, 2022)

Com relação ao agente temperatura, todos os isolados de *leucena* apresentaram resistência ao teste com temperatura de 45°C, onde 11,5% das estirpes apresentaram o crescimento rápido (2 a 3 dias) enquanto 88,5% tiveram o crescimento muito rápido (1 dia). A tolerância dos rizóbios às condições de alta temperatura (45º) pode estar associada com a adaptação desses microrganismos ao ambiente quente das áreas estudadas (ARBI *et al.*, 2015). Foi possível observar que ao serem

expostas a um alto grau de temperatura, alguns isolados de leucena apresentaram um aumento na produção de muco de forma abundante ocupando toda a placa de petri e acidificando o meio mais rapidamente, como pode ser observado nas figuras 1 e 2. Alterações na produção de exopolissacarídeos de estirpes de *Rhizobium* já foram relatadas por Cunha *et al* (2018) e Kulkarni e Nautiyal (2000) perante circunstâncias de estresse como: temperatura, pH, concentração de oxigênio e pressão osmótica. Este comportamento pode estar relacionado à sobrevivência destes microrganismos frente a agentes ambientais, osmorregulação e situações de stress (SPAINK, 2000). Ao longo do teste não foi observado uma diferença significativa entre o crescimento dos isolados em temperatura ambiente e em temperatura extrema. Divergente deste resultado, em estudos de Ali *et al* (2009) com isolados de regiões secas de Rajasthan (Índia), relatam que houve uma redução eminente no crescimento das rizobactérias na temperatura de 45°C, onde a maioria apresentou crescimento moderado. Estudos realizados por Hashem *et al* (1998) em diferentes regiões do Egito, identificaram cepas de Leucena que obtiveram um desempenho simbiótico correlacionado com a capacidade destes microrganismos de crescer em cultura nestas temperaturas extremas. Alexandre *et al* (2012) destaca que algumas cepas possuem a capacidade de crescer em temperaturas acima de 40°C, porém sua habilidade de nodulação é perdida, pois este fator tem efeito inibitório na aderência destes microrganismos aos pelos radiculares além de afetarem a formação de fios de infecção.

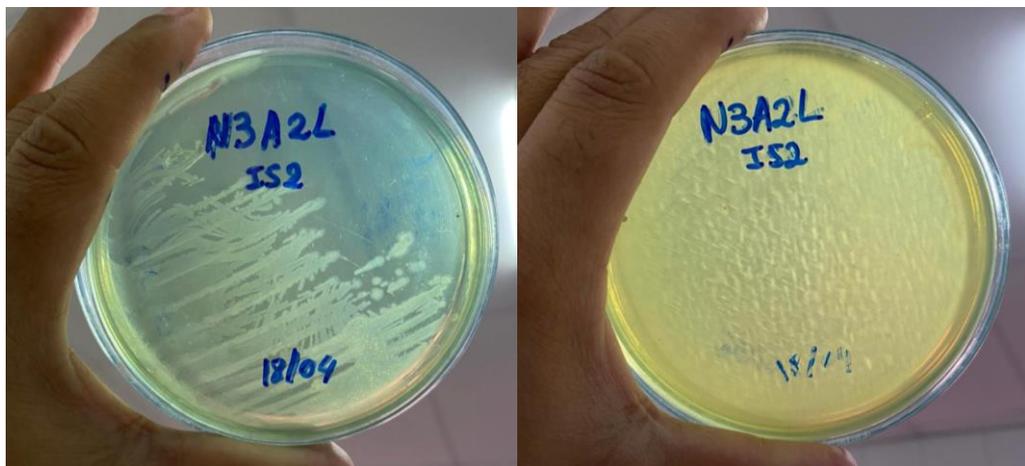


Figura 3: Estirpe N3A2LIS2 crescida na temperatura ambiente (à esquerda) e na temperatura de 45°C (à direita).

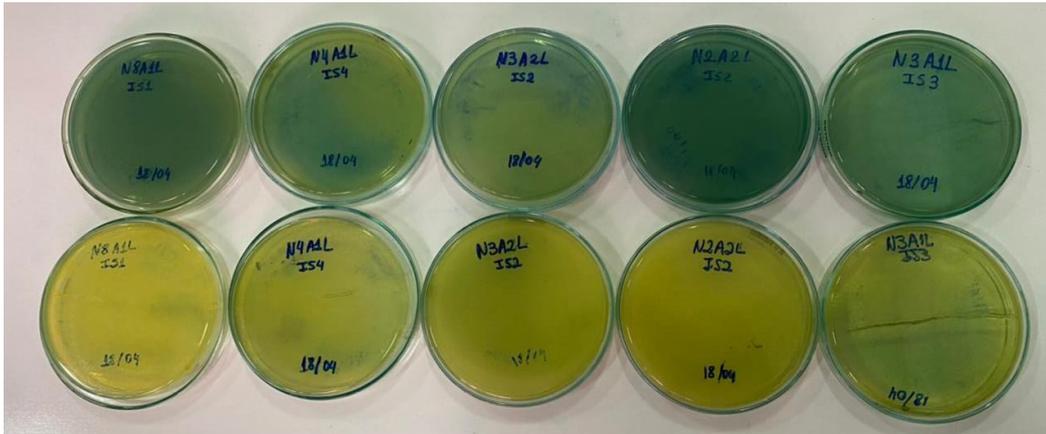


Figura 4: Diferença das estirpes inoculadas em temperatura normal (placas de cima) e inoculadas na temperatura de 45°C (placas de baixo), demonstrando a rápida acidificação do meio em 24hrs.

A respeito do teste de pH, todas as estirpes submetidas ao teste de pH cresceram nos primeiros 3 dias e tiveram comportamentos diferentes. Em relação a diferença de crescimento em ambos os meios, a maioria cresceu igualmente, somente cinco estirpes (N12A2LIS1, N1A1LIS2, N6A2LIS3, N10A1LIS1, N6A2LIS1) tiveram um desenvolvimento maior no meio ácido enquanto no meio alcalino apenas três (N1A1LIS1, N8A2LIS2 e N15A2LIS1) se desenvolveram melhor nesta condição. Em estudos de Oliveira e Magalhães (1999) com rizobactérias presentes em solos da Amazônia, e Campos *et al* (2010) em solos do Pantanal mato-grossense, evidenciaram isolados que também não tiveram um crescimento significativo em pH alcalino, mostrando que essa condição foi prejudicial aos isolados avaliados, onde menos de 9 estirpes foram favorecidos neste nível de pH. Em contrapartida, em trabalhos de Cunha (2018) os isolados submetidos ao pH 4 e 10, apresentaram resistência apenas ao pH alcalino, nenhuma apresentou colônias no pH ácido, o que pode ser explicado pela área ser um perímetro irrigado.

No que se refere a produção de muco, três estirpes (N1A2LIS1, N6A1LIS2, N8A2LIS2) produziram mais muco no pH alcalino, e sete estirpes produziram mais no pH ácido. De todos os 26 isolados, 16 foram capazes de acidificar o meio na condição alcalina. Resultados semelhantes a estes foram encontrados em estudos de Campos *et al* (2010), onde 80% dos isolados acidificaram o meio alcalino e produziram muco. Esta sobrevivência e crescimento das rizobactérias são influenciadas pelo pH do solo pois o mesmo altera a permeabilidade da membrana e absorção de nutrientes. Devido a isto, o pH neutro é o que permite uma melhor absorção de uma quantidade necessária de nutrientes, resultando então em um ótimo crescimento bacteriano (BHARGAVA *et al.*, 2016). Oliveira e Magalhães (1999) destacam que o teste de tolerância à acidez pode ser o pioneiro na seleção de estirpes recomendadas para os solos amazônicos, e as mesmas devem ser testadas em razão das diversas condições presentes em solos da Amazônia. Em relação a estirpe comercial SEMIA 6153, ela apresentou uma alta resistência a todos os fatores abióticos, tendo um crescimento muito rápido tanto nos testes de salinidade quanto no de temperatura e pH, comprovando ser tão adaptável a condições extremas quanto as estirpes nativas.



Figura 5: Estirpe N1A2LIS1 submetida ao pH 5 (imagem à esquerda) e ao pH 9 (imagem à direita).



Figura 6: Estirpe N12A2LIS1 submetida ao pH 5 (imagem à esquerda) e ao pH 9 (imagem à direita)

Ambas as áreas estudadas neste trabalho, tanto a de pastagem quando a de roça no toco, apresentam solos degradados sendo então um fator seletivo para a adaptação dos microrganismos presentes às condições extremas de temperatura, salinidade e pH presentes nestas duas áreas.

3.3 Teste de Autenticação

Para avaliar a capacidade de promoção de crescimento das estirpes nativas comparada a estirpe comercial e adubação nitrogenada, foi realizado o teste de autenticação. Neste teste não houve uma diferença significativa entre os resultados estatísticos dos tratamentos realizados com as estirpes indígenas, a estirpe comercial e com o tratamento com alto teor de nitrogênio. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos de Araújo *et al* (2010) onde evidenciaram que não existiu diferença significativa entre os tratamentos com NPK, inoculado e coinoculado (*Bradyrhizobium* e *Bacillus subtilis*), porém obtiveram valores menores no tratamento controle.

Tabela 3. Resultado dos parâmetros de desenvolvimento vegetal entre todos os tratamentos (controle, controle com alto teor de nitrogênio, inoculante comercial e estirpes indígenas) utilizados no experimento de autenticação. (APA = altura da parte aérea, DPA = diâmetro caulinar, MSPA = massa seca da parte aérea, MSR = massa seca da radícula, Efr = eficiência relativa de nitrogênio. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com $p < 0.05$.)

TRATAMENTOS	APA (cm)	DPA (cm)	MSPA (g)	MSR (g)	Efr (%)
Controle	8,4 a	0,12 a	0,05 a	0,05 ab	45,45
Controle alto teor de N	8,77 a	0,12 a	0,11 a	0,11 a	100,00
SEMIA 6153	9,23 a	0,14 a	0,08 a	0,11 ab	72,73
N1A1 IS2	9,1 a	0,12 a	0,05 a	0,04 ab	45,45
N3A1 IS3	7,6 a	0,09 a	0,04 a	0,04 a	36,36
N3A1 IS4	10,8 a	0,11 a	0,09 a	0,01 b	81,82
N4A1 IS2	8,07 a	0,11 a	0,04 a	0,05 a	36,36
N4A1 IS4	7,46 a	0,12 a	0,05 a	0,05 a	45,45
N6A1 IS2	11,16 a	0,13 a	0,06 a	0,02 a	54,55
N8A1 IS1	8,25 a	0,1 a	0,04 a	0,03 a	36,36
N10A1 IS1	9,13 a	0,13 a	0,07 a	0,08 a	63,64
N1A2 IS1	10,45 a	0,13 a	0,08 a	0,03 a	72,73
N2A2 IS2	8 a	0,12 a	0,05 a	0,05 a	45,45
N3A2 IS2	8,26 a	0,13 a	0,03 a	0,05 a	27,27
N4A2 IS4	7,23 a	0,1 a	0,03 a	0,03 a	27,27
N6A2 IS1	10,35 a	0,11 a	0,07 a	0,04 a	63,64
N6A2 IS3	10,33 a	0,19 a	0,11 a	0,05 a	100,00
N7A2 IS3	9,3 a	0,13 a	0,06 a	0,12 a	54,55
N8A2 IS2	10,47 a	0,17 a	0,12 a	0,7 a	109,09
N10A2 IS2	11,53 a	0,13 a	0,11 a	0,03 a	100,00
N11A2 IS1	9,63 a	0,13 a	0,08 a	0,02 a	72,73
N11A2 IS2	8,43 a	0,13 a	0,06 a	0,04 a	54,55
N11A2 IS3	9,05 a	0,18 a	0,07 a	0,05 a	63,64
N12A2 IS1	8,25 a	0,13 a	0,04 a	0,04 a	36,36
N13A2 IS1	9,2 a	0,14 a	0,05 a	0,06 a	45,45
N15A2 IS1	8,7 a	0,17 a	0,11 a	0,12 a	100,00
N20A2 IS1	8,96 a	0,15 a	0,09 a	0,09 a	81,82
N20A2 IS2	8,33 a	0,11 a	0,06 a	0,04 a	54,55

Apesar de não diferir estatisticamente dos demais isolados, a estirpe N8A2IS2 foi a única que se sobressaiu em comparação ao tratamento com adubação nitrogenada quanto a eficiência relativa de nitrogênio, sendo um isolado relevante para futuros testes como o sequenciamento genético, testes de produção de hormônios de crescimento vegetal, novos testes de eficiência e capacidade de nodulação. Outras estirpes como a N6A2IS3, N10A2IS2 e N15A2IS1 também não apresentaram resultados estatisticamente significativos, porém obtiveram bons resultados semelhantes ao teste com alto teor de N, podendo ser vistas também como promissoras para novos testes. Já em relação à nodulação não foram observados a formação de nódulos nos tratamentos com estirpes indígenas, assim como nos testes com a estirpe comercial. Isto pode ter acontecido

pois, após o isolamento e armazenamento das bactérias, a habilidade de nodulação das estirpes isoladas dos nódulos pode ser perdida, especialmente para as bactérias que possuem os genes da simbiose em plasmídeos (Santos *et al.*, 1996), assim como a alta temperatura no período do experimento, que causa a perda da habilidade de infecção e nodulação destes isolados. No tratamento com fertilização nitrogenada, utilizado como controle positivo no teste de autenticação, como já esperado não houve formação de nódulos.



Figura 7: Desenvolvimento vegetal em tratamento Controle (A), com alto teor de nitrogênio (B), estirpe N7A2IS3 (C), estirpe N8A2IS2 (D).

Decker (2008) ressalta que o desenvolvimento radicular da leucena é sensível a fatores abióticos como a intensidade luminosa, o que pode ter ocorrido durante o experimento e provocando o pouco desenvolvimento radicular das mudas. Resultados de Souza *et al* (2007) e Bala *et al* (2003) corroboram com essa afirmativa visto que em seus estudos a leucena apresentou menor desenvolvimento radicular e uma grande dificuldade de nodulação por estirpes de rizóbio nativos de diferentes solos. Portanto, um menor e lento crescimento radicular tem um efeito negativo na simbiose destes microrganismos, visto que afeta a colonização destes nos locais de infecção. Em nossos resultados os isolados da área 2 (pastagem) foram mais eficientes que os isolados da área 1 (roça no toco), isso pode ter sido devido a esta prática de queima afetar diretamente as propriedades do solo e os organismos vivos presentes nele (SLATTERY *et al.*, 2001), enquanto solos de pastagem dependendo da intensidade podem favorecer o crescimento das raízes e consequentemente de exsudados e influenciar na diversidade e densidade de microrganismos na área, aumentando a eficiência dos isolados (CHAVEZ *et al.*, 2011). Já a estirpe comercial apresentou uma eficiência relativa 25% menor que o tratamento controle com alto teor de nitrogênio, o que pode ter se dado em função dos fatores abióticos que interferem em sua capacidade de infecção, consequentemente sua habilidade nodulífera e expressão de hormônios de crescimento vegetal. Entretanto, a mesma se mostrou apta a tolerar estresses em meio a temperatura, salinidade e pH extremos. A técnica de cultivo é um fator considerável, visto que o mesmo afeta as

propriedades químicas do solo, influenciando assim a sobrevivência dos rizóbios, prejudicando a nodulação, e expondo-os a condições com menos carbono ativo afetando assim suas demandas energéticas (NWAGA, *et al.*, 2010).

Os resultados presentes demonstram que há uma grande diversidade de rizobactérias nativas simbiotes de *Leucena* nas áreas estudadas, realçando sobre as condições locais e a interferência do manejo do solo sobre a comunidade microbológica. Já quando consideramos os parâmetros de crescimento vegetal analisados em *Leucena* perante a inoculação dos isolados indígenas, conclui-se que não houve uma diferença significativa entre eles e os tratamentos controle, alto teor de nitrogênio e estirpe comercial. No que se refere a testes fisiológicos, os isolados apresentaram ótimos resultados, tendo um crescimento rápido perante todas as condições de estresse extremo. Embora a capacidade de crescimento *in vitro* de um isolado não é necessariamente interligada com a sua capacidade de sobrevivência ao meio nas exatas condições, testes fisiológicos correspondem a primeira fase de seleção de estirpes para região amazônica maranhense, onde futuramente poderão ser submetidas a novos testes e assim selecionadas para serem utilizadas como inoculantes específicos da região.

4 CONCLUSÕES

As amostras de solo da Amazônia maranhense apresentaram uma grande diversidade morfofisiológica de rizobactérias de *Leucena*, sendo encontradas 40 estirpes morfofisiologicamente distintas. Mais de 90% dos isolados encontrados em ambos os solos mostraram aspectos morfofisiológicos similares às bactérias do gênero *Rhizobium*. Todos os isolados foram aptos aos testes de estresse extremo quanto ao pH, salinidade e temperatura. Grande parte das estirpes nativas apresentaram eficiência relativa similar ou próxima ao tratamento controle com alto teor de nitrogênio. Estudos futuros são indicados para a identificação desses isolados por meio de sequenciamento do gene 16s rRNA, principalmente devido a plasticidade por eles apresentada durante os testes laboratoriais.

5 REFERÊNCIAS

AGUIAR, A. C. F et al. **Nutrient recycling and physical indicators of an alley cropping system in a sandy loam soil in the pre-Amazon region of Brazil.** Nutrient Cycling In Agroecosystems, [S.L.], v. 86, n. 2, p. 189-198, 8 maio 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10705-009-9283-6>.

ALEXANDRE, Ana et al. **Response to temperature stress in rhizobia.** Critical Reviews In Microbiology, [S.L.], v. 39, n. 3, p. 219-228, 23 jul. 2012. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/1040841x.2012.702097>.

Ali, S.F., Rawat, L.S., Meghvansi, M.K. and Mahna, S.K. (2009) **Selection of Stress-Tolerant Rhizobial Isolates of Wild Legumes Growing in Dry Regions of Rajasthan, India.** ARPN Journal of Agricultural and Biological Science, 4, 13-18.

ARAUJO, Ademir Sérgio Ferreira de et al. **Coinoculação rizóbio e *Bacillus subtilis* em feijão-caupi e leucena: efeito sobre a nodulação, a fixação de N₂ e o crescimento das plantas.** *Cienc. Rural*, Santa Maria, v. 40, n. 1, p. 182-185, Feb. 2010. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782009005000249>.

ARBI, S. B. et al. **Phenotypic and genotypic characterization of root nodules rhizobia of *Medicago littoralis* Rhode and *Melilotus indicus* (L.) All. Growing in the Oasis of Touggourt, Oued Righ Valley, in the Algerian Sahara.** *Symbiosis*, v. 66, p. 75–87, 2015.

BALA, A. et al. **Nodulation of tree legumes and the ecology of their native rhizobial populations in tropical soils.** *Applied Soil Ecology*, v. 22, p. 211-223, 2003.

BERRADA, H. et al. **Taxonomy of the Rhizobia: current perspectives.** *British Microbiology Research Journal*, [S.L.], v. 4, n. 6, p. 616-639, 10 jan. 2014. Sciencedomain International. <http://dx.doi.org/10.9734/bmrj/2014/5635>.

BHARGAVA, Y. et al. **Phenotypic, Stress Tolerance and Plant Growth Promoting Characteristics of Rhizobial Isolates from Selected Wild Legumes of Semiarid Region, Tirupati, India.** *Advances In Microbiology*, [S.L.], v. 06, n. 01, p. 1-12, 2016. Scientific Research Publishing, Inc.. <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2016.61001>.

BUSHBY, H.V.A. & MARSHALL, K.C. **Some factors affecting the survival of root nodule bacteria on desiccation.** *Soil Biol. Biochem.*, 9:143-147, 1977.

CAMPOS L.L., et al. **Caracterização fisiológica de rizóbios isolados de nódulos de raiz e caule de *Discolobium* spp.** *Scientia Agraria Paranaensis*. Volume 9, número 3 - 2010, p 75-84.

CHÁVEZ, Luis Fernando *et al.* **Diversidade metabólica e atividade microbiana no solo em sistema de integração lavoura-pecuária sob intensidades de pastejo.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, [S.L.], v. 46, n. 10, p. 1254-1261, out. 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-204x2011001000020>.

COELHO, K. P. 2011. **Diversidade e eficiência de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de glicirídia, leucena e sombreiro no Maranhão.** Dissertação (Mestrado em Agroecologia) - Universidade Estadual do Maranhão. 68p.

CUNHA, Mayara et al. **CARACTERIZAÇÃO CULTURAL E TOLERÂNCIA A pH EXTREMOS DE RIZÓBIOS ORIUNDOS DA REGIÃO DE BAIXO ACARAÚ NO CEARÁ.** *Enciclopédia Biosfera*, [S.L.], v. 15, n. 28, p. 977-985, 3 dez. 2018. Centro Científico Conhecer. http://dx.doi.org/10.18677/encibio_2018b79.

DECKER, Vanessa. **AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE LUMINOSA NA GERMINAÇÃO E NO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE LEUCENA (*Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit.).** 2008. 63

f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Agronomia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon - Pr, 2008.

DENNIS, E. et al. **Soil Properties Dynamics Induced by Passage of Fire During Agricultural Burning**. International Journal Of Plant & Soil Science, [S.L.], v. 2, n. 1, p. 111-126, 10 jan. 2013. Sciedomain International. <http://dx.doi.org/10.9734/ijpss/2013/3121>.

ESPÍNDOLA, J. A. A. et al. **Adubação verde com leguminosas**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 52p.

FERNANDES JÚNIOR, P. I. et al. **Algumas limitações à fixação biológica de nitrogênio em leguminosas** / Veronica Massena Reis. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. 33 p. (Documentos / Embrapa Agrobiologia, ISSN 1517-8498; 252).

GALILI, T. 2015. **Dendextend: an R package for visualizing, adjusting, and comparing trees of hierarchical clustering**. Bioinformatics. 31(22): 3718-3720.

GUALTER, R. M. R. et al **Eficiência agrônômica de estirpes de rizóbio em feijão-caupi cultivado na região da Pré-Amazônia maranhense**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 46, n. 3, p. 303-308, 2011.

HASHEM, F. M. et al. **Identification and characterization of salt- and thermo-tolerant Leucaena-nodulating Rhizobium strains**. Biology And Fertility Of Soils, [S.L.], v. 27, n. 4, p. 335-341, 18 set. 1998. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s003740050440>.

HUNGRIA, M, SILVA, K. 2011. **Manual de Curadores de Germoplasma – Microrganismos: Rizóbios e Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal**. pp: 21. Brasília. DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

HURLEY, C. 2019. **Gclus: Clustering Graphics. R package version 1.3.2**. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.

KRUSKAL, W. H.; WALLIS, W. A. 1952. **Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis**. Journal of the American Statistical Association, 47(260): 583-621.

KULKAMI, S.; NAUTIYAL, C. S. **Effects of salt and pH stress on temperature-tolerant Rhizobium sp. NBRI330 Nodulating Prosopis juliflora**. Currency Microbiology., New York, v.40, n.4, p.221–226, 2000.

LIMA, ANDRÉA APARECIDA et al. **Diversity and symbiotic capacity of bacteria isolated from nodules of two velvet bean species**. Revista Brasileira de Ciência do Solo, v. 36, p. 337-348, 2012.

NOGALES, Joaquina et al. **Rhizobium tropici Genes Involved in Free-Living Salt Tolerance are Required for the Establishment of Efficient Nitrogen-Fixing Symbiosis with Phaseolus vulgaris**. Molecular Plant-Microbe Interactions®, [S.L.], v. 15, n. 3, p. 225-232, mar. 2002. Scientific

Societies. <http://dx.doi.org/10.1094/mpmi.2002.15.3.225>. MENDIBURU, F. 2021. agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R package version 1.3-5. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.

NWAGA, Dieudonné et al. **The Potential of Soil Beneficial Micro-Organisms for Slash-and-Burn Agriculture in the Humid Forest Zone of Sub-Saharan Africa.** Soil Biology, [S.L.], p. 81-107, 2010. Springer Berlin Heidelberg. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-05076-3_5.

OLIVEIRA, L. A.; MAGALHÃES, H. P. **Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria.** Revista de Microbiologia, São Paulo, v.30, n.10, p.203-208, 1999.

RAMOS, D. B. P. et al. **Seleção de estirpes de rizóbios para formação de mudas de leucena (Leucaena leucocephala (Lam) De Wit.) em Argissolo Vermelho Amarelo.** Revista Brasileira de Agroecologia, v. 8, n. 1, 2013.

SANTOS, A. Garcia De Los et al. **Rhizobium plasmids in bacteria-legume interactions.** World Journal Of Microbiology & Biotechnology, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 119-125, mar. 1996. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00364676>.

SILVA, ANTONIO FABIO et al. **Eficiência fisiológica e desempenho do amendoim sob estresse salino e inoculado com Bradyrhizobium.** Water Resources and Irrigation Management-WRIM, v. 11, n. 1-3, p. 22-35, 2022.

SILVA, Emmanuella Vila Nova da et al. **Rizóbios e fungo micorrízico arbuscular inoculados em leucena com aplicação de biofertilizantes PK, mais enxofre e Acidithiobacillus.** Pesquisa Agropecuária Pernambucana, [S.L.], v. 17, n. 1, p. 66-72, dez. 2012. Instituto Agronomico de Pernambuco. <http://dx.doi.org/10.4322/pap.2012.012>.

SILVA, Vinicius Santos Gomes da et al. **Symbiotic efficiency of native rhizobia in legume tree Leucaena leucocephala derived from several soil classes of Brazilian Northeast region.** Australian Journal Of Crop Science, [S.L.], v. 12, n. 03, p. 478-485, 20 mar. 2018. Southern Cross Publishing. <http://dx.doi.org/10.21475/ajcs.18.12.03.pne976>.

SILVA, L. V.; Oliveira, S. B. R.; Azevedo, L. A.; Rodrigues, A. C.; Bonifacio, A. **Coinoculation with Bradyrhizobium and Trichoderma alleviates the effects of salt stress in cowpea.** Revista Caatinga, v. 32, n. 2, p. 336-344, 2019. <https://doi.org/10.1590/1983-21252019v32n206rc>

SLATTERY, J. F. et al. **Rhizobial ecology as affected by the soil environment.** Australian Journal Of Experimental Agriculture, [S.L.], v. 41, n. 3, p. 289, 2001. CSIRO Publishing. <http://dx.doi.org/10.1071/ea99159>.

SOUZA, L. A. G. et al. **Desenvolvimento e nodulação natural de leguminosas arbóreas em solos de Pernambuco.** Pesq. agropec. bras., Brasília, v. 42, n. 2, p. 207-217, Feb. 2007.

SPAINK, H. P. **Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria.** Review of Microbiology., Leiden, v.54, n.9, p.257-288, 2000.

THRALL, Peter H. et al. **Rhizobial mediation of Acacia adaptation to soil salinity: evidence of underlying trade-offs and tests of expected patterns.** Journal Of Ecology, [S.L.], v. 96, n. 4, p. 746-755, jul. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2745.2008.01381.x>.

VALE, F.R.; et al. **Crescimento radicular de espécies florestais em solo ácido.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.31, p.609-616, 1996

VIEIRA JÚNIOR, J. R. et al. **Rizobactérias como agentes de controle biológico e promotores de crescimento de plantas.** Embrapa Rondônia, Porto Velho, 2013. 15 p. – (Documentos / Embrapa Rondônia, ISSN 0103-9865; 155).

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

ZILLI, J.E. et al. **Contribuição de estirpes de rizóbio para o desenvolvimento e produtividade de grãos de feijão-caupi em Roraima.** Acta Amazonica, v.39, p.749-758, 2009

Diretrizes para Autores

Revista de estudos ambientais

Normas para apresentação de contribuições

- 1 Os textos devem estar escritos em português ou inglês devidamente revisados.
- 2 Os arquivos para submissão deverão estar em formato Microsoft Word ou RTF possuindo no mínimo dez (10) e no máximo vinte (20) páginas, com as linhas numeradas.
- 3 O artigo deverá iniciar com o título do trabalho em português e inglês apresentando em seguida um resumo (em português) e um abstract (em inglês), sendo que cada um se constituirá em um único parágrafo com até 200 palavras; no final do resumo deverão constar palavras-chaves, no final do abstract deverão constar keywords. Na sequência do artigo seguirão as seções: introdução, metodologia, resultados, conclusões, referências e agradecimentos (facultativo). Este documento NÃO DEVE CONTER OS NOMES DOS AUTORES que deverão constar somente na folha de rosto conforme item 10.
- 4 Os textos devem vir sem notas de rodapé; caso sejam necessárias notas, transformá-las em notas de fim.
- 5 A fonte a ser utilizada é a arial, tamanho 10, exceto para as tabelas e ilustrações (figuras, quadros, fotos, organogramas, fluxogramas etc.) cuja fonte deve ser menor, solicitando-se o tamanho 9.
- 6 Os títulos de seções e subseções deverão ser numerados e destacados em negrito; o espaçamento entre linhas deve ser simples.
- 7 As ilustrações e tabelas devem ser numeradas, e os títulos escritos sem abreviações, em negrito, tendo-se uma numeração sequencial para as tabelas e outra para cada classe de ilustrações (Figuras, quadros, etc.), sendo que de forma geral utilizam-se três denominações, tabela, figura e quadro. Elas devem ter sua inserção sugerida no texto, e não em seu final, considerando-se que esta sugestão é passível de alteração quando da editoração final do texto. Todas as ilustrações devem conter referência à fonte e o título deve estar localizado na parte superior das mesmas. Sugere-se que as figuras e tabelas sejam elaboradas em preto e branco, sendo que quando for necessário o uso de legenda, esta seja feita com diferentes tipos de preenchimento e, não em nível de cinza.
- 8 A configuração da página deve ser adotada como formato A4, ou seja, de 21 cm de largura e 29,7 cm de altura, com orientação retrato, e as margens superior e esquerda de 3,5 cm, direita e inferior de 2 cm, podendo haver ajustes na editoração se necessário e com uma só coluna de texto.

9 As citações no corpo do texto devem obedecer a NBR 10520/2002. As referências deverão ser apresentadas ao final do artigo, obedecendo às normas da NBR 6023/2018 e, em fonte Arial 9. Usar negrito como recurso tipográfico para os destaques.

10 A folha de rosto deverá conter o título do trabalho em português e inglês, o(s) nome(s) do(s) autor(es) – com correspondente titulação, local de trabalho/instituição a que pertence, função atualmente exercida e e-mail. Ela será um arquivo independente que deverá ser postado como documento suplementar no momento da submissão.

11 No final da folha de rosto deverá ser indicado o nome e e-mail de três potenciais avaliadores com formação e produtividade científica na área do artigo, sem qualquer tipo de conflito de interesse com os autores. Considera-se conflito de interesse quando o avaliador que se pretende indicar for da mesma instituição, ou já tiver desenvolvido trabalho em conjunto com os autores, ou tenha orientado algum dos autores ou tenha alguma outra forma de vínculo com algum dos autores.

12 A entrada de textos é em fluxo contínuo.

13 Os direitos são reservados. É permitida a reprodução de trechos de artigos sem autorização prévia desde que com menção da fonte.

14 *Os autores são responsáveis pela exatidão das referências e pelas ideias expressas em seus textos.*