

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)**

JESSICA HAINOSZ

**CARACTERIZAÇÃO DE RIZÓBIOS NATIVOS DOS CAMPOS GERAIS QUANTO À
ATIVIDADES PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL E TOLERÂNCIA A
ESTRESSES ABIÓTICOS**

**PONTA GROSSA
2020**

JESSICA HAINOSZ

**CARACTERIZAÇÃO DE RIZÓBIOS NATIVOS DOS CAMPOS GERAIS QUANTO À
ATIVIDADES PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL E TOLERÂNCIA A
ESTRESSES ABIÓTICOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva).

Orientadora: Prof.^a Dr^a Jesiane S. S. Batista

PONTA GROSSA

2020

H153 Hainosz, Jessica
Caracterização de rizóbios nativos dos Campos Gerais quanto à atividades promotoras do crescimento vegetal e tolerância a estresses abióticos / Jessica Hainosz. Ponta Grossa, 2020.
74 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Área de Concentração: Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Profa. Dra. Jesiane S da Silva Batista.

1. Paraburkholderia. 2. Bradyrhizobium. 3. Rhizobium. 4. Bactérias promotoras do crescimento de plantas. I. Batista, Jesiane S da Silva. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Biologia Evolutiva. III.T.

CDD: 574.87



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva
*Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa
(Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a
Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências
Biológicas)*



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. XX/2020

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata **Jessica Hainosz**.

Aos onze dias do mês de dezembro de dois mil e vinte, via Google Meet, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência do Profa. Dra Jesiane Stefania da Silva Batista em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação da aluna **Jéssica Hainosz**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Área de concentração em Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Profa. Dra Jesiane Stefania da Silva Batista (PPG-BioEvol/UEPG), Dr Leandro Datola Tullio (Stoller do Brasil) e Prof. Dr. Rafael Mazer Etto (PPG-BioEvol/UEPG). Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao candidato das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir o candidato passou a defesa de sua dissertação intitulada: **“Caracterização de rizóbios nativos dos Campos Gerais quanto à atividades promotoras do crescimento vegetal e tolerância a estresses abióticos”**. Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o candidato **APROVADO**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, **com validade de sessenta dias**; assim como comprovante de envio de um artigo científico proveniente de seu trabalho de dissertação a revista com Qualis igual ou superior a B1 (Biodiversidade – Capes) **até o prazo máximo de 90 dias após a defesa**; o não depósito da versão definitiva da Dissertação, bem como as cópias em CD (PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo orientador, assim como o comprovante de envio do artigo nestes prazos, anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim () não (X)

Novo título: _____

Ponta Grossa, dezesseis de dezembro de dois mil e vinte.

Profa. Dra Jesiane Stefania da Silva Batista (PPG-BioEvol/UEPG) _____

Dr Leandro Datola Tullio (Stoller do Brasil) _____

Prof. Dr. Rafael Mazer Etto (PPG-BioEvol/UEPG) _____

AGRADECIMENTOS

Acredito que na vida ninguém conquista nada sozinho, e se eu cheguei até aqui foi porque tive a companhia e ajuda de pessoas maravilhosas ao meu lado. Então primeiramente agradeço ao meu pai Dario e minha mãe Laura que estão sempre ao meu lado me apoiando e me incentivando nas minhas escolhas, por confiarem em mim, compreenderem minha ausência em vários churrascos de domingo, reuniões de família e datas especiais, sem dúvida alguma vocês são meus maiores incentivadores e foram meus primeiros orientadores me fazendo entender que o futuro é feito a partir da constante dedicação no presente. Ao meu irmão Dener, que foi também meu companheiro na aventura morar longe da casa dos pais obrigada, tivemos nossas diferenças, mas no final foi bom ter um rosto conhecido e amigo por perto. Sou grata a vida por me permitir ter uma família como vocês, obrigada vocês têm todo o meu amor e carinho!

A minha querida orientadora Dra. Jesiane S. S. Batista por ter me acolhido de uma forma tão linda na ciência, por todos os ensinamentos transmitidos, por me abrir portas, pela confiança em dividir seus conhecimentos, por ser mais que uma orientadora, por ser amiga e criar um ambiente de trabalho tão harmonioso. Sem dúvidas foi uma honra para mim ser sua orientada, você é um exemplo a ser seguido.

Aos meus companheiros de laboratório, em especial a Érica, minha “irmã” de laboratório, por ser o meu braço direito em vários momentos ao longo desse trabalho, por ter se tornado uma grande amiga que sempre levarei no meu coração e também a Mari e a Ana Paola, por me auxiliarem nos meus primeiros passos no laboratório, meus mais sinceros agradecimentos.

A todas as pessoas que eu conheci durante esses dois anos de mestrado, em especial a minha colega de turma e amiga Ana Flávia, por ter me proporcionado vários momentos de descontração, dividir seus amigos e rolês comigo, sou muito grata por ter te conhecido, pequena no tamanho mais com um coração gigante!

A todos os meus amigos de longa data por entenderem minha ausência em vários momentos, por todo apoio, amor e amizade. Um obrigada especial para minha amiga e irmã de alma Anniê, por todos esses anos de amizade, por ser essa pessoa

extraordinária, você é luz em minha vida, obrigada por mesmo distante se fazer presente, amo você!

Ao meu namorado Alan, que esteve ao meu lado sendo meu pontinho de paz e tranquilidade, por todo incentivo e ajuda em vários momentos, tanto pessoais como acadêmicos em especial na parte estatística desse trabalho, por ser esse ser incrível que chegou pra somar em minha vida, você é a minha pessoa.

Ao PPG em Biologia Evolutiva, pela oportunidade de cursar o mestrado, por todos os conhecimentos transmitidos pelo corpo docente e também a nossa querida secretária Zoli, por todo carinho e ajuda.

A todos do laboratório LAGEM da Universidade estadual de Londrina-UEL em especial professora Dr^a Elisete, por me receberem de braços abertos, por todo apoio e ajuda durante uma etapa desse trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente fizeram parte desse trabalho, o meu muito obrigado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Os rizóbios possuem diferentes mecanismos de promoção do crescimento de plantas, importantes para o desenvolvimento vegetal e sustentabilidade dos ecossistemas. No entanto, fatores abióticos como pH, temperatura e presença de xenobióticos podem afetar o seu desempenho simbiótico de forma variável, de acordo com a espécie/estirpe. Levantamentos prévios apontam que as leguminosas nativas dos Campos Gerais do Paraná são noduladas por espécies/estirpes de rizóbios filogeneticamente variados, inclusive com a ocorrência de novas espécies. O objetivo deste estudo foi caracterizar trinta e seis estirpes de rizóbios isolados de nódulos radiculares de espécimes nativas de *Mimosa* spp. e *Desmodium* spp. quanto às suas atividades promotoras do crescimento de plantas e tolerância a estresses abióticos. O crescimento das estirpes foi significativamente afetado pelas temperaturas 37°C e 40°C, pelas concentrações de 1%, 2% e 3% NaCl e pelo pH 3,0; já em pH 4,5 e 6,0, não houve diferença significativa quando comparado com o controle. Pode-se relacionar tal resultado às condições químicas do solo de origem das plantas hospedeiras. Quanto à tolerância a metais pesados, nenhuma das estirpes apresentou resistência ao Cu nas três concentrações testadas enquanto todas foram capazes de crescer nas concentrações avaliadas de Zn. Quanto ao Al, 88% das estirpes apresentaram resistência à mais alta concentração testada (2mM). Nenhuma das estirpes apresentou atividade antagônica contra os fitopatógenos testados. Para a atividade de solubilização de fosfato 69,44% das estirpes tiveram resultados positivos, com índices de solubilização variando entre 0,13 a 1,22. Cinco das estirpes testadas produziram quantidades distintas de compostos indólicos, das quais quatro foram isoladas de *D. barbatum*. Nossos resultados indicam que fatores abióticos interferem de modo significativo e de forma diferencial no desenvolvimento dos rizóbios, demonstrando a importância da caracterização fisiológica na seleção de microrganismos.

Palavras-chave: *Paraburkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, bactérias promotoras do crescimento de plantas.

ABSTRACT

Rhizobia has different mechanisms for promoting plant growth, which are important for plant development and the sustainability of ecosystems. However, abiotic factors (*i.g.*, pH, temperature, and the presence of xenobiotics) can affect symbiotic performance, according to the species/strain analyzed. Previous researches highlighting the occurrence of new species of rhizobia of Campos Gerais region in the Paraná state indicated that the legumes native to this ecosystem are nodulated by phylogenetically diverse species/strains of rhizobia. Therefore, this study aimed to characterize thirty-six rhizobia strains isolated from root nodules of native specimens of *Mimosa spp.* and *Desmodium spp.* concerning plant growth-promoting activities and responses to abiotic stresses. Strains growth was significantly affected by temperatures of 37°C and 40°C, concentrations of NaCl (1%, 2%, and 3%), and at pH 3.0. While, at pH 4.5 and 6.0 when compared to the control, we did not find significant differences. Such result may be related to the chemical soil conditions of origin of the host plants. Regarding tolerance to heavy metals, although neither of the strains had a positive response to Cu, all the same strains were able to grow at the evaluated concentrations of Zn. Concerning Al, even the highest concentrations tested (*i.e.*, 2mM), 88% of the strains analyzed indicate resistance to these conditions. Neither strain reveal antagonistic activity against phytopathogens tested. Concerning phosphate solubilization activity, about 69.44% of the strains expressed positive results, with solubilization rates ranging from 0.13 to 1.22. Five of the strains produced different quantities of indolic compounds, of which four were isolated to *D. barbatum*. Our results indicate that abiotic factors significantly and differentially interfered in the growth of rhizobia, and emphasize the importance of physiological characterization in the selection of microorganisms.

Keywords: *Paraburkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, plant growth-promoting bacteria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Localização dos pontos de amostragem de plantas leguminosas nodulíferas nativas dos Campos Gerais.....	27
Figura 2: Curva de calibração com concentrações crescentes de AIA sintético (Sigma) de 0 a 100 µg/mL.....	32
Figura 3: Curva de calibração com concentrações de 0 a 50 g/mL de BSA.....	33
Figura 4: Diagrama de caixa ilustrando as diferenças entre as taxas de crescimento das estirpes de rizóbios em diferentes condições de salinidade (NaCl), pH e temperaturas, comparadas ao controle (NaCl 0,01%, pH 7,0, 28°C)	42
Figura 5: Análise de agrupamentos baseada nos dados de crescimento das estirpes de rizóbios em diferentes faixas de pH, salinidade e temperatura.....	44
Figura 6: Porcentagem de estirpes resistentes as concentrações de Al (0,1; 0,5 e 2,0 mM) e Zn (0,5; 2,0 e 5,0 mM) e aos herbicidas Gramoxone (0,185 mM) e Primóleo (0,147 mM)	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estirpes de rizóbios isoladas de leguminosas nativas dos Campos Gerais do Paraná, avaliadas quanto à tolerância a estresses abióticos e atividades promotoras do crescimento de plantas.....	28
Tabela 2: Crescimento das estirpes (D.O. _{600nm}) em meio líquido YM em diferentes condições de estresse abiótico.....	45
Tabela 3: Crescimento das estirpes em meio YM com a presença de AL, Zn (em três concentrações), dos herbicidas Gramoxone e Primóleo e avaliação da capacidade de solubilização de fosfato de cálcio em meio de cultivo sólido descrita pelo índice de solubilização (IS).....	48
Tabela 4: Avaliação quantitativa de rizóbios quanto à produção <i>in vitro</i> de compostos indólicos.....	50

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 INTERAÇÕES PLANTA-MICRORGANISMOS	12
2.2 RIZÓBIOS COMO BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS (BPCP)	13
2.3 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO	14
2.4 PRODUÇÃO DE FITORMÔNIOS	15
2.5 SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS	16
2.6 ATIVIDADE ANTAGÔNICA CONTRA FITOPATÓGENOS	17
2.7 RIZÓBIOS E A TOLERÂNCIA A ESTRESSES ABIÓTICOS	18
2.7.1 PH	18
2.7.2 Salinidade	19
2.7.3 Temperatura	20
2.7.4 Metais Pesados	21
2.8 JUSTIFICATIVA	22
3 OBJETIVO	24
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO E CONDIÇÕES DE CULTIVO	25
4.2 TOLERÂNCIA A ESTRESSES ABIÓTICOS	29
4.2.1 Temperatura, Salinidade e PH	29
4.2.2 Tolerância a Metais Pesados	29
4.2.3 Tolerância a Xenobióticos	30
4.3 ATIVIDADES PROMOTORAS DO CRESCIMENTO	30
4.3.1 Solubilização de Fosfato	30
4.3.2 Produção Ácido Indol-Acético (AIA)	30
4.3.3 Determinação de Proteínas Totais	31
4.3.4 Atividade Antagônica Contra Fito-Patógenos	32
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
4.4.1 Análise de Variância	33
4.4.2 Agrupamento e Similaridade	33

5 CARACTERIZAÇÃO DE RIZÓBIOS NATIVOS DOS CAMPOS GERAIS QUANTO À ATIVIDADES PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL E TOLERÂNCIA A ESTRESSES ABIÓTICOS	35
5.1 INTRODUÇÃO	35
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	37
5.2.1 Material Biológico e Condições de Cultivo	37
5.2.2 Tolerância a Temperatura, Salinidade e PH.....	37
5.2.3 Tolerância a Metais Pesados	38
5.2.4 Tolerância a Xenobióticos	38
5.2.5 Atividades Promotoras do Crescimento	39
5.2.5.1 Solubilização de fosfato.....	39
5.2.5.2 Produção ácido indol-acetico (AIA)	39
5.2.5.3 Atividade antagônica contra fito-patógenos.....	40
5.2.6 Análise Estatística	40
5.2.6.1 Análise de variância	40
5.2.6.2 Agrupamento e similaridade	40
5.3 RESULTADOS	41
5.3.1 Dinâmica do Crescimento de Rizóbios em Diferentes Faixas de Temperaturas, PH e Salinidade	41
5.3.2 Tolerância a Metais Pesados	49
5.3.3 Tolerância a Xenobióticos	49
5.3.4 Atividades Promotoras do Crescimento	53
5.3.4.1 Solubilização de fosfato.....	53
5.3.4.2 Produção ácido indol-acetico (AIA)	53
5.4 DISCUSSÃO	54
6 CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS.....	60
APÊNDICE A - MATERIAL SUPLEMENTAR	71

1 INTRODUÇÃO

Apesar da disponibilidade abundante de nitrogênio (N) na atmosfera em sua forma molecular (N_2), este não pode ser assimilado por grande parte dos organismos. Para tais organismos, o N deve ser disponibilizado em formas passíveis de assimilação, como nitrato, amônia e N orgânico (TATE, 1995).

Determinadas espécies vegetais estabelecem uma associação com procariotos aptos a realizar a conversão enzimática do N_2 em amônia, em um processo chamado fixação biológica de nitrogênio (FBN) (DIXON; KAHN, 2004). Esse processo é realizado apenas por bactérias e arqueias, filogeneticamente diversas, denominadas coletivamente de diazotróficas (HAAG et al., 2012; REED et al., 2011). Dentre os diazotróficos, os rizóbios possuem a singular capacidade de estabelecer simbiose comumente com plantas da família Fabaceae (Leguminosae) levando à formação nódulos, órgãos radiculares especializados no processo de FBN (OLDROYD, 2013).

Cabe salientar que os benefícios da interação entre bactérias diazotróficas e plantas hospedeiras vai além da FBN. A promoção do crescimento de plantas via produção de hormônios vegetais, proteção contra fitopatógenos, degradação de compostos xenobióticos, dentre outros processos, já foram identificados em algumas espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio (AHEMAD; KHAN, 2011).

Apesar de grande parte dos grupos de pesquisa em rizobiologia focar seus estudos no processo de FBN, que é um dos processos biológicos de maior impacto na biosfera, os rizóbios possuem uma notável versatilidade metabólica, tendo implicações ecológicas ainda mais abrangentes nos ecossistemas. É nesse contexto que o presente trabalho visou caracterizar a capacidade de tolerância a condições ambientais adversas e atividades promotoras do crescimento vegetal de rizóbios isolados de nódulos de plantas nativas da região dos Campos Gerais do Paraná.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. INTERAÇÕES PLANTA-MICRORGANISMOS

Diferentes mecanismos envolvidos no desenvolvimento, crescimento, adaptação e diversificação de plantas são, de fato, derivados de sua capacidade de abrigar e estabelecer diferentes interações com microrganismos (PEIXOTO NETO et al., 2004). Plantas formam uma entidade ecológica com seu microbioma, um holobionte, e dependem de sua comunidade microbiana para funções e habilidades específicas (MENDES et al., 2013; HASSANI et al., 2018).

Essas interações podem ocorrer na filosfera (que está relacionada com as partes aéreas das plantas), na endosfera (especialmente via sistema de transporte) e na rizosfera (qualquer volume de solo especialmente influenciado ou em associação com as raízes), que é a região do solo com maior riqueza microbiana. Alguns estudos estimaram haver de 10^3 a 10^6 espécies de bactérias por grama de solo (GANS, et al., 2005; SCHLOSS et al., 2006).

Os microrganismos associados a espécies vegetais podem ser comensais, com nenhuma função reconhecida ao hospedeiro, podem desencadear efeitos positivos (mutualistas) ou negativos (antagonistas), para uma dada espécie vegetal e condição ambiental (HARDOIM et al., 2015). Quanto aos mutualistas, suas atividades benéficas influenciam direta ou indiretamente a composição e produtividade de comunidades vegetais, mesmo em condições ambientais adversas aos hospedeiros (WAGG et al., 2011; MENDES, 2013). Consequentemente, tais microrganismos são componentes indispensáveis à sustentabilidade dos ecossistemas terrestres.

Um dos mais estudados exemplos são os rizóbios, bacilos gram-negativos pertencentes a vários gêneros de Alfa e Betaproteobactérias. Possuem em comum a habilidade de estabelecer simbiose com plantas, majoritariamente da família Fabaceae (=Leguminosae) levando à formação de nódulos, órgãos radiculares especializados no processo de FBN (OLDROYD, 2013). Em ausência da planta hospedeira específica ou em condições ambientais desfavoráveis à simbiose, os rizóbios podem viver saprofiticamente no solo, onde as condições não são compatíveis à sua atividade em fixar nitrogênio (HAAG et al., 2012).

2.2. RIZÓBIOS COMO BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO DE PLANTAS (BPCP)

BPCP são bactérias que colonizam determinada espécie de planta hospedeira e são capazes de aumentar a produtividade das mesmas por meio de diversas atividades, como aumento da aquisição de nutrientes, modulação hormonal, inibição do crescimento de patógenos, aumento da tolerância a estresses abióticos, dentre outros (ROBBS, 1991; JI et al., 2019).

O termo BPCP envolve diversos gêneros de diferentes habitats e origem que representam grande diversidade funcional, ecológica e fisiológica (CHAUHAN et al., 2015) e pode ser definido como a parte indispensável da biota da rizosfera e do solo, que quando associada no cultivo de plantas hospedeiras podem estimular o crescimento do hospedeiro.

Em geral, as BPCP atuam em três aspectos do crescimento vegetal: (1) sintetizando compostos que modulam o desenvolvimento da planta hospedeira, como fitormônios (auxinas, citocininas e giberelinas), compostos indólicos e enzimas moduladoras (aminociclopropano-1-carboxilato/ACC desaminase); (2) facilitando a aquisição de nutrientes e solubilização de minerais (especialmente nitrogênio e fósforo); (3) prevenindo ou reduzindo a incidência de fitopatógenos (pela produção de enzimas, sideróforos e cianeto) (RAAIJMAKERS et al., 2009; HAYAT et al., 2010). Mais recentemente, BPCP tolerantes a condições ambientais adversas vêm sendo estudadas como alternativa para amenizar os efeitos de estresses abióticos em culturas agrícolas (GROVER et al., 2010; GOPALAKRISHNAN et al., 2015) e como agentes de biorremediação de solos contaminados (MYRESIOTIS et al., 2011).

As BPCP são consideradas essenciais devido à sua alta adaptabilidade em uma grande variedade de ambientes, versatilidade bioquímica para metabolizar compostos naturais e xenobióticos e também influenciam indiretamente na morfologia geral das plantas (BHATTACHARYYA; JHA, 2012), sendo consideradas como um componente significativo no manejo de práticas agrícolas por representar um grande potencial genético natural (COOK, 2002).

O conceito de BPCP foi confinado às estirpes bacterianas que podem cumprir pelo menos dois dos três critérios: colonização eficiente, estimulação do crescimento das plantas e biocontrole (WELLER et al., 2002; VESSEY, 2003).

Vários gêneros de bactérias já foram descritos como BPCPs, entre eles encontram-se: *Pseudomonas*, *Burkholderia/Paraburkholderia*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* e *Azospirillum* (GLICK, 1995; DOBBELAERE et al., 2003; LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009).

De acordo com o tipo de associação com as células da raiz das plantas, as rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) podem ser classificadas em: (1) Rizobactérias promotoras do crescimento extracelular, associadas à rizosfera, rizoplane e espaços intercelulares dos tecidos vegetais; e (2) Rizobactérias promotoras do crescimento intracelular, que podem colonizar células corticais dos nódulos radiculares, como os rizóbios (MARTINEZ-VIVEROS et al., 2010).

2.3. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO

O nitrogênio é um dos elementos mais abundantes da biosfera, constituindo quase 80% dos gases atmosféricos, mas nenhum animal ou planta é capaz de utilizá-lo, pois este se encontra em sua forma molecular (N_2) (ARAUJO, 2006).

As principais formas de disponibilização de nitrogênio às plantas são: 1) o solo, através da decomposição da matéria orgânica; 2) os fertilizantes nitrogenados, representando a forma de assimilação mais fácil, porém há um alto custo econômico e ambiental; 3) a fixação não-biológica, resultante de processos naturais, principalmente de descargas elétricas, combustão e vulcanismo; 4) a fixação biológica de nitrogênio (FBN), que é a principal via de incorporação (HUNGRIA et al., 2001). A FBN é um processo realizado por um grupo especializado de procariotos, denominados diazotróficos, e consiste na redução enzimática do N_2 a amônia, posteriormente incorporada em compostos nitrogenados (DIXON; KAHN, 2004).

Os organismos diazotróficos estabelecem diferentes tipos de associações com plantas hospedeiras, sendo classificados como de vida livre, associativos ou simbióticos. A associação do tipo simbiótica é a que fornece o maior aporte de N para o hospedeiro, possuindo uma grande importância ecológica em diversos

ecossistemas (HAAG et al., 2012; REED et al., 2011). Os diazotróficos simbióticos, coletivamente denominados de rizóbios, estabelecem uma relação específica com o hospedeiro e levam à formação de novos órgãos, usualmente nas raízes, denominados nódulos. No interior desses órgãos, mediante processo de infecção, formas diferenciadas de rizóbios fixam N_2 utilizando energia dos fotossintatos fornecidos pela planta hospedeira e disponibilizam a amônia produzida aos tecidos vegetais (SCHULTZE; KONDOROSI, 1998).

Assim, o processo de FBN beneficia a planta hospedeira pelo aporte de N pelos rizóbios, que em contrapartida são beneficiados com fontes de energia e carbono pela planta. A simbiose rizóbio-planta hospedeira equivale a uma fertilização interna e natural (BROUGHTON et al., 2003).

A FBN é muito importante nas condições habituais do Brasil, onde os solos são, em geral, pobres em N. No caso dos agroecossistemas, a produção de fertilizantes nitrogenados envolve um consumo elevado de derivados de petróleo, portanto, com oscilações constantes de preço. Nesse contexto, particularmente nas últimas décadas, vem sendo dada cada vez maior a importância dos processos biológicos envolvendo microrganismos do solo capazes de aportarem nutrientes, permitirem o melhor aproveitamento de fontes nutricionais, entre outros processos, enriquecendo o solo e diminuindo as perdas de nutrientes, por lixiviação ou na forma de gases (HUNGRIA; CAMPO, 2007). Diferentes estresses ambientais podem afetar negativamente a FBN como salinidade, estresse hídrico, pH do solo, temperatura e presença de metais pesados (PATIL et al., 2014).

2.4. PRODUÇÃO DE FITORMÔNIOS

Alguns fitormônios como auxinas, citocininas, giberelinas, etileno e ácido abicísico, que são produzidos por BPCP, auxiliam no crescimento e desenvolvimento vegetativo (RAVEN et al., 2001). Uma vasta quantidade de bactérias associadas demonstra essa capacidade de produzir principalmente, auxinas, como ácido indol-acético (AIA) (JHA et al., 2013), este controla uma ampla variedade de processos no desenvolvimento e crescimento das plantas, as baixas concentrações de AIA podem estimular o alongamento da raiz primária, enquanto que altos níveis de AIA estimulam

a formação de raízes laterais, diminuem o comprimento da raiz primária e aumentam a formação de pelos radiculares (DOBBELAERE et al., 1999; PATTEN; GLICK, 2002; PERRIG et al., 2007; SPAEPEN et al., 2007; REMANS et al., 2008). Também já foi demonstrado o papel dos fitormônios produzidos por bactérias na modulação de respostas ao estresse salino e hídrico (EGAMBERDIEVA, 2009).

As auxinas recebem um grande destaque dentro do grupo de reguladores de crescimento por estarem envolvidas em processos de desenvolvimento, incluindo divisão e diferenciação celular, fototropismo, dominância apical e diferenciação vascular (SUGAWARA et al, 2009). Auxinas exógenas provocam alterações morfológicas significativas nas raízes como o aumento do comprimento, o número de pêlos radiculares e raízes laterais, também estimulam respostas rápidas, como o aumento do alongamento celular, e respostas lentas entre elas a divisão e diferenciação celular (BONILLA, 2011).

O ácido indol-acético (AIA) é a auxina natural mais abundante e estudada atualmente. Ela atua como uma molécula de sinalização e é um regulador chave, exercendo inúmeros papéis no desenvolvimento da planta, inclusive na organogênese de nódulos radiculares (SUGAWARA et al, 2015). A produção de AIA por bactérias vem sendo relatada em diversos estudos (PRINSEN et al., 1991, KUSS et al., 2007, TSAVKELOVA et al., 2012). Algumas bactérias associativas além de AIA são capazes de produzir outros fitormônios como giberelinas, ácido abscísico e citocininas (JHA et al., 2013; GOPALAKRISHNAN et al., 2015).

2.5. SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS

A disponibilidade de fósforo (P) em muitos solos é de cerca de $1\mu\text{mol/L}$, porém plantas requerem aproximadamente $30\mu\text{mol/L}$ para atingir sua máxima produtividade (JHA; SARAF, 2015). Especialmente em solos tropicais, o P é um nutriente de baixa disponibilidade às espécies vegetais, em decorrência de sua elevada reatividade com íons como cálcio, ferro e alumínio, provocando sua imobilização na forma de fosfatos inorgânicos, que não são passíveis de absorção por espécies vegetais (GLASS, 1989; MARRA et al., 2012).

Uma importante parcela da população microbiana dos solos possui a habilidade natural de solubilizar fosfatos inorgânicos, possibilitando a assimilação de P por espécies vegetais. A solubilização ocorre especialmente pela secreção de ácidos orgânicos, produtos do metabolismo primário e secundário de bactérias e fungos solubilizadores de fosfatos (RICHARDSON et al., 2009; ATIENO; LESUEUR, 2018). As bactérias solubilizadoras de fosfatos destacam-se por aumentar a disponibilidade de fósforo no solo e contribuir para a nutrição vegetal, aumentando a produtividade (SONG et al., 2008).

A maioria dos fertilizantes fosfatados aplicados se tornam precipitados em complexos minerais insolúveis, não sendo eficientemente aproveitados pelas plantas. Nesse contexto, a utilização concomitante de inoculantes em agroecossistemas possui grande importância econômica (GAIND; GAUR, 2002; RIBEIRO et al., 2018).

Solos também contém uma ampla gama de substratos orgânicos, que podem ser fonte de fósforo para plantas. Para tornar esse elemento disponível para nutrição vegetal, este deve ser hidrolisado em fósforo na forma iônica (JHA E SARAF, 2015). A mineralização de muitos compostos orgânicos ricos em fosfato é realizada por meio de atividade enzimática de fosfatases, fitases, fosfonoacetato hidrolases, D- α -glicerofosfatases e C-P liases (HAYAT et al., 2010). Bactérias do solo conhecidas por expressarem um nível significativo de fosfatases ácidas inclui representantes dos gêneros *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Phyllobacterium*, *Rhodococcus* e *Delftia* (CHEN et al., 2006).

2.6. ATIVIDADE ANTAGÔNICA CONTRA FITOPATÓGENOS

Muitos estudos na década de 70, destacaram as BPCP como agentes de controle biológico. O emprego do controle biológico de fitopatógenos atualmente tem despertado um grande interesse na comunidade científica, considerando as preocupações com o meio ambiente devido aos riscos de contaminação pelos defensivos químicos, segurança do homem na agricultura, a saúde da população em geral, o custo de produção e a resistência de patógenos aos agrotóxicos. Com isso,

os métodos alternativos de controle são necessários no manejo das principais doenças das plantas cultivadas (SHTIENBERG et al., 1994).

O potencial antagônico de um microrganismo pode ser definido como a capacidade de atuar negativamente sobre os fitopatógenos (HOWELL, 2003; BENÉTEZ et al., 2004). Os organismos antagonistas podem realizar o controle biológico de diferentes formas, as quais se destacam: parasitismo, antibiose, competição, interferência nos mecanismos de virulência do patógeno e indução de resistência na planta (STRANGE, 2003).

Alguns rizóbios são capazes de inibir o crescimento de fungos podendo ser utilizados como potenciais agentes de biocontrole contra fungos fitopatógenos. O antagonismo microbiano é desencadeado pela supressão do crescimento saprófito do patógeno da planta, por meio da produção de compostos antifúngicos ou antibacterianos, produção de enzimas, produção de sideróforos ou competição por nutrientes (ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006).

2.7. RIZÓBIOS E A TOLERÂNCIA A ESTRESSES ABIÓTICOS

2.7.1. PH

Usualmente o pH é relatado como principal fator que influencia a diversidade microbiana do solo (FIERER; JACKSON, 2006; LAUBER et al., 2008; NICOL et al., 2008). Para obter sucesso no estabelecimento da simbiose, rizóbios devem ser capazes de tolerar as condições ambientais também da rizosfera, região acidificada por estar constantemente recebendo descargas de exsudatos da planta, que contém ácido tricarboxílico e outros ácidos orgânicos, assim como prótons H^+ , quando amônia é utilizada como fonte de N (LUND et al., 2014).

O pH acidificado pode prejudicar o estabelecimento da simbiose, a taxa de nodulação e a FBN em determinados casos; além disso, relativamente poucos rizóbios são capazes de crescer em pHs inferiores a 5,0 (HUNGRIA; VARGAS, 2000; HELLWEG et al., 2009).

Segundo Tullio e colaboradores (2019) a capacidade de tolerar condições de estresse causadas pelo pH ácido é determinante para a interação com a planta

hospedeira. Assim, a versatilidade fisiológica e metabólica de rizóbios frente a algumas condições de estresse abiótico é reconhecida, porém ainda pouco compreendida devido ao seu caráter multifatorial.

2.7.2. Salinidade

Em populações de rizóbios o excesso de sais pode ter efeito negativo resultando em uma toxicidade direta, através do estresse osmótico ou estresse iônico (MAHMOOD et al., 2014). A salinidade também induz efeitos negativos sobre a nodulação, síntese de leghemoglobina e a atividade da nitrogenase (MANCHANDA; GARG, 2008).

Quando os estresses em plantas são de longa duração acredita-se que os íons se acumulam e provocam toxicidade, induzindo distúrbios metabólicos e nutricionais; em estresses de curta duração, prevalecem os efeitos osmóticos dos sais, fazendo com que o potencial hídrico do ambiente radicular diminua e restrinja a absorção de água (MUNNS, 2002).

Há uma estimativa de que quase 40% do total das terras agricultáveis no mundo são afetadas pela salinidade (PATIL et al., 2014), sendo assim, a seleção de estirpes de rizóbios tolerantes ao estresse salino aumenta as chances de sucesso para o estabelecimento e introdução das mesmas em associação com leguminosas, crescendo na produtividade de grãos (XAVIER et al., 2007).

Elevadas concentrações de sais no solo, especialmente Na^+ , causam efeitos negativos tanto nas plantas hospedeiras quanto nos rizóbios devido ao estresse iônico e desequilíbrio osmótico, que levam ao estresse oxidativo. Sendo os mecanismos de resposta frente ao estresse oxidativo variáveis entre organismos, existe grande variação quanto à tolerância ao estresse salino dentre diferentes estirpes de rizóbios. Os efeitos prejudiciais dos sais são mais evidentes para bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, particularmente em relação aos efeitos da concentração do íon específico do que ao efeito osmótico (ELSHEIKH, 1998), havendo variação de acordo com a forma iônica presente e a tolerância da estirpe. Desse modo, o NaCl tem sido considerado bom indicador da tolerância de bactérias a sais (ABDELMOUMEN et al., 1999).

Espécies de rizóbios de crescimento rápido tendem a ser mais tolerantes a altas concentrações salinas em meio de cultura, se comparadas com espécies de crescimento lento, por produzirem mais polissacarídeos extracelulares, que envolvem as células bacterianas, assim diminuindo o contato da superfície celular com o meio salino, promovendo maior resistência da célula bacteriana ao efeito osmótico (ELSHEIKH, 1998).

A inoculação com rizóbios pode também representar uma eficiente alternativa para aumento da tolerância de espécies vegetais ao estresse salino. Qu e colaboradores (2015) demonstraram que a inoculação com a estirpe *Sinorhizobium meliloti* 1021 (um simbiote natural de alfafa) aumentou a capacidade de adaptação de uma cultivar de soja sensível a condições de elevada salinidade.

Bactérias pertencentes ao gênero *Paraburkholderia* destacaram-se nos últimos anos por sua habilidade de tolerar estresses abióticos e modular respostas positivas aos mesmos em diferentes espécies de plantas hospedeiras (TALBI et al., 2013).

2.7.3. Temperatura

Sabe-se que a temperatura é um fator determinante para a diversidade microbiana do solo, cujo aquecimento, mesmo sendo de curta duração, promove benefícios a grupos termotolerantes, que podem aumentar significativamente sua abundância relativa (VOORT et al., 2016).

A temperatura tem influência sobre o crescimento do rizóbios e é um dos principais fatores limitantes ao processo de FBN nos trópicos (VARGAS e HUNGRIA, 1997). O crescimento da maioria dos rizóbios é interrompido a temperaturas abaixo de 10°C e acima de 37°C. Temperaturas abaixo deste mínimo interferem na reprodução das bactérias, enquanto que temperaturas muito altas desnaturam as enzimas e afeta o metabolismo energético e a divisão celular, comprometendo a reprodução dos rizóbios (XAVIER et al., 2007). Em estudos com a cultura da soja realizados por Castro et al. (1993) o tamanho dos nódulos parece ser o parâmetro com mais sensibilidade a altas temperaturas do que a taxa de nodulação.

Essa sensibilidade a altas temperaturas podem ser exemplificada pelas simbioses do feijoeiro; nesse caso tanto a planta como grande parte dos rizóbios

compatíveis são afetados em temperaturas superiores a 34°C, podendo inclusive acarretar em perda de plasmídeos simbióticos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002). Notoriamente, a estirpe PRF81 de *Rhizobium freirei* é recomendada para inoculação do feijoeiro no Brasil por sua elevada tolerância a estresses abióticos, dentre outras características desejáveis. Gomes e colaboradores (2012) caracterizaram o perfil de expressão de proteínas diferenciais dessa estirpe em resposta à elevadas temperaturas e sugerem a existência de uma resposta adaptativa integrada entre estresse oxidativo e térmico.

2.7.4. Metais Pesados

Apesar da importância econômica de atividades de exploração e industrialização de minérios e aplicação de fertilizantes e defensivos químicos em cultivos agrícolas, estas práticas causam uma grande interferência em ecossistemas por promover a contaminação do solo por metais pesados, os quais tornam-se tóxicos às plantas e a comunidade microbiana do solo quando em altas concentrações (DOELMAN; HAANSTRA, 1984; ATAFAR et al., 2010). Enquanto alguns metais são essenciais para o metabolismo microbiano (como Zn e Cu), outros não apresentem função metabólica (por exemplo, Pb, Cr e Cd); esses elementos tornam-se tóxicos acima de uma concentração mínima, mas esses efeitos geralmente dependem da especificidade dos microrganismos em mediar um processo particular.

A inoculação de PGPRs na rizosfera vegetal pode melhorar a eficiência da fitorremediação em ambientes contaminados por metais pesados (DARY et al., 2010; WOOD et al., 2016). A diversidade e a atividade microbiana do solo são atualmente consideradas indicativos de qualidade por exercer influência no funcionamento do sistema solo e planta, especialmente nos ecossistemas naturais, onde a ciclagem de nutrientes e a fertilidade do solo dependem inteiramente dos processos microbianos (SIQUEIRA et al., 1994).

Chaudri e colaboradores (1992) aplicaram soluções de sais de Cd, Zn, Cu e Ni em solo não contaminado com população nativa de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* e verificaram que os metais mais tóxicos foram Cd e Zn. Segundo Matsuda et al. (2002) a sobrevivência de genótipos de *Bradyrhizobium*, avaliada por meio do

número de células viáveis após 28 dias de incubação em solo com diferentes graus de contaminação, foi maior que a de *Azorhizobium*, indicando serem os primeiros mais tolerantes à presença de metais pesados no solo.

2.7.5. Tolerância a estresse xenobióticos

A aplicação de defensivos químicos pode trazer consequências negativas para comunidades microbianas no solo, afetando grupos funcionais de microrganismos que atuam na ciclagem de nutrientes essenciais à sustentabilidade dos ecossistemas. Tal efeito varia de acordo com o princípio ativo, formulação, dose utilizada, microrganismos presentes e da sensibilidade destes aos diversos produtos, condições climáticas e do tipo de solo (SILVA et al., 2003).

A aplicação de herbicidas, compostos químicos destinados ao controle de ervas daninhas, nas culturas que realizam a simbiose com bactérias fixadoras de N pode prejudicar o estabelecimento da simbiose e a assimilação desse nutriente nas plantas (SANTOS et al., 2005; REIS et al., 2009). Isso se deve a interferências causadas pelos herbicidas no metabolismo do microssimbionte, nas plantas hospedeira ou em ambos (ARRUDA et al., 2001). A maior interferência desses compostos pode ocorrer quando eles agem sobre a biossíntese de aminoácidos ou rotas metabólicas comuns a microrganismos e plantas (SANTOS et al., 2006).

Fatores como salinidade, estresse hídrico, pH do solo, temperatura, presença de metais pesados e xenobióticos podem afetar microssimbiontes sensíveis, plantas hospedeiras ou etapas envolvidas no estabelecimento da simbiose entre ambos (PATIL et al., 2014).

2.8. JUSTIFICATIVA

O Brasil é reconhecido por ser o país que abriga a maior diversidade florística do planeta e Fabaceae é uma das famílias que apresentam maior riqueza e expressivo endemismo (FORZZA et al., 2014); no entanto ainda são pouco estudados os ecossistemas naturais e as relações ecológicas que sustentam os berçários intrínsecos de biodiversidade.

Estudos preliminares indicam que os Campos Gerais do Paraná possuem uma diversidade única de rizóbios dos gêneros *Paraburkholderia*, *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*, associados a plantas leguminosas nativas/endêmicas da região (PAULTISCH et al., 2019a; KLEPA et al., submetido; PROTACHEVICZ, 2018). Paulitsch e colaboradores (2019b) recentemente descreveram a nova espécie *P. guartelaensis*, isolada de nódulos radiculares de plantas nativas do Parque Estadual do Guartelá. Klepa et al. (submetido) indicam a existência de outras duas novas espécies de rizóbios associadas a plantas do gênero *Mimosa* amostradas no Parque Estadual de Vila Velha e Parque Estadual do Guartelá. Tais resultados apontam que, além da região contar com reconhecido número de espécies endêmicas de plantas da família Fabaceae, também existe muita novidade dentre os rizóbios cognatos em condições naturais.

Apesar da notória biodiversidade, várias Unidades de Conservação do Brasil, inclusive as dos Campos Gerais, sofrem fortes pressões da expansão da agricultura e silvicultura. A degradação ambiental no Estado do Paraná tem atingido níveis alarmantes em muitas áreas que abrigam espécies endêmicas e desconhecidas (CERVI, 2007). Os estudos sobre a funcionalidade da microbiota e suas interações com o solo, flora e os demais processos que envolvem a dinâmica dessas comunidades ainda são escassos e podem auxiliar no delineamento de estratégias de conservação e recuperação de áreas degradadas, como já vem ocorrendo em áreas de mineração (MELLONI, et al., 2006).

3 OBJETIVO

Caracterizar rizóbios isolados de nódulos radiculares de plantas dos gêneros *Mimosa* e *Desmodium*, nativas de Unidades de Conservação dos Campos Gerais do Paraná, quanto às suas atividades promotoras do crescimento de plantas e capacidade de tolerância a estresses abióticos.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o perfil fisiológico quanto à diferentes condições de temperatura, pH e salinidade das estirpes isoladas de plantas nativas de Unidades de Conservação dos Campos Gerais;
- Avaliar o padrão de similaridade das estirpes em relação aos perfis fisiológicos;
- Verificar a capacidade de tolerância a compostos xenobióticos e presença de diferentes concentrações de metais pesados;
- Identificar habilidades quanto à promoção do crescimento vegetal quanto à solubilização de fosfato, produção de compostos indólicos e atividade antagônica contra *Colletotrichum lindemuthianum* e *Rhizoctonia solani in vitro*;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL BIOLÓGICO E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Foram caracterizadas 36 estirpes de rizóbios (Tabela 1), isoladas de plantas hospedeiras dos gêneros *Mimosa* e *Desmodium* nativas de quatro unidades de conservação: Parque Nacional dos Campos Gerais (PNCG), Parque Estadual de Vila Velha (PEVV), Parque Estadual do Cerrado (PEC) e Parque Estadual do Guartelá (PEG) (Figura 1). As estirpes foram depositadas na “Coleção de culturas de microrganismos multifuncionais” da Embrapa Soja (Londrina-PR) e foram previamente caracterizadas filogeneticamente (JANONI, 2017; PAULITSCH et al., 2019a; PAULITSCH et al., 2019b; KLEPA et al., submetido; PROTACHEVICZ, 2018). Para todos os testes foram utilizadas as estirpes tipo *Rhizobium freirei* PRF81^T e *Paraburkholderia nodosa* Br3437^T como padrões comparativos.

Figura 1: Localização dos pontos de amostragem de plantas leguminosas nodulíferas nativas dos Campos Gerais.

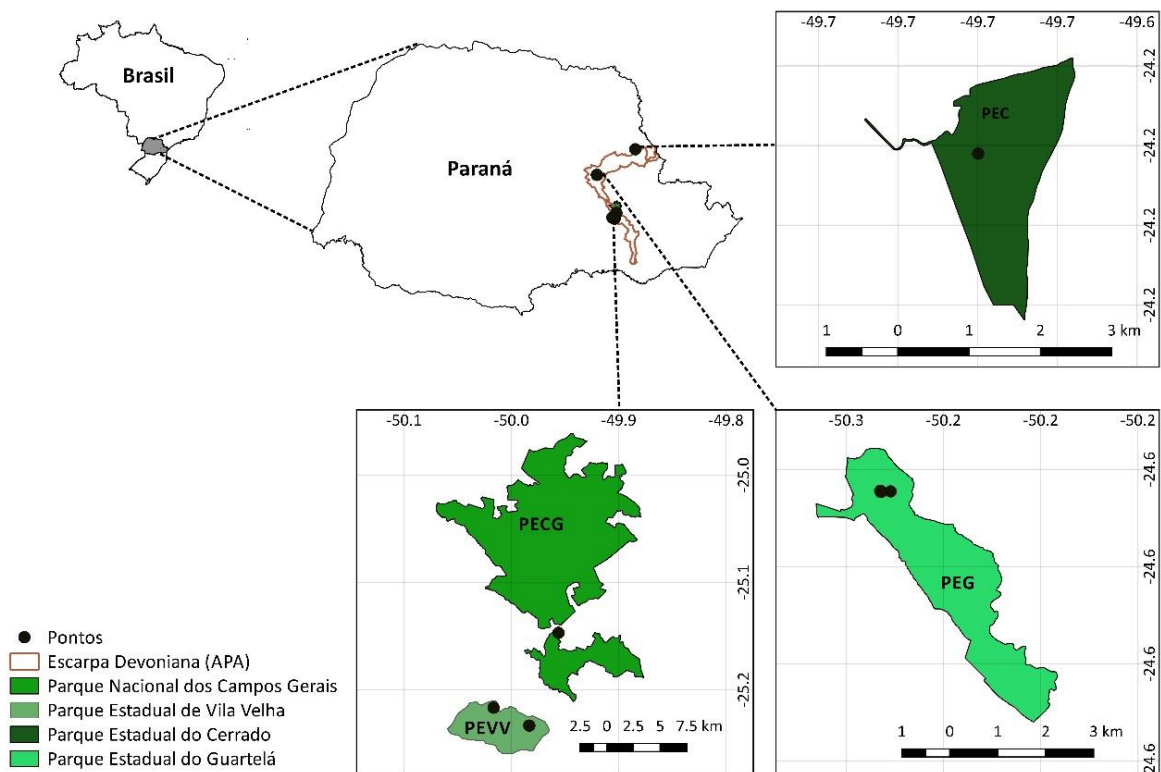


Tabela 1: Estirpes de rizóbios isoladas de leguminosas nativas dos Campos Gerais do Paraná, avaliadas quanto à tolerância a estresses abióticos e atividades promotoras do crescimento de plantas.

(Continua)

Estirpe	Planta hospedeira	Local de coleta	Referências
<i>Bradyrhizobium</i> sp CNPSO 3503	<i>D. barbatum</i>	P. N. dos Campos Gerais	Protachevicz, 2018
<i>Bradyrhizobium</i> sp CNPSO 3504	<i>D. barbatum</i>	P. E. do Cerrado	Protachevicz, 2018
<i>Bradyrhizobium</i> sp CNPSO 3512	<i>D. barbatum</i>	P. E. do Cerrado	Protachevicz, 2018
<i>Bradyrhizobium</i> sp CNPSO 3587	<i>D. barbatum</i>	P. N. dos Campos Gerais	Protachevicz, 2018
<i>Bradyrhizobium</i> sp CNPSO 3588	<i>D. barbatum</i>	P. N. dos Campos Gerais	Protachevicz, 2018
<i>Paraburkholderia</i> sp CNPSO 3474	<i>D. barbatum</i>	P. E. do Cerrado	Protachevicz, 2018
<i>Paraburkholderia</i> sp CNPSO 3479	<i>D. barbatum</i>	P. N. dos Campos Gerais	Protachevicz, 2018
<i>Paraburkholderia</i> sp CNPSO 3480	<i>D. barbatum</i>	P. N. dos Campos Gerais	Protachevicz, 2018
<i>Paraburkholderia</i> sp CNPSO 3509	<i>D. barbatum</i>	P. E. de Vila Velha	Protachevicz, 2018
<i>Rhizobium</i> sp CNPSO 3476	<i>D. barbatum</i>	P. E. do Cerrado	Protachevicz, 2018
<i>Rhizobium</i> sp CNPSO 3482	<i>D. barbatum</i>	P. E. de Vila Velha	Protachevicz, 2018
<i>Rhizobium</i> sp CNPSO 3586	<i>D. barbatum</i>	P. N. dos Campos Gerais	Protachevicz, 2018
<i>P. guartelaensis</i> CNPSO 2995	<i>M. gymnas</i>	P. E. do Guartelá	Paulitsch et al., 2019
<i>P. guartelaensis</i> CNPSO 3008 ^T	<i>M. gymnas</i>	P. E. do Guartelá	Paulitsch et al., 2019
<i>P. guartelaensis</i> CNPSO 3016	<i>M. gymnas</i>	P. E. do Guartelá	Paulitsch et al., 2019

Tabela 1: Estirpes de rizóbios isoladas de leguminosas nativas dos Campos Gerais do Paraná, avaliadas quanto à tolerância a estresses abióticos e atividades promotoras do crescimento de plantas.

(Continuação)

<i>P. guartelaensis</i> CNPSO 3023	<i>M. gymnas</i>	P. E. do Guartelá	Paulitsch et al., 2019
<i>P. guartelaensis</i> CNPSO 3248	<i>M. gymnas</i>	P. E. do Guartelá	Paulitsch et al., 2019
<i>Paraburkholderia</i> sp CNPSO 3006	<i>M. gymnas</i>	P. E. do Guartelá	Paulitsch et al., 2019
<i>Paraburkholderia</i> sp CNPSO 3009	<i>M. gymnas</i>	P. E. do Guartelá	Paulitsch et al., 2019
<i>Paraburkholderia</i> sp CNPSO 3010	<i>M. gymnas</i>	P. E. do Guartelá	Paulitsch et al., 2019
<i>Paraburkholderia</i> sp CNPSO 3032	<i>M. gymnas</i>	P. E. do Guartelá	Paulitsch et al., 2019
<i>Paraburkholderia</i> sp CNPSO 3186	<i>M. gymnas</i>	P. E. do Guartelá	Paulitsch et al., 2019
<i>Paraburkholderia</i> sp CNPSO 3268	<i>M. paranapiacabae</i>	P. E. do Guartelá	Klepa et al., submetido
<i>Paraburkholderia</i> sp CNPSO 3270	<i>M. paranapiacabae</i>	P. E. do Guartelá	Klepa et al., submetido
<i>Paraburkholderia</i> sp CNPSO 3272	<i>M. paranapiacabae</i>	P. E. do Guartelá	Klepa et al., submetido
<i>Paraburkholderia</i> sp CNPSO 3273	<i>M. paranapiacabae</i>	P. E. do Guartelá	Klepa et al., submetido
<i>Paraburkholderia</i> sp CNPSO 3274	<i>M. paranapiacabae</i>	P. E. do Guartelá	Klepa et al., submetido
<i>Paraburkholderia</i> sp CNPSO 3276	<i>M. paranapiacabae</i>	P. E. do Guartelá	Klepa et al., submetido
<i>Paraburkholderia</i> sp CNPSO 3278	<i>M. paranapiacabae</i>	P. E. do Guartelá	Klepa et al., submetido
<i>Paraburkholderia</i> sp CNPSO 3281	<i>M. paranapiacabae</i>	P. E. do Guartelá	Klepa et al., submetido
<i>Paraburkholderia</i> sp CNPSO 3031	<i>M. micropteris</i>	P. E. de Vila Velha	Klepa et al., submetido; Janoni, 2017

Tabela 1: Estirpes de rizóbios isoladas de leguminosas nativas dos Campos Gerais do Paraná, avaliadas quanto à tolerância a estresses abióticos e atividades promotoras do crescimento de plantas.

(Conclusão)

<i>Paraburkholderia</i> sp CNPSO 3034	<i>M. micropteris</i>	P. E. de Vila Velha	Klepa et al., submetido; Janoni, 2017
<i>Paraburkholderia</i> sp CNPSO 3057	<i>M. micropteris</i>	P. E. de Vila Velha	Klepa et al., submetido; Janoni, 2017
<i>Paraburkholderia</i> sp CNPSO 3058	<i>M. micropteris</i>	P. E. de Vila Velha	Klepa et al., submetido; Janoni, 2017
<i>Paraburkholderia</i> sp CNPSO 3076	<i>M. micropteris</i>	P. E. de Vila Velha	Klepa et al., submetido; Janoni, 2017
<i>Paraburkholderia</i> sp CNPSO 3077	<i>M. micropteris</i>	P. E. de Vila Velha	Klepa et al., submetido; Janoni, 2017

As estirpes foram cultivadas em meio YMA (composição em g/L-1: 0,5 K₂HPO₄; 0,2 MgSO₄. 7H₂O; 0,1 NaCl; 5,0 Manitol; 0,75 Extrato de levedura; 15,0 ágar; pH 6,8), e incubadas a 28°C.

4.2. TOLERÂNCIA A ESTRESSES ABIÓTICOS

4.2.1. Temperatura, Salinidade e PH

A capacidade de cada isolado de crescer em diferentes pH, temperatura e concentrações de NaCl foi testada em meio YM líquido. Colônias foram repicadas para frascos contendo meio líquido YM, e incubadas a 28 °C sob agitação orbital de 125 rpm. Uma alíquota de 20µL de um cultivo (concentração aproximada de 10⁴ células/mL) foi inoculada em cada poço de microplaca contendo 200 µL de meio YM. Para a avaliação de tolerância a salinidade, o meio YM foi modificado com a adição de NaCl (2,0 e 3,0% p/v) e para o pH foi acrescentado HCl 0,1M suficiente para atingir os pH 3,0, 4,5 e 6,0. Para o ensaio de temperatura, as microplacas foram incubadas em BOD a 28, 37 e 40°C.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, realizados em placas de 96 poços, com 4 repetições.

Após 72h de incubação em BOD, o crescimento foi avaliado de forma indireta em espectrofotômetro (DO_{620nm}), em seguida os valores foram subtraídos do valor do branco (YM + pré-inóculo) para obtenção do real valor de crescimento das estirpes. Os isolados cultivados em YM (pH 7,0, NaCl 0,01%) e incubadas a 28°C foram utilizados como controles.

4.2.2. Tolerância a Metais Pesados

Para avaliar a capacidade de crescimento dos rizóbios em presença dos metais pesados Al, Cu e Zn, as estirpes foram inoculadas em YM sólido (YM com acréscimo de 1,5% de ágar) contendo os seguintes sais metálicos em três concentrações: 0,1, 0,5 e 2,0 mM de AlCl₃; 0,5, 2,0 e 5,0 mM de CuSO₄ e 0,5, 2,0 e 5,0 mM de ZnSO₄ (PLATERO, et al., 2016). As culturas foram incubadas a 28°C e avaliadas diariamente

durante 7 dias. O comportamento das bactérias foi avaliado por uma escala visual do padrão de crescimento em relação ao controle (YM). Os resultados obtidos foram convertidos em caractere, onde (-) significa que não houve crescimento e (+) que houve crescimento.

4.2.3. Tolerância a Xenobióticos

Para avaliar a capacidade de tolerância aos herbicidas Gramoxone (Syngenta, 0,00741779 mM de Paraquat); Primóleo (Syngenta, 0,02356977 mM de Atrazina), as estirpes foram inoculadas em placas de petri contendo meio YM sólido + 95,38 µL de Gramoxone ou 127,16 µL de Primóleo, e incubadas por 72 horas, a 28°C. Os resultados obtidos foram convertidos em caractere, onde (-) significa que não houve crescimento e (+) que houve crescimento.

4.3. ATIVIDADES PROMOTORAS DO CRESCIMENTO

4.3.1. Solubilização de Fosfato

A capacidade dos isolados em solubilizar CaHPO_4 foi determinada em meio de cultivo desenvolvido por Pikovskaya (1948) por inoculação pontual seguido de incubação a 28°C. Se os isolados possuem potencial de solubilização é observado a formação de um halo claro ao redor da colônia.

Em placas contendo 50mL ágar Pikovskaya (HIMEDIA) (31,3 g de ágar Pikovskaya/L de água destilada), os rizóbios foram inoculados e incubados a 28°C por dez dias. Para aquelas que apresentaram resultado positivo, foi determinado o Índice de Solubilização (IS), calculado da seguinte forma: $\text{IS} = \frac{\text{diâmetro do Halo (mm)}}{\text{diâmetro da colônia (mm)}}$ (BERRAQUERO et al., 1976).

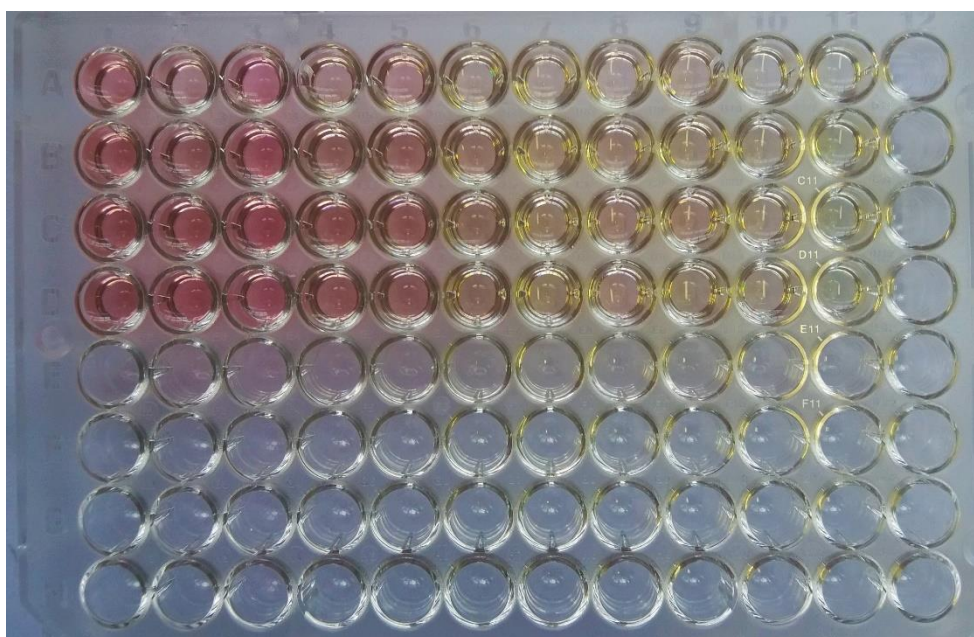
4.3.2. Produção Ácido Indol-Acético (AIA)

Para os ensaio de quantificação de auxinas, 0,3 mL do pré-inóculo ($\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ de 0,4) foi inoculado em 30 mL de meio líquido YM com L-triptofano ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), em

três repetições biológicas. As bactérias foram cultivadas a 28°C sob agitação orbital de 120 rpm por 72 horas. Após esse período uma alíquota de 1000 µL de cultura foi coletada e o crescimento foi avaliado por absorbância (D.O._{600nm}). A cultura foi centrifugada a 12000 xg por 10 minutos, em seguida a 500 µL do sobrenadante foram acrescentados 2000 µL do reagente Salkowski (30 mL de ácido sulfúrico; 50 mL de água destilada; 1 mL de cloreto de ferro 0,5 M) (GORDON; WEBER, 1951) e o restante do sobrenadante, junto com o pellet, foram congelados.

Após incubação por 30 minutos no escuro e em temperatura ambiente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 540 nm. Para estimativa da quantidade de auxinas foi construída uma curva de calibração com concentrações crescentes de AIA sintético (SIGMA) de 0 a 100 µg/mL. A reação com o reagente de Salkowski resulta em uma coloração amarelada para ausência de AIA e rosa avermelhado para a presença de AIA (Figura 2).

Figura 2: Curva de calibração com concentrações crescentes de AIA sintético (Sigma) de 0 a 100 µg/mL



4.3.3. Determinação de Proteínas Totais

Para a obtenção da quantificação de proteínas totais foi utilizada a metodologia conforme Bradford (1976), adaptado para condições de realização do teste em placas

de 96 poços descritas por Schwab (2007). As amostras que haviam sido previamente congeladas, foram descongeladas e 20 μ L deste material foram transferidos em microtubos juntamente com 80 μ L de água ultrapura autoclavada e 100 μ L de NaOH 0,2 M, deixando decorrer a lise celular, por cerca de 1h, à temperatura ambiente. Em seguida, 20 μ L do lisado foram transferidos para novo microtubo e adicionado 200 μ L do reagente de Bradford, seguido de homogeneização e a leitura em comprimento de onda de 570 nm. Para determinação da concentração de proteína produzida pelas bactérias foi realizado uma curva padrão (0 – 50 μ g/mL) de BSA (albumina de soro bovino) a partir de uma solução de estoque de 1 mg/mL (Figura 3).

Figura 3: Curva de calibração com concentrações de 0 a 50 g/mL de BSA.



4.3.4. Atividade Antagônica Contra Fito-Patógenos

Para avaliar o antagonismo dos isolados de rizóbios contra *Colletotrichum lindemuthianum* (agente causador da antracnose) e *Rhizoctonia solani* (agente causador da rizoctoniose) foram utilizadas a estratégia de confronto direto, utilizando o método de pareamento de culturas, de acordo com Dennis; Webster (1971). A multiplicação inicial, tanto dos isolados dos patógenos, foi realizada em placas contendo o meio de batata-dextrose-água (BDA), acondicionadas em incubadora a 28°C, por 10 dias. Discos (5 mm de diâmetro) retirados das culturas puras dos patógenos foram depositados a uma distância de 1,0 cm da borda em placas de Petri, contendo o mesmo meio. Seguidamente, o antagonista foi posicionado no lado oposto ao patógeno e mantidas nas mesmas condições descrita acima até que ocorresse um ponto de contato entre as duas colônias.

As avaliações do crescimento micelial foram realizadas quando toda a superfície do meio se apresentou colonizada no tratamento testemunha (patógeno cultivado na ausência do antagonista). Cada cultivo pareado foi realizado em triplicata. Os tratamentos foram distribuídos ao acaso na câmara de crescimento e, findo o período

de cultivo, foram realizadas as avaliações sendo o potencial antagonista detectado pela formação de halo de inibição.

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.4.1. Análise de Variância

Usou-se da estatística descritiva para apresentar os dados (porcentagem, mediana, média e desvio padrão), e utilizamos o teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis (equivalente ANOVA), devido aos dados não apresentarem distribuições normais, determinados a priori pelo histograma de frequência e pelo teste Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK 1965), para avaliar possíveis diferenças entre o crescimento das estirpes em função dos diferentes tratamentos e em relação ao tratamento controle (28° C). Como identificamos diferenças estatisticamente significantes, realizamos comparações pareadas usando o teste de Tukey e Kramer (Nemenyi) com aproximação de Tukey-Dist para amostras independentes (NORDSTOKKE; STELNICKI, 2014). Todas as análises foram realizadas usando o software R, com base no pacote "Vegan versão 2.4-1" (OKSANEN et al., 2019).

Para testar as diferenças entre o controle e as diferentes condições de estresse abióticos de cada estirpe foi utilizado o teste *t*, aplicado para dados com distribuição normal. Para os dados que não apresentaram distribuição normal utilizou-se o teste de Wilcoxon, sendo um teste não paramétrico (Gordon et al. 2015).

4.4.2. Agrupamento e Similaridade

Foi utilizada a análise de agrupamento hierárquico (*cluster*) para verificar a similaridade entre as estirpes em relação às variáveis dos testes de crescimento (temperatura, salinidade e pH). A similaridade entre as estirpes foi calculada através do coeficiente de similaridade de Bray-Curtis e o método de agrupamento, pelas médias das distâncias “*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*” (UPGMA) (LEGENDRE; LEGENDRE, 1998). Para a verificação do ajuste entre a matriz de similaridade e o dendrograma, foi calculado o coeficiente de correlação

cofenética (r), conforme (SOKAL; ROHLF 1962). Todas as análises foram realizadas usando o software R, com base no pacote "Vegan versão 2.4-1" (OKSANEN et al., 2019).

5 CARACTERIZAÇÃO DE RIZÓBIOS NATIVOS DOS CAMPOS GERAIS QUANTO À ATIVIDADES PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL E TOLERÂNCIA A ESTRESSES ABIÓTICOS

RESUMO

Os rizóbios possuem diferentes mecanismos de promoção do crescimento de plantas, importantes para o desenvolvimento vegetal e sustentabilidade dos ecossistemas. No entanto, fatores abióticos como pH, temperatura e presença de xenobióticos podem afetar o seu desempenho simbiótico de forma variável, de acordo com a espécie/estirpe. Levantamentos prévios apontam que as leguminosas nativas dos Campos Gerais do Paraná são noduladas por espécies/estirpes de rizóbios filogeneticamente variados, inclusive com a ocorrência de novas espécies. O objetivo deste estudo foi caracterizar trinta e seis estirpes de rizóbios isolados de nódulos radiculares de espécimes nativas de *Mimosa* spp. e *Desmodium* spp. quanto às suas atividades promotoras do crescimento de plantas e tolerância a estresses abióticos. O crescimento das estirpes foi significativamente afetado pelas temperaturas 37°C e 40°C, pelas concentrações de 1%, 2% e 3% NaCl e pelo pH 3,0; já em pH 4,5 e 6,0, não houve diferença significativa quando comparado com o controle. Pode-se relacionar tal resultado às condições químicas do solo de origem das plantas hospedeiras. Quanto à tolerância a metais pesados, nenhuma das estirpes apresentou resistência ao Cu nas três concentrações testadas enquanto todas foram capazes de crescer nas concentrações avaliadas de Zn. Quanto ao Al, 88% das estirpes apresentaram resistência à mais alta concentração testada (2mM). Nenhuma das estirpes apresentou atividade antagônica contra os fitopatógenos testados. Para a atividade de solubilização de fosfato 69,44% das estirpes tiveram resultados positivos, com índices de solubilização variando entre 0,13 a 1,22. Cinco das estirpes testadas produziram quantidades distintas de compostos indólicos, das quais quatro foram isoladas de *D. barbatum*. Nossos resultados indicam que fatores abióticos interferem de modo significativo e de forma diferencial no desenvolvimento dos rizóbios, demonstrando a importância da caracterização fisiológica na seleção de microrganismos.

Palavras-chave: *Paraburkholderia*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, bactérias promotoras do crescimento de plantas.

5.1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos associados a espécies vegetais podem ser comensais, com nenhuma função reconhecida ao hospedeiro, podem desencadear efeitos positivos (mutualistas) ou negativos (antagonistas), para uma dada espécie vegetal e condição ambiental (HARDOIM et al., 2015). Quanto aos mutualistas, suas atividades benéficas influenciam direta ou indiretamente a composição e produtividade de comunidades

vegetais, mesmo em condições ambientais adversas aos hospedeiros (WAGG et al., 2011; MENDES, 2013). Consequentemente, tais microrganismos são componentes indispensáveis à sustentabilidade dos ecossistemas terrestres.

Um dos mais estudados exemplos são os rizóbios, bacilos gram-negativos pertencentes a vários gêneros de Alfa e Betaproteobactérias, que possuem em comum a habilidade de estabelecer simbiose com plantas, majoritariamente da família Fabaceae (=Leguminosae) levando à formação de nódulos, órgãos radiculares especializados no processo de FBN (OLDROYD, 2013).

Rizóbios podem ser consideradas bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP), onde podem atuar em diferentes aspectos do crescimento vegetal: (1) sintetizando compostos que modulam o desenvolvimento da planta hospedeira, como fitormônios (auxinas, citocininas e giberelinas), compostos indólicos (ácido-indol-acético – AIA) e enzimas moduladoras (aminociclopropano-1-carboxilato/ACC desaminase); (2) facilitando a aquisição de nutrientes e solubilização de minerais (especialmente nitrogênio e fósforo); (3) prevenindo ou reduzindo a incidência de fitopatógenos (pela produção de enzimas, sideróforos e cianeto) (RAAIJMAKERS et al., 2009; HAYAT et al., 2010).

Na ausência da planta hospedeira específica ou em condições desfavoráveis à simbiose, os rizóbios podem viver saprofiticamente no solo, onde não realizam o processo de FBN e estão mais vulneráveis aos efeitos de estresses abióticos. Fatores como salinidade, estresse hídrico, pH do solo, temperatura, presença de metais pesados e xenobióticos podem afetar microssimbiontes sensíveis, plantas hospedeiras ou etapas envolvidas no estabelecimento da simbiose entre ambos (PATIL et al., 2014).

BPCP tolerantes a condições ambientais adversas vêm sendo estudadas como alternativa para amenizar os efeitos de estresses abióticos em culturas agrícolas (GROVER et al., 2010; GOPALAKRISHNAN et al., 2015) e como agentes de biorremediação de solos contaminados (MYRESIOTIS et al., 2011).

Nesse contexto, o presente estudo apresenta a caracterização de rizóbios frente a diferentes condições de estresses abióticos bem como verifica suas habilidades potenciais *in vitro* como bactérias promotoras do crescimento de plantas. Tais rizóbios foram isolados de leguminosas, pertencentes aos gêneros *Desmodium* e *Mimosa*,

nativas de unidades de conservação dos Campos Gerais do Paraná (Brasil). Os locais onde os rizóbios foram isolados caracterizam-se por possuírem solos de baixa fertilidade natural, com pH ácido, elevados teores de Al e baixa capacidade de retenção hídrica (JANONI, 2017; PAULITSCH et al., 2019a; KLEPA et al., submetido; PROTACHEVICZ, 2018).

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Material Biológico e Condições de Cultivo

Foram caracterizadas 36 estirpes de rizóbios (Tabela 1), isoladas de plantas hospedeiras dos gêneros *Mimosa* e *Desmodium*, nativas de quatro unidades de conservação: Parque Nacional dos Campos Gerais (PNCG), Parque Estadual de Vila Velha (PEVV), Parque Estadual do Cerrado (PEC) e Parque Estadual do Guartelá (PEG) (Figura 2). As estirpes foram depositadas na “Coleção de culturas de microrganismos multifuncionais” da Embrapa Soja (Londrina-PR) e foram previamente caracterizadas filogeneticamente (JANONI, 2017; PAULITSCH et al., 2019a; PAULITSCH et al., 2019b; KLEPA et al., submetido; PROTACHEVICZ, 2018). Para todos os testes foram utilizadas as estirpes *Rhizobium tropici* PRF81^T e *Paraburkholderia nodosa* Br3437^T como padrões comparativos.

As estirpes foram cultivadas em meio YMA (composição em g/L-1: 0,5 K₂HPO₄; 0,2 MgSO₄. 7H₂O; 0,1 NaCl; 5,0 Manitol; 0,75 Extrato de levedura; 15,0 ágar; pH 6,8), e incubadas a 28°C.

5.2.2. Tolerância a Temperatura, Salinidade e PH

A capacidade de cada estirpe de crescer em diferentes concentrações de NaCl, pH e temperatura foi testada em meio YM líquido. As bactérias foram pré-inoculadas em meio YM e incubadas a 28 °C sob agitação orbital de 125 rpm. Após o crescimento até fase exponencial (concentração aproximada de 10⁴ células/mL), alíquotas de 20 µL foram inoculadas em microplacas de 96 poços contendo 200 µL de meio YM para as várias condições avaliadas. Para a avaliação de tolerância a salinidade, o meio YM

foi modificado com a adição de NaCl (2,0 e 3,0% p/v) e para o pH foi acrescentado HCl 0,1M suficiente para atingir os pH 3,0, 4,5 e 6,0. Para o ensaio de temperatura, as microplacas foram incubadas em BOD a 28, 37 e 40°C.

Após 72 horas de incubação em BOD, o crescimento foi avaliado de forma indireta em espectrofotômetro (DO_{620nm}), em seguida os valores foram subtraídos do valor do branco (YM + pré-inóculo) para obtenção do real valor de crescimento das estirpes. Os isolados cultivados em YM (pH 7,0, NaCl 0,01%) e incubadas a 28°C foram utilizados como controle. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, realizados em placas de 96 poços, com 4 repetições.

5.2.3. Tolerância a Metais Pesados

Para avaliar a capacidade de crescimento dos rizóbios em presença dos metais pesados metais pesados Al, Cu e Zn, as estirpes foram inoculadas em YM sólido (YM com acréscimo de 1,5% de ágar) contendo os seguintes sais metálicos em três concentrações: 0,1, 0,5 e 2,0 mM de $AlCl_3$; 0,5, 2,0 e 5,0 mM de $CuSO_4$ e 0,5, 2,0 e 5,0 mM de $ZnSO_4$ (PLATERO, et al., 2016). As culturas foram incubadas a 28°C e avaliadas diariamente durante 7 dias. O comportamento das bactérias foi avaliado por uma escala visual do padrão de crescimento em relação ao controle (YM). Os resultados obtidos foram convertidos em caractere, onde (-) significa que não houve crescimento e (+) que houve crescimento.

5.2.4. Tolerância a Xenobióticos

Para avaliar a capacidade de tolerância aos herbicidas Gramoxone (Syngenta, 0,0074 mM de Paraquat) e Primóleo (Syngenta, 0,0235 mM de Atrazina) foi avaliada. Para tanto, as estirpes foram inoculadas em placas de petri contendo meio YM sólido + Gramoxone (0,185mM) ou Primóleo (0,147mM) em concentrações correspondentes às doses de campo dos referidos herbicidas, e incubadas por 72 horas, a 28°C. Os resultados obtidos foram convertidos em caractere, onde (-) significa que não houve crescimento e (+) que houve crescimento.

5.2.5. Atividades Promotoras do Crescimento

5.2.5.1. Solubilização de fosfato

A capacidade dos isolados em solubilizar CaHPO_4 foi determinada em meio de cultivo desenvolvido por Pikovskaya (1948) por inoculação pontual de pré-inóculo seguido de incubação a 28°C. Para aquelas que apresentaram resultado positivo, foi determinado o Índice de Solubilização (IS), calculado da seguinte forma: $\text{IS} = \text{diâmetro do Halo (mm)} / \text{diâmetro da colônia (mm)}$ (BERRAQUERO et al., 1976).

5.2.5.2. Produção ácido indol-acético (AIA)

Para os ensaio de quantificação de auxinas, 0,3 mL do pré-inóculo ($\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ de 0,4) foi inoculado em 30 mL de meio líquido YM com L-triptofano ($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), em três repetições biológicas. As bactérias foram cultivadas a 28°C sob agitação orbital de 120 rpm por 72 horas. Após esse período uma alíquota de 1000 μL de cultura foi coletada e o crescimento foi avaliado por absorbância ($\text{D.O.}_{600\text{nm}}$). A cultura foi centrifugada a 12000 xg por 10 minutos, em seguida a 500 μL do sobrenadante foram acrescentados 2000 μL do reagente Salkowski (30 mL de ácido sulfúrico; 50 mL de água destilada; 1 mL de cloreto de ferro 0,5 M) (GORDON; WEBER, 1951).

Após incubação por 30 minutos no escuro e em temperatura ambiente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (540 nm). Para estimativa da quantidade de auxinas foi construída uma curva de calibração com concentrações crescentes de AIA sintético (SIGMA) de 0 a 100 $\mu\text{g/mL}$.

Os microtubos que foram centrifugados e retirados o sobrenadante foram congelados para a posterior quantificação de proteínas totais conforme Bradford (1976), adaptado para condições de realização do teste em placas de 96 poços descritas por Schwab (2007). Para determinação da concentração de proteína produzida pelas bactérias foi realizado uma curva padrão (0 – 50 $\mu\text{g/mL}$) de BSA (albumina de soro bovino) a partir de uma solução de estoque de 1 mg/mL.

5.2.5.3. Atividade antagônica contra fito-patógenos

Para avaliar o antagonismo dos isolados de rizóbios contra *Colletotrichum lindemuthianum* (agente causador da antracnose) e *Rhizoctonia solani* (agente causador de podridão radicular) foi utilizada a estratégia de confronto direto, utilizando o método de pareamento de culturas, de acordo com Dennis e Webster (1971).

5.2.6. Análise Estatística

5.2.6.1. Análise de variância

Usou-se da estatística descritiva para apresentar os dados (porcentagem, mediana, média e desvio padrão), e utilizamos o teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis (equivalente ANOVA), devido aos dados não apresentarem distribuições normais, determinados *a priori* pelo histograma de frequência e pelo teste Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK 1965), para avaliar possíveis diferenças entre o crescimento das estirpes em função dos diferentes tratamentos e em relação ao tratamento controle (28° C). Como identificamos diferenças estatisticamente significantes, realizamos comparações pareadas usando o teste de Tukey e Kramer (Nemenyi) com aproximação de Tukey-Dist para amostras independentes (NORDSTOKKE; STELNICKI, 2014). Todas as análises foram realizadas usando o software R, com base no pacote "Vegan versão 2.4-1" (OKSANEN et al., 2019).

Para testar as diferenças entre o controle e as diferentes condições de estresse abióticos de cada estirpe foi utilizado o teste *t*, aplicado para dados com distribuição normal. Para os dados que não apresentaram distribuição normal utilizou-se o teste de Wilcoxon, sendo um teste não paramétrico (GORDON et al. 2015).

5.2.6.2. Agrupamento e similaridade

Utilizou-se a análise de agrupamento hierárquico (*cluster*) para verificar a similaridade entre as estirpes em relação às variáveis dos testes de crescimento (temperatura, salinidade e pH). A similaridade entre as estirpes foi calculada através

do coeficiente de similaridade de Bray-Curtis e o método de agrupamento, pelas médias das distâncias “*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*” (UPGMA). (LEGENDRE; LEGENDRE, 1998). Para a verificação do ajuste entre a matriz de similaridade e o dendrograma, foi calculado o coeficiente de correlação cofenética (r), conforme (SOKAL; ROHLF 1962). Todas as análises foram realizadas usando o software R, com base no pacote “Vegan versão 2.4-1” (OKSANEN et al., 2019).

5.3. RESULTADOS

Trinta e seis rizóbios isolados de leguminosas nativas dos Campos Gerais foram avaliados quanto à tolerância a estresses abióticos e habilidades *in vitro* como BPCP. Esses isolados já foram previamente caracterizados quanto à sua variabilidade genética, assegurando a não utilização de clones nesse estudo. Utilizou-se como padrão comparativo um alfa e um beta-rizóbio (*Rhizobium freirei* PRF81 e *Paraburkholderia nodosa* Br3437).

Nenhuma das estirpes avaliadas apresentou atividade antagônica contra *Colletotrichum lindemuthianum* e *Rhizoctonia solani*, inclusive as estirpes utilizadas como padrões comparativos.

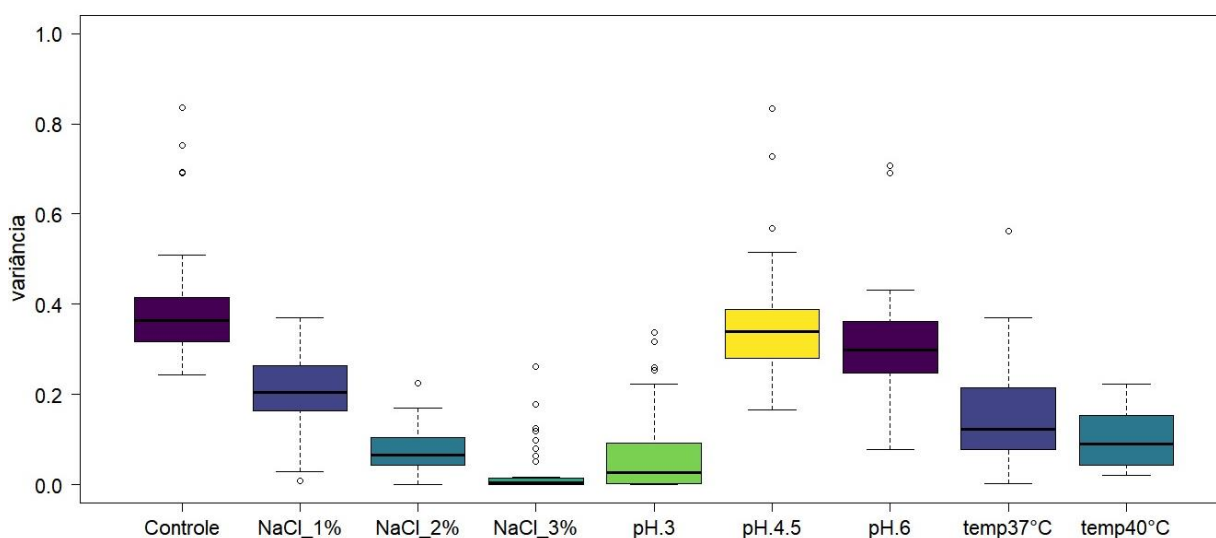
5.3.1. Dinâmica do Crescimento de Rizóbios em Diferentes Faixas de Temperaturas, PH e Salinidade

As estirpes foram analisadas em conjunto quanto à tolerância a diferentes faixas de temperatura, pH e salinidade (NaCl). Enquanto o crescimento das estirpes foi significativamente afetado ($p < 0,05$) pelas temperaturas de 37 e 40°C, pelas concentrações de 1%, 2% e 3% NaCl e pH 3,0. O mesmo não foi observado para as condições de pH 4,5 e 6,0 (Figura 4).

Com base na análise de agrupamento e considerando um corte a um nível de similaridade de 70% para classificação das unidades, pode-se observar a formação de cinco grupos (Figura 5). A metodologia utilizada na análise de agrupamento propiciou um coeficiente e correlação cofenético de 0,876; este valor, sendo superior

a 0,7, demonstra que a metodologia empregada foi adequada para resumir a informação ao conjunto dos dados utilizados.

Figura 4: Diagrama de caixa ilustrando as diferenças entre as taxas de crescimento das estirpes de rizóbios em diferentes condições de salinidade (NaCl), pH e temperaturas comparadas ao controle (NaCl 0,01%, pH 7,0, 28°C).



As estirpes *Bradyrhizobium* sp. CNPSO 3512 e *Paraburkholderia* sp. CNPSO 3509, ambas simbiotes de *D. barbatum*, não foram agrupadas. Ambas foram altamente sensíveis às condições de estresse 2 e 3% de NaCl (Tabela 2). Como evidenciado na Figura 4 e Tabela 2, poucas estirpes exibiram crescimento em presença de NaCl 3%; dentre as que foram tolerantes, destaca-se a estirpe *Bradyrhizobium* sp. CNPSO 3504, cujo crescimento foi pouco afetado nas três condições de salinidade analisadas.

A temperatura foi o fator que mais afetou o crescimento das estirpes do Grupo 3.2. Em alguns casos, foram obtidas maiores taxas de crescimento em temperatura de 40°C do que 37°C, podendo ser atribuído à indução de formação de biofilme por determinadas estirpes (Material Suplementar S1).

Com relação ao pH, todas as estirpes tiveram capacidade de crescimento em pH moderadamente ácido (4,5) e vinte e três rizóbios isolados dos Campos Gerais do Paraná cresceram em pH 3,0. Destes, destacam-se as estirpes CNPSO 2995, CNPSO

3008 e CNPSO 3023, todas pertencentes à nova espécie *P. guartelaensis* (PAULISTCH et al., 2019).

Todas as estirpes do gênero *Rhizobium* que foram isoladas de plantas nativas dos Campos Gerais apresentaram crescimento nas condições abióticas avaliadas; já a estirpe *R. freirei* PRF81 que é recomendada por possuir habilidade de tolerância a estresses abióticos, não apresentou crescimento em duas condições testadas (3% NaCl e pH 3,0).

Figura 5: Análise de agrupamentos baseada nos dados de crescimento das estirpes de rizóbios em diferentes faixas de pH, salinidade e temperatura.

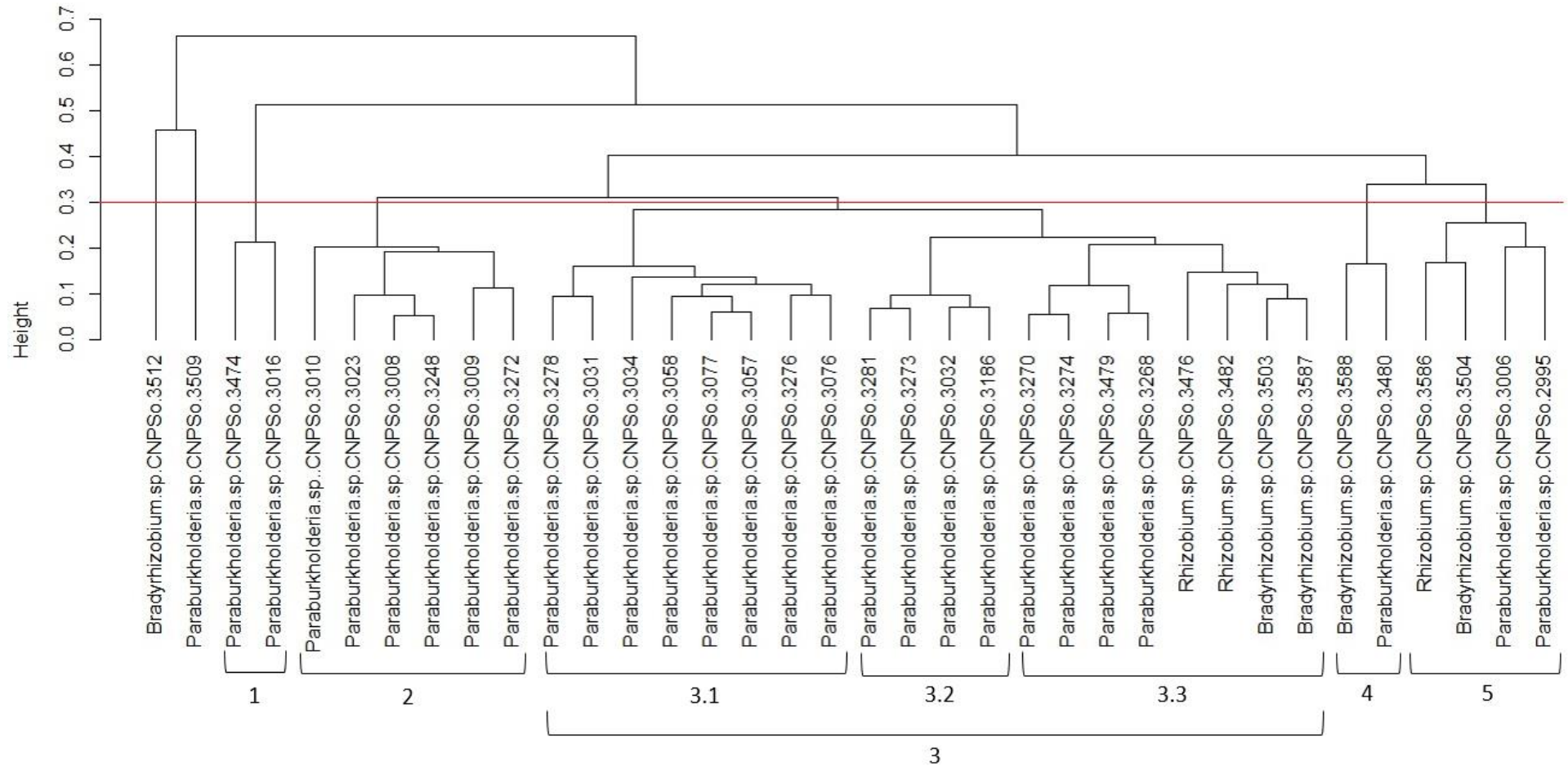


Tabela 2: Crescimento das estirpes (D.O._{600nm}) em meio líquido YM em diferentes condições de estresse abiótico.

(Continua)

Estirpe	Controle	Temperatura		NaCl			pH		
		37°C	40°C	1%	2%	3%	3	4,5	6
Paraburkholderia sp.									
CNPSo 3474	0,837 ± 0,008	0,563 ± 0,029*	0,169 ± 0,012*	0,364 ± 0,016*	0,043 ± 0,010*	-	0,027 ± 0,006*	0,835 ± 0,043	0,690 ± 0,007*
CNPSo 3479	0,429 ± 0,023	0,125 ± 0,012*	0,090 ± 0,076*	0,278 ± 0,076*	0,030 ± 0,004*	-	-	0,392 ± 0,029	0,362 ± 0,047
CNPSo 3480	0,753 ± 0,024	0,299 ± 0,068*	0,056 ± 0,019*	0,09 ± 0,002*	0,046 ± 0,012*	-	-	0,569 ± 0,052*	0,371 ± 0,064*
CNPSo 3509	0,693 ± 0,006	0,042 ± 0,011*	0,039 ± 0,016*	0,128 ± 0,014*	-	-	0,015 ± 0,017*	0,165 ± 0,016*	0,078 ± 0,047*
CNPSo 3010	0,315 ± 0,016	0,078 ± 0,025*	0,141 ± 0,012*	0,162 ± 0,009*	0,049 ± 0,025*	0,125 ± 0,027*	0,222 ± 0,011*	0,288 ± 0,026*	0,184 ± 0,059*
CNPSo 3006	0,483 ± 0,021	0,081 ± 0,035*	0,137 ± 0,024*	0,223 ± 0,049*	0,136 ± 0,021*	-	0,149 ± 0,081*	0,516 ± 0,029	0,396 ± 0,041*
CNPSo 3032	0,375 ± 0,030	-	-	0,177 ± 0,024*	0,102 ± 0,019*	-	0,013 ± 0,010*	0,339 ± 0,038	0,234 ± 0,037*
CNPSo 3186	0,384 ± 0,031	-	-	0,189 ± 0,028*	0,099 ± 0,045*	-	0,047 ± 0,021*	0,411 ± 0,013	0,298 ± 0,050*
CNPSo 3009	0,349 ± 0,024	0,091 ± 0,020*	0,106 ± 0,058*	0,264 ± 0,015*	0,052 ± 0,011*	-	-	0,294 ± 0,032*	0,253 ± 0,029*
CNPSo 3281	0,366 ± 0,018	0,057 ± 0,016*	0,035 ± 0,022*	0,148 ± 0,034*	0,059 ± 0,039*	-	0,039 ± 0,004*	0,351 ± 0,025	0,291 ± 0,023*
CNPSo 3273	0,382 ± 0,028	0,048 ± 0,008*	0,025 ± 0,018*	0,174 ± 0,050*	0,034 ± 0,010*	-	0,043 ± 0,015*	0,379 ± 0,012	0,295 ± 0,044*

Tabela 2: Crescimento das estirpes (D.O._{600nm}) em meio líquido YM em diferentes condições de estresse abiótico.

(Continuação)

CNPSo 3272	0,329 ± 0,010	0,181 ± 0,036*	0,088 ± 0,030*	0,257 ± 0,044*	0,034 ± 0,004*	0,014 ± 0,002*	0,013 ± 0,008*	0,254 ± 0,055*	0,229 ± 0,044*
CNPSo 3268	0,412 ± 0,025	0,054 ± 0,014*	0,038 ± 0,024*	0,266 ± 0,016*	0,015 ± 0,013*	-	0,011 ± 0,006*	0,393 ± 0,017	0,326 ± 0,039*
CNPSo 3270	0,341 ± 0,016	0,096 ± 0,015*	0,092 ± 0,009*	0,343 ± 0,023	0,013 ± 0,004*	-	-	0,338 ± 0,032	0,368 ± 0,020
CNPSo 3274	0,318 ± 0,016	0,067 ± 0,023*	0,108 ± 0,017*	0,359 ± 0,022*	0,091 ± 0,004*	-	-	0,350 ± 0,024	0,348 ± 0,026
CNPSo 3276	0,273 ± 0,024	0,218 ± 0,024	0,164 ± 0,015*	0,194 ± 0,046*	0,028 ± 0,013*	0,016 ± 0,003*	-	0,278 ± 0,029	0,292 ± 0,025
CNPSo 3278	0,254 ± 0,009	0,174 ± 0,036*	0,172 ± 0,019*	0,150 ± 0,012*	0,069 ± 0,022*	0,052 ± 0,011*	-	0,274 ± 0,026	0,243 ± 0,026
CNPSo 3058	0,348 ± 0,023	0,299 ± 0,054	0,214 ± 0,004*	0,161 ± 0,004*	0,044 ± 0,012*	0,057 ± 0,001*	-	0,289 ± 0,033*	0,299 ± 0,014*
CNPSo 3034	0,395 ± 0,026	0,216 ± 0,032*	0,211 ± 0,034*	0,206 ± 0,035*	0,069 ± 0,017*	-	-	0,351 ± 0,17*	0,379 ± 0,033
CNPSo 3077	0,319 ± 0,038	0,240 ± 0,027	0,206 ± 0,052*	0,203 ± 0,059*	0,063 ± 0,003*	-	-	0,226 ± 0,034*	0,278 ± 0,018
CNPSo 3076	0,308 ± 0,022	0,260 ± 0,024*	0,221 ± 0,020*	0,222 ± 0,006*	0,111 ± 0,026*	0,011 ± 0,001*	-	0,245 ± 0,019*	0,299 ± 0,011
CNPSo 3057	0,309 ± 0,022	0,247 ± 0,007*	0,223 ± 0,022*	0,142 ± 0,001*	0,047 ± 0,003*	-	-	0,255 ± 0,011	0,250 ± 0,019*
CNPSo 3031	0,301 ± 0,018	0,104 ± 0,028*	0,215 ± 0,018*	0,147 ± 0,009*	0,061 ± 0,015*	-	-	0,292 ± 0,036	0,245 ± 0,014
CNPSo 3008	0,396 ± 0,015	0,122 ± 0,042*	0,054 ± 0,026*	0,236 ± 0,022*	0,123 ± 0,016*	-	0,253 ± 0,029*	0,293 ± 0,015	0,272 ± 0,030

Tabela 2: Crescimento das estirpes (D.O._{600nm}) em meio líquido YM em diferentes condições de estresse abiótico.

(Continuação)

		0,360 ± 0,018							
CNPSo 2995		0,219 ± 0,029*		0,064 ± 0,009*		0,064 ± 0,006*		0,354 ± 0,018	
		0,115 ± 0,033*				0,316 ± 0,032*		0,408 ± 0,026*	
		0,352 ± 0,032							
CNPSo 3016	0,291 ± 0,017	0,369 ± 0,067*	0,088 ± 0,021*	0,272 ± 0,035	0,120 ± 0,012*	0,010 ± 0,014*	0,260 ± 0,012*	0,727 ± 0,030*	0,708 ± 0,060*
CNPSo 3023	0,461 ± 0,025	0,077 ± 0,005*	0,046 ± 0,024*	0,262 ± 0,025*	0,091 ± 0,035*	0,013 ± 0,007*	0,338 ± 0,043*	0,307 ± 0,013*	0,245 ± 0,037*
CNPSo 3248	0,396 ± 0,015	0,122 ± 0,056*	0,054 ± 0,045*	0,260 ± 0,017	0,104 ± 0,014*	0,011 ± 0,003*	0,213 ± 0,042*	0,246 ± 0,037	0,231 ± 0,033
Br3437	0,327 ± 0,016	0,073 ± 0,012*	0,185 ± 0,052*	0,220 ± 0,033*	0,129 ± 0,036*	0,177 ± 0,044*	0,214 ± 0,099*	0,316 ± 0,014	0,254 ± 0,034*
<i>Bradyrhizobium sp.</i>									
CNPSo 3503	0,350 ± 0,017	0,097 ± 0,018*	0,033 ± 0,028*	0,212 ± 0,083	0,079 ± 0,033*	-	-	0,384 ± 0,032	0,333 ± 0,088
CNPSo 3512	0,343 ± 0,007	0,189 ± 0,054	0,035 ± 0,023*	0,129 ± 0,006*	-	-	0,011 ± 0,004*	0,230 ± 0,093	0,102 ± 0,048
CNPSo 3587	0,395 ± 0,016	0,122 ± 0,075*	0,057 ± 0,045*	0,149 ± 0,030*	0,065 ± 0,008*	-	-	0,359 ± 0,018*	0,335 ± 0,023*
CNPSo 3588	0,690 ± 0,059	0,010 ± 0,057*	0,037 ± 0,076*	0,125 ± 0,037*	0,108 ± 0,035*	-	-	0,465 ± 0,044*	0,432 ± 0,037*
CNPSo 3504	0,317 ± 0,014	0,198 ± 0,082*	0,142 ± 0,051*	0,288 ± 0,020*	0,270 ± 0,024*	0,261 ± 0,018*	0,014 ± 0,004*	0,300 ± 0,031	0,323 ± 0,086
<i>Rhizobium sp.</i>									
CNPSo 3476	0,351 ± 0,010	0,152 ± 0,048	0,136 ± 0,028*	0,106 ± 0,019*	0,105 ± 0,014*	0,119 ± 0,018*	0,033 ± 0,004*	0,370 ± 0,072*	0,345 ± 0,071*

Tabela 2: Crescimento das estirpes (D.O._{600nm}) em meio líquido YM em diferentes condições de estresse abiótico.

(Conclusão)

CNPSo 3482	0,417 ± 0,036	0,096 ± 0,029*	0,056 ± 0,030*	0,201 ± 0,048*	0,119 ± 0,053*	0,153 ± 0,053*	0,027 ± 0,003*	0,284 ± 0,020*	0,304 ± 0,017*
CNPSo 3586	0,508 ± 0,010	0,127 ± 0,059*	0,099 ± 0,029*	0,369 ± 0,024*	0,225 ± 0,022*	0,178 ± 0,013*	0,034 ± 0,002*	0,477 ± 0,064*	0,361 ± 0,058*
PRF81	0,242 ± 0,014	0,079 ± 0,020*	0,163 ± 0,033	0,155 ± 0,035*	0,066 ± 0,005*	-	-	0,172 ± 0,008	0,145 ± 0,014*

* Estirpes que tiveram diferença significativa quando comparadas ao controle.

5.3.2. Tolerância a Metais Pesados

Nenhuma das estirpes apresentou resistência ao Cu nas três concentrações testadas e o oposto foi verificado para o Zn, visto que todas as estirpes apresentaram crescimento compatível com a condição controle em todas as concentrações avaliadas (Figura 6, Tabela 3).

A estirpe *Paraburkholderia* sp CNPSO 3032 destacou-se pela ausência de crescimento em presença de Al, nas três concentrações avaliadas. Outras três estirpes de *Paraburkholderia* sp (CNPSO 3479, CNPSO 3006, CNPSO 3034) não apresentaram resistência à concentração de 2mM (Tabela 3). As estirpes *R. freirei* PRF81 e *P. nodosa* Br3437 também não apresentaram resistência ao Cu e apresentaram resistência aos demais metais testados.

5.3.3. Tolerância a Xenobióticos

Todas as trinta e seis estirpes foram capazes de crescer na presença de quantidade compatível à dose de campo do herbicida comercial Primóleo. Quanto ao Gramoxone, vinte e quatro estirpes (66,6%) apresentaram tolerância (Figura 6), e as estirpes CNPSO 3480, CNPSO 3509, CNPSO 3504, CNPSO 3010, CNPSO 3006, CNPSO 3032, CNPSO 2995, CNPSO 3273, CNPSO 3272, CNPSO 3276, CNPSO 3278 e CNPSO 3076 não foram capazes de crescer na dose avaliada (Tabela 3). As estirpes *R. freirei* PRF81 e *P. nodosa* Br3437 apresentaram resistência a ambos herbicidas.

Figura 6: Porcentagem de estirpes resistentes as concentrações de Al (0,1; 0,5 e 2,0 mM) e Zn (0,5; 2,0 e 5,0 mM) e aos herbicidas Gramoxone (0,185 mM) e Primóleo (0,147 mM).

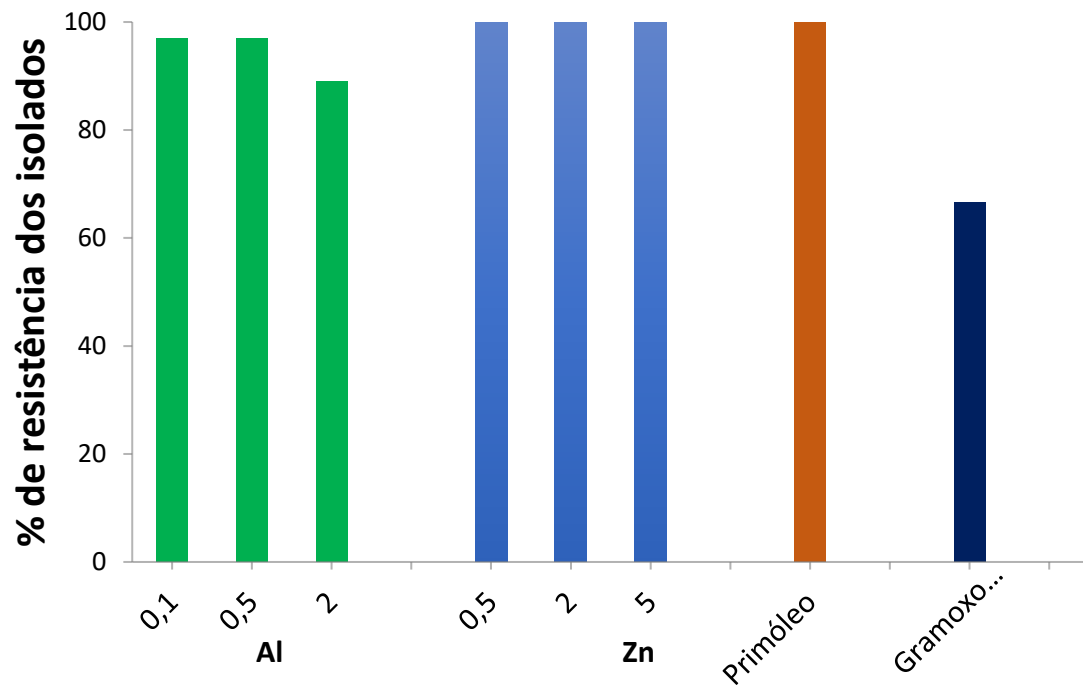


Tabela 3: Crescimento das estirpes em meio YM com a presença de AL, Zn (em três concentrações), dos herbicidas Gramoxone e Primóleo e avaliação da capacidade de solubilização de fosfato de cálcio em meio de cultivo sólido descrita pelo índice de solubilização (IS).

(Continua)

Estirpe	Alumínio (AlCl ₃)			Zinco (ZnSO ₄)			Primóleo	Gramoxone	Solubilização P (IS ¹)
	0,1 mM	0,5 mM	2,0 mM	0,5 mM	2,0 mM	5,0 mM	0,147mM	0,185mM	
<i>Paraburkholderia sp.</i>									
CNPSo 3474	+	+	+	+	+	+	+	+	0,61 ± 0,17
CNPSo 3479	+	+	-	+	+	+	+	+	-
CNPSo 3480	+	+	+	+	+	+	+	-	0,40 ± 0,09
CNPSo 3509	+	+	+	+	+	+	+	-	0,56 ± 0,06
CNPSo 3010	+	+	+	+	+	+	+	-	0,14 ± 0,02
CNPSo 3006	+	+	-	+	+	+	+	-	0,13 ± 0,02
CNPSo 3032	-	-	-	+	+	+	+	-	0,41 ± 0,01
CNPSo 3186	+	+	+	+	+	+	+	+	1,15 ± 0,01
CNPSo 3009	+	+	+	+	+	+	+	+	0,59 ± 0,05
CNPSo 3281	+	+	+	+	+	+	+	+	0,37 ± 0,07
CNPSo 3273	+	+	+	+	+	+	+	-	0,65 ± 0,09
CNPSo 3272	+	+	+	+	+	+	+	-	0,12 ± 0,04
CNPSo 3268	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CNPSo 3270	+	+	+	+	+	+	+	+	0,44 ± 0,07
CNPSo 3274	+	+	+	+	+	+	+	+	0,38 ± 0,04
CNPSo 3276	+	+	+	+	+	+	+	-	0,48 ± 0,05
CNPSo 3278	+	+	+	+	+	+	+	-	-
CNPSo 3058	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CNPSo 3034	+	+	-	+	+	+	+	+	-

Tabela 3: Crescimento das estirpes em meio YM com a presença de AL, Zn (em três concentrações), dos herbicidas Gramoxone e Primóleo e avaliação da capacidade de solubilização de fosfato de cálcio em meio de cultivo sólido descrita pelo índice de solubilização (IS).

									(Conclusão)
CNPSo 3077	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CNPSo 3076	+	+	+	+	+	+	+	-	-
CNPSo 3057	+	+	+	+	+	+	+	+	0,51 ± 0,05
CNPSo 3031	+	+	+	+	+	+	+	+	-
P. quartelaensis CNPSo 3008	+	+	+	+	+	+	+	+	0,52 ± 0,10
P. quartelaensis CNPSo 3248	+	+	+	+	+	+	+	+	-
P. quartelaensis CNPSo 2995	+	+	+	+	+	+	+	-	1,22 ± 0,12
P. quartelaensis CNPSo 3016	+	+	+	+	+	+	+	+	0,43 ± 0,06
P. quartelaensis CNPSo 3023	+	+	+	+	+	+	+	+	0,59 ± 0,05
BR3437	+	+	+	+	+	+	+	+	0,55 ± 0,05
<i>Bradyrhizobium sp.</i>									
CNPSo 3503	+	+	+	+	+	+	+	+	0,42 ± 0,07
CNPSo 3512	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CNPSo 3587	+	+	+	+	+	+	+	+	0,49 ± 0,10
CNPSo 3588	+	+	+	+	+	+	+	+	0,39 ± 0,02
CNPSo 3504	+	+	+	+	+	+	+	-	0,15 ± 0,01
<i>Rhizobium sp.</i>									
CNPSo 3476	+	+	+	+	+	+	+	+	-
CNPSo 3482	+	+	+	+	+	+	+	+	0,47 ± 0,07
CNPSo 3586	+	+	+	+	+	+	+	+	0,21 ± 0,04
PRF81	+	+	+	+	+	+	+	+	-

¹IS= diâmetro do Halo (mm)/diâmetro da colônia (mm)

5.3.4. Atividades Promotoras do Crescimento

5.3.4.1. Solubilização de fosfato

Dentre as estirpes avaliadas, vinte e cinco (69,44%) apresentaram formação de halo em meio de cultivo contendo CaPO_4 , ou seja, foram positivas para a atividade de solubilização de fosfato (Tabela 3). Das duas estirpes utilizadas como referência, apenas *P. nodosa* Br3437 apresentou formação de halo.

Das vinte e oito estirpes do gênero *Paraburkholderia* utilizadas nesse estudo, vinte e quatro apresentaram formação de halo, com IS variando de 0,12mm a 1,22mm. Os maiores valores de IS foram obtidos por estirpes de *Paraburkholderia* isoladas de *M. gymnas* nativas do Parque Estadual do Guartelá (CNPSO 2995 e CNPSO 3186).

Uma das cinco estirpes do gênero *Bradyrhizobium* (CNPSO 3587) e uma das três de *Rhizobium* (CNPSO 3482) apresentaram formação de halo.

5.3.4.2. Produção ácido indol-acético (AIA)

Apenas cinco estirpes foram positivas para produção de AIA (Tabela 4), sendo que a estirpe *Paraburkholderia* sp CNPSO 3474 foi a que apresentou a maior produção de AIA/mg de proteínas totais. Essa, bem como as estirpes *Bradyrhizobium* sp CNPSO 3503, *Bradyrhizobium* sp CNPSO 3588 e *Rhizobium* sp CNPSO 3476, também produtoras de AIA, foram isoladas de *Desmodium barbatum*.

Tabela 4: Avaliação quantitativa de rizóbios quanto à produção *in vitro* de compostos indólicos.

Estirpe	ug AIA/mg proteína
<i>Paraburkholderia</i> sp	
CNPSO 3474	9,98
CNPSO 3270	0,88
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	
CNPSO 3503	2,24
CNPSO 3588	4,47
<i>Rhizobium</i> sp.	
CNPSO 3476	1,05

5.4. DISCUSSÃO

Os “Campos Gerais do Paraná” definem uma zona fitogeográfica natural, composta por campos limpos, matas de galeria, capões de mata com araucária e refúgios de cerrado. Situada na porção centro-leste do estado do Paraná-Brasil, na borda do Segundo Planalto, essa região fitogeográfica representa uma zona limítrofe, devido às características climáticas e topográficas, as quais determinam suas formações vegetais distintas (CARMO, 2006). A região apresenta característica de ecótono com zonas de transição entre os Biomas Mata Atlântica e Cerrado, resultando em uma composição única quanto à diversidade de espécies vegetais (RITTER et al., 2010). Apesar de ser classificado como pertencente ao Bioma Mata Atlântica, as características edáficas e composição florística de várias unidades de conservação dos Campos Gerais do Paraná assemelham-se às do Cerrado (PAULISTCH et al., 2019).

Como previamente relatado, a ocorrência de plantas leguminosas noduladas por rizóbios nativos na região foi associada à áreas com solos arenosos de pH muito ácido ($< 5,0$), altas concentrações de Al e baixo teor de matéria orgânica (PAULISTCH et al., 2019; KLEPA et al., no prelo; PROTACHEVICZ, 2018). Usualmente, rizóbios são relatados por possuírem baixa capacidade de tolerância a pH inferior a 5 e a simbiose com as respectivas plantas hospedeiras é afetada em tais condições (HUNGRIA; VARGAS, 2000; HELLWEG et al., 2009). Verificamos que rizóbios dos gêneros *Paraburkholderia*, *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*, isolados de nódulos nativos de *Mimosa* spp e *Desmodium* spp não tem o crescimento significativamente afetado pelo pH 4,5 e muitos são tolerantes ao pH 3,0, algo raramente observado dentre rizóbios.

De modo geral a disponibilidade de fósforo é maior em solos com pH na faixa de 5,5 a 7,0 (PROCHNOW et al., 2003). Segundo Rheinheimer et al. (2001) com a elevação do pH ocorre um retardo no processo de dissolução do fosfato natural, ocasionando a diminuição da disponibilidade de fosforo proveniente desse fertilizante às plantas. Solos ácidos apresentam maior quantidade de Fe e Al enquanto que solos alcalinos são ricos em fosfato de Ca (RANNO et al., 2007).

Em relação aos estudos dos efeitos da salinidade observou-se, que conforme a concentração de NaCl aumenta ocorre uma redução na taxa de crescimento e na

porcentagem de estirpes tolerantes a este composto. Contudo, quando comparadas ao controle ocorreram diferenças significativas no crescimento das estirpes. Nossos resultados são congruentes com Castellane e Lemos (2007) que descreveram que a tolerância dos rizóbios à salinidade é uma etapa fundamental no processo de sua seleção, de maneira que nossos resultados indicam que a salinidade é um fator que pode inibir seu crescimento.

Nossas análises indicaram uma baixa taxa de crescimento dos rizóbios quando expostos a elevadas temperaturas ($\geq 37^{\circ}\text{C}$), de maneira que ao compararmos as estirpes com o controle constatamos que ocorreu diferenças significativas na taxa de crescimento. Silva e colaboradores (2007) mostraram em seu estudo que todos os nove isolados suportaram a temperatura de 37°C , assim como a estirpe padrão *Bradyrhizobium* sp. Semia 6145 porém, em temperatura mais elevada (39°C) seis isolados se mostraram suscetíveis incluindo à estirpe padrão 6145. Quinões et al. (2011) também relataram que rizóbios não apresentam crescimento satisfatório em altas temperaturas.

Com base na análise de agrupamento foi possível observar que os fatores abióticos testados (temperatura, pH e salinidade) têm relação com os gêneros, pois essa formou grupos onde as estirpes mais similares com relação a taxa de crescimento foram agrupadas (Figura 3). As estirpes *Bradyrhizobium* sp. CNPSO 3512 e *Paraburkholderia* sp. CNPSO 3509, ambas simbiotes de *D. barbatum*, não foram agrupadas. Ambas foram altamente sensíveis às condições de estresse 2 e 3% de NaCl (Tabela 2), indicando uma baixa tolerância dessas estirpes a solos com alta concentração de sais. Não foi observada relação significativa com os perfis de tolerância, planta hospedeira/espécie rizobiana e área amostral.

Observou-se que todas as estirpes avaliadas tem capacidade de tolerar os níveis avaliados de Zn e apenas quatro estirpes não apresentaram tolerância a Al, sendo que a estirpe CNPSO 3032 não apresentou resistência em nenhuma concentração e as outras três estirpes (CNPSO 3479, CNPSO 3006, CNPSO 3034) não apresentaram resistência apenas na concentração 2mM (Figura 5). Cabe ressaltar que as estirpes que não apresentaram resistência pertencem ao gênero *Paraburkholderia*, de maneira que não observamos relação dessa característica com o gênero, pois outras estirpes do gênero apresentaram resistência aos três níveis avaliados.

Em relação ao Cu nenhuma das estirpes apresentou tolerância as três concentrações testadas, corroborando com estudos anteriores que o classificaram como o metal mais tóxico aos microrganismos (CHAUDRI et al., 1992; ANGLE et al., 1993; TRANNIN et al., 2001).

Sabe-se que a aplicação de herbicidas pode trazer consequências indesejáveis para a microbiota do solo dependendo da dose utilizada, do princípio ativo, da formulação, dos microrganismos presentes e da sensibilidade desses aos diversos produtos, do tipo de solo e das condições climáticas (SILVA et al., 2003). Assim testando dois herbicidas com diferentes princípios ativos e formulações constatamos que primóleo não afetou o crescimento de nenhuma das estirpes testadas na dose utilizada, porém não se sabe como se comportam com doses superiores. No entanto, em relação ao Gramoxone, onze isolados de *Paraburkholderia* e um de *Bradyrhizobium* foram incapazes de crescer em meio YM com este herbicida, indicando ser uma barreira para o crescimento dessas estirpes equivalente a 33% de todas as estirpes testadas. Os outros vinte e quatro isolados foram considerados tolerantes a este herbicida.

Segundo Weller e Warren (1995) o fato de Gramoxone apresentar maior toxidez às estirpes pode estar relacionado ao seu mecanismo de ação, o qual, por meio da captura de elétrons provenientes da respiração, forma radicais tóxicos instáveis que rapidamente sofrem a auto-oxidação, durante esse processo são produzidos radicais superóxido e peróxido de hidrogênio, que reagem, produzindo hidroxil e oxigênio singlete, juntas essas substâncias promovem a degradação de membranas (peroxidação de lipídios), ocasionando a morte da célula. Pode também a toxicidade de Gramoxone ser atribuída a um ou mais ingredientes da formulação comercial do produto (SANTOS et al., 2006). Contudo, pode ainda ter ocorrido, interação entre esses dois fatores.

A suscetibilidade de *Bradyrhizobium* sp. aos compostos xenobióticos são geralmente relacionados, mas em nosso estudo das seis estirpes analisadas apenas uma foi afetada pela presença do Gramoxone. Perin et al. (2006) descrevem as estirpes do gênero *Burkholderia/Paraburkholderia* como tolerantes a xenobióticos. Mesmo que os rizóbios tenham sido amostrados em ambientes não seletivos para a

tolerância ao herbicida, observou-se a tolerância ao Primóleo e ao Gramoxone na maioria dos isolados.

Existem diferenças no potencial dos microrganismos em solubilizar fosfato (SILVA FILHO; VIDOR, 2000), um importante macronutriente para a planta e extremamente abundante nos solos, porém, encontrado principalmente na forma insolúvel (FERREIRA et al., 2011), tornando-se indisponíveis para as plantas (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999). Esses microrganismos possuem a capacidade de imobilizar parte do mineral para seu próprio metabolismo e dispor uma parte às plantas (ACHAL et al., 2007).

Estudos mostraram que bactérias se destacam na solubilização de fosfato mais do que certas espécies de fungo (SOUCHIE et al., 2006). Essas bactérias encontradas no solo podem aumentar a produtividade da planta, dentre as quais se destaca o gênero *Burkholderia/Paraburkholderia* (PANDEY et al., 2006). A espécie *Burkholderia cepacia* tem sido estudada por sua habilidade de promover o crescimento de plantas devido à solubilização de fosfato (MARIANO et al, 2004; SONG et al., 2008).

Neste estudo, 25 estirpes de um total de 36 (69,4%) apresentaram capacidade de solubilizar fosfato, dentre essas *Paraburkholderia* (Tabela 3) foi o gênero que apresentou os maiores índices de solubilização (IS). Contudo, vale ressaltar que a abundância desse gênero foi relativamente maior do que para os demais gêneros testados. Com relação à planta hospedeira, todos as estirpes isoladas de *Mimosa micropteris* e *M. paranapiacabae* apresentaram capacidade de solubilizar fosfato mesmo que com baixo índice. Já em relação ao local de coleta não encontramos nenhuma relação direta com potencial de solubilização, uma vez que do mesmo local ocorreram isolados que obtiveram capacidade de solubilização e outros que não.

Entre as 36 estirpes testadas apenas cinco demonstraram capacidade para produzir auxina (ácido indol-3-acético (AIA), um importante fitormônio que coordena diferentes processos de desenvolvimento em plantas. Esses compostos estimulam na planta respostas rápidas, como o aumento do alongamento celular e respostas lentas entre elas a divisão e diferenciação celular (BONILLA, 2011).

Os valores de AIA obtidos nas estirpes que demonstraram capacidade de sintetizar AIA são semelhantes ao encontrado por Biswas et al. (2000), que trabalhando com rizóbios inoculados em arroz inundado, registraram concentrações

de AIA inferiores a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Ahmad e colaboradores (2015) relataram que fitormônios assim como AIA, estimulam o crescimento de plantas dentro de uma faixa estreita de concentração, não sendo nessa faixa benéfica, as concentrações mais baixas se tornam ineficazes e as mais elevadas tóxicas para as plantas.

5.5. Considerações finais

A caracterização de espécies de rizóbios por muitas décadas foi baseada na habilidade específica da bactéria em nodular a planta hospedeira. Embora atualmente conta-se com várias técnicas robustas baseadas em biologia molecular, a caracterização fisiológica ainda é uma técnica muito importante na classificação de microrganismos, pois fatores abióticos e xenobióticos interferem de modo significativo no crescimento dos rizóbios e suas habilidades ecológicas.

Assim o isolamento e caracterização de estirpes melhores adaptadas e resistentes às diferentes condições ambientais, que são fatores limitantes para o desenvolvimento dos rizóbios pode vir a ser uma alternativa para produção e recomendação de novos inoculantes. Já para comprovarmos que as estirpes são de fato promotoras do crescimento vegetal, mais testes precisam ser realizados evidenciando seu potencial como PGPR com perspectivas de aplicações como biofertilizantes.

6 CONCLUSÃO

A habilidade de lidar com diferentes condições abióticas e manter suas funções ecológicas em seus ambientes naturais é uma importante propriedade entre os rizóbios. Os rizóbios podem desempenhar um papel crucial melhorando condições para adaptação, produção e estabelecimento de espécies vegetais. Considerando que as espécies vegetais em estudo são leguminosas pioneiras, a identificação da capacidade de crescimento em condições abióticas variadas e caracterização de atividades promotoras do crescimento vegetal pelos seus simbiossiontes podem contribuir no entendimento da implicação de tais microrganismos na sustentabilidade de seus ecossistemas de origem.

Verificamos que, acompanhando sua já descrita variabilidade genética, os rizóbios simbiossiontes de plantas nativas dos Campos Gerais do Paraná, pertencentes aos gêneros *Mimosa* e *Desmodium*, apresentam ampla variação quanto à tolerância a estresses abióticos, sendo notória sua geral capacidade de tolerância a pH ácidos/moderadamente ácidos e alguns metais pesados. Salienta-se que um elevado percentual dos rizóbios analisados foi capaz de solubilizar fosfato de cálcio, apontando seu duplo potencial na promoção do crescimento vegetal quanto à aquisição de nutrientes (nitrogênio e fósforo) pela planta hospedeira. Os dados obtidos servirão de base para seleção de microrganismos para aplicação como inoculantes de plantas utilizadas na recuperação de áreas degradadas.

REFERÊNCIAS

- ABDELMOUMEN, H. et al. Effect of high salts concentrations on the growth of rhizobia and responses to added osmotica. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 6, p. 889-898, 1999.
- ACHAL, Varenayam; SAVANT, V. V.; REDDY, M. Sudhakara. Phosphate solubilization by a wild type strain and UV-induced mutants of *Aspergillus tubingensis*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 695-699, 2007.
- AHEMAD, Munees; KHAN, Mohammad S. Insecticide-tolerant and plant-growth-promoting *Rhizobium* improves the growth of lentil (*Lens esculentus*) in insecticide-stressed soils. **Pest management science**, v. 67, n. 4, p. 423-429, 2011.
- AHEMAD, Munees; KIBRET, Mulugeta. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. **Journal of King saud University-science**, v. 26, n. 1, p. 1-20, 2014.
- AHMAD, Farah; AHMAD, Iqbal; KHAN, MOHAMMAD SAGHIR. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. **Turkish Journal of Biology**, v. 29, n. 1, p. 29-34, 2005.
- ANGLE, J. Scott et al. Inoculation effects on legumes grown in soil previously treated with sewage sludge. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 25, n. 5, p. 575-580, 1993.
- ARRUDA, João Silveira; LOPES, Nei Fernandes; BACARIN, Marcos Antonio. Nodulação e fixação do dinitrogênio em soja tratada com sulfentrazone. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 325-330, 2001.
- ATAFAR, Zahra et al. Effect of fertilizer application on soil heavy metal concentration. **Environmental monitoring and assessment**, v. 160, p. 83-89, 2010.
- ATIENO, Mary; LESUEUR, Didier. Opportunities for improved legume inoculants: enhanced stress tolerance of rhizobia and benefits to agroecosystems. **Symbiosis**, v. 77, n. 3, p. 191-205, 2019.
- BENITEZ, Emilio; MELGAR, Raquel; NOGALES, Rogelio. Estimating soil resilience to a toxic organic waste by measuring enzyme activities. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n. 10, p. 1615-1623, 2004.
- BERRAQUERO, F. Ruiz; BAYA, Ana M^a; CORMENZANA, A. Ramos. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica (Internet)**, v. 17, n. 4, p. 399-406, 1976.
- BHATTACHARYYA, Pranab N.; JHA, Dhruva K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 1327-1350, 2012.

BISWAS, Jatish C. et al. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. **Agronomy Journal**, v. 92, n. 5, p. 880-886, 2000.

BONILLA, GERMAN ANDRES ESTRADA. Seleção de bactérias diazotróficas solubilizadoras de fósforo e seu efeito no desenvolvimento de plantas de arroz. **German Andrés Estrada Bonilla-UFRJ-2011**, 2011.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BROUGHTON, W. J. et al. Beans (*Phaseolus* spp)-model food legumes. *plant and soil*, 252, 55-128. 2003.

CARMO, Marta Regina Barrotto do. **Caracterização fitofisionômica do Parque Estadual do Guartelá, município de Tibagi, estado do Paraná**. 2006. Tese de Doutorado.

CASTELLANE, Tereza Cristina Luque; LEMOS, Eliana Gertrudes de Macedo. Composição de exopolissacarídeos produzidos por estirpes de rizóbios cultivados em diferentes fontes de carbono. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 1503-1506, 2007.

CATTELAN, A. J. Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal. 1999.

CERVI¹, Armando C. et al. A vegetação do parque estadual de Vila Velha, município de Ponta Grossa, Paraná, Brasil. **Publicação interrompida**, v. 1986, p. 1998-2004, 1996.

CHAUDRI, Amar M.; MCGRATH, Steve P.; GILLER, Kenneth E. Survival of the indigenous population of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* in soil spiked with Cd, Zn, Cu and Ni salts. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 24, n. 7, p. 625-632, 1992.

CHAUHAN, Hemlata; BAGYARAJ, D. Joseph. Inoculation with selected microbial consortia not only enhances growth and yield of French bean but also reduces fertilizer application under field condition. **Scientia Horticulturae**, v. 197, p. 441-446, 2015.

CHEN, Xiao-Hua et al. Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 11, p. 4024-4036, 2006.

COOK, R. James. Advances in plant health management in the twentieth century. **Annual review of phytopathology**, v. 38, n. 1, p. 95-116, 2000.

DARY, M. et al. "In situ" phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. **Journal of Hazardous Materials**, v. 177, n. 1-3, p. 323-330, 2010.

DA SILVA, Leandro Souza; RANNO, Sidnei; MALLMANN, Fábio Joel. Fracionamento do fósforo inorgânico em solos de várzea do Rio Grande do Sul. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 13, n. 1, 2007.

DE CASTRO, O. M. et al. Evaluation of nitrogen fixation and soil microorganisms in soybean under conventional and minimal cultivation regimes. **Scientia Agricola**, v. 50, p. 212-219, 1993.

DENNIS, C.; WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 57, n. 3, p. 363-372, 1971.

DIXON, Ray; KAHN, Daniel. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 8, p. 621-631, 2004.

DOBBELAERE, Sofie; VANDERLEYDEN, Jos; OKON, Yaacov. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical reviews in plant sciences**, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003.

DOBBELAERE, Sofie; VANDERLEYDEN, Jos; OKON, Yaacov. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical reviews in plant sciences**, v. 22, n. 2, p. 107-149, 2003.

DOELMAN, P.; HAANSTRA, L. Short-term and long-term effects of cadmium, chromium, copper, nickel, lead and zinc on soil microbial respiration in relation to abiotic soil factors. **Plant and soil**, v. 79, p. 317-327, 1984.

EGAMBERDIEVA, Difuza. Alleviation of salt stress by plant growth regulators and IAA producing bacteria in wheat. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 31, n. 4, p. 861-864, 2009.

ELSHEIKH, Elsiddig AE. Effects of salt on rhizobia and bradyrhizobia: a review. **Annals of Applied Biology**, v. 132, n. 3, p. 507-524, 1998.

FERREIRA, Laura et al. MALDI-TOF mass spectrometry is a fast and reliable platform for identification and ecological studies of species from family Rhizobiaceae. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. e20223, 2011.

FIERER, Noah; JACKSON, Robert B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 3, p. 626-631, 2006.

FORZZA, R. C. et al. Angiospermas in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2012.

FOX, Gordon A.; NEGRETE-YANKELEVICH, Simoneta; SOSA, Vinicio J. (Ed.). **Ecological statistics: contemporary theory and application**. Oxford University Press, 2015.

GAIND, Sunita; GAUR, A. C. Impact of fly ash and phosphate solubilising bacteria on soybean productivity. **Bioresource technology**, v. 85, n. 3, p. 313-315, 2002.

GANS, Jason; WOLINSKY, Murray; DUNBAR, John. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. **Science**, v. 309, n. 5739, p. 1387-1390, 2005.

GLASS, Anthony DM. **Plant mineral nutrition. An introduction to current concepts**. 1989.

GLICK, Bernard R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, n. 1, p. 963401, 2012.

GLICK, Bernard R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian journal of microbiology**, v. 41, n. 2, p. 109-117, 1995.

GOMES, Douglas Fabiano et al. Two-dimensional proteome reference map of *Rhizobium tropici* PRF 81 reveals several symbiotic determinants and strong resemblance with agrobacteria. **Proteomics**, v. 12, n. 6, p. 859-863, 2012.

GOPALAKRISHNAN, Subramaniam et al. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. **3 Biotech**, v. 5, p. 355-377, 2015.

GORDON, Solon A.; WEBER, Robert P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant physiology**, v. 26, n. 1, p. 192, 1951.

GROVER, Minakshi et al. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 1231-1240, 2011.

HAAG, Andreas F. et al. Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium*–legume symbiosis. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 3, p. 364-383, 2013.

HARDOIM, Pablo R. et al. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 79, n. 3, p. 293-320, 2015.

HARDOIM, Pablo R. et al. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 79, n. 3, p. 293-320, 2015.

HASSANI, M. A.; DURÁN, P.; HACQUARD, S. Microbial interactions within the plant holobiont, p. 902–902, 2013.

HASSANI, Shokoufeh et al. Novel label-free electrochemical aptasensor for determination of Diazinon using gold nanoparticles-modified screen-printed gold electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 120, p. 122-128, 2018.

HAYAT, Rifat et al. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals of microbiology**, v. 60, p. 579-598, 2010.

HELLWEG, Christoph; PÜHLER, Alfred; WEIDNER, Stefan. The time course of the transcriptomic response of *Sinorhizobium meliloti* 1021 following a shift to acidic pH. **BMC microbiology**, v. 9, p. 1-16, 2009.

HOWELL, C. R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. **Plant disease**, v. 87, n. 1, p. 4-10, 2003.

HUNGRIA, M. et al. Symbiotic effectiveness of fast-growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 33, p. 387-394, 2001.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J. Inoculantes microbianos: situação no Brasil. **Biofertilizantes en Iberoamérica: Visión Técnica, Científica y Empresarial, Cyted/Biofag, Montevideo**, p. 22-31, 2007.

HUNGRIA, Mariangela; VARGAS, Milton AT. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field crops research**, v. 65, n. 2-3, p. 151-164, 2000.

JANONI, V. B. F. N. **OCORRÊNCIA DE *Mimosa micropteris* (Benth) NODULÍFERAS NATIVAS NOS CAMPOS GERAIS (PARANÁ-BRASIL) E DIVERSIDADE GENÉTICA DE SEUS MICROSSIMBIOTES**. Dissertação—UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA. 2017.

JHA, Chaitanya Kumar; SARAF, Meenu. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. **Journal of Agricultural Research and Development**, v. 5, n. 2, p. 108-119, 2015.

JHA, Sanjeev Kumar; MARIETHOZ, Gregoire; KELLY, Bryce FJ. Bathymetry fusion using multiple-point geostatistics: Novelty and challenges in representing non-stationary bedforms. **Environmental modelling and software**, v. 50, p. 66-76, 2013.

JI, Sang-Hye et al. Enhancement of vitality and activity of a plant growth-promoting bacteria (PGPB) by atmospheric pressure non-thermal plasma. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1044, 2019.

KLEPA, Milena Serenato et al. Molecular diversity of rhizobia-nodulating native Mimosa of Brazilian protected areas. *Archives of Microbiology*, v. 203, n. 9, p. 5533-5545, 2021.

KUSS, Anelise Vicentini et al. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 1459-1465, 2007.

LAUBER, Christian L. et al. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2407-2415, 2008.

LUGTENBERG, Ben; KAMILOVA, Faina. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual review of microbiology**, v. 63, n. 1, p. 541-556, 2009.

LUND, Peter; TRAMONTI, Angela; DE BIASE, Daniela. Coping with low pH: molecular strategies in neutrophilic bacteria. **FEMS microbiology reviews**, v. 38, n. 6, p. 1091-1125, 2014.

MANCHANDA, Geetanjali; GARG, Neera. Salinity and its effects on the functional biology of legumes. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, p. 595-618, 2008.

MARIANO, Rosa de Lima Ramos et al. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 1, p. 89-111, 2004.

MARCIANO MARRA, Leandro et al. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and soil**, v. 357, p. 289-307, 2012.

MARTÍNEZ-VIVEROS, O. et al. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. **Journal of soil science and plant nutrition**, v. 10, n. 3, p. 293-319, 2010.

MATSUDA, Alexandre; MOREIRA, Fátima Maria de Souza; SIQUEIRA, José Oswaldo. Tolerância de rizóbios de diferentes procedências ao zinco, cobre e cádmio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 343-355, 2002.

MELLONI, Rogério et al. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, p. 235-246, 2006.

MENDES, Rodrigo; GARBEVA, Paolina; RAAIJMAKERS, Jos M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 5, p. 634-663, 2013.

MONTESINOS, Emilio. Plant-associated microorganisms: a view from the scope of microbiology. **International Microbiology**, v. 6, p. 221-223, 2003.

MOREIRA, Fátima; SIQUEIRA, José Oswaldo. **Microbiologia e Bioquímica**. Editora Ufla, 2006.

MUNNS, Rana. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, cell and environment**, v. 25, n. 2, p. 239-250, 2002.

MYRESIOTIS, Charalampos K.; VRYZAS, Zisis; PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, Euphemia. Biodegradation of soil-applied pesticides by selected strains of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and their effects on bacterial growth. **Biodegradation**, v. 23, p. 297-310, 2012.

NADEEM, Sajid Mahmood et al. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. **Biotechnology advances**, v. 32, n. 2, p. 429-448, 2014.

NICOL, Graeme W. et al. The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria. **Environmental microbiology**, v. 10, n. 11, p. 2966-2978, 2008.

OLDROYD, Giles ED. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 252-263, 2013.

PANDEY, Anita et al. Characterization of a phosphate solubilizing and antagonistic strain of *Pseudomonas putida* (B0) isolated from a sub-alpine location in the Indian Central Himalaya. **Current microbiology**, v. 53, p. 102-107, 2006.

PATIL, S. M. et al. Isolation, characterization and salt tolerance activity of *Rhizobium* sp. from root nodules of some legumes. **Int J Curr Microbiol App Sci**, v. 3, p. 1005, 2014.

PATTEN, Cheryl L.; GLICK, Bernard R. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 8, p. 3795-3801, 2002.

PAULITSCH, Fabiane et al. Phylogenetic diversity of rhizobia nodulating native *Mimosa gymnas* grown in a South Brazilian ecotone. **Molecular Biology Reports**, v. 46, p. 529-540, 2019a.

PAULITSCH, Fabiane et al. *Paraburkholderia quartelaensis* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from nodules of *Mimosa gymnas* in an ecotone considered as a hotspot of biodiversity in Brazil. **Archives of Microbiology**, v. 201, p. 1435-1446, 2019b.

PEIXOTO, Pedro Accioly Neto Sá; DE AZEVEDO, João Lúcio; CAETANO, Luiz Carlos. Microrganismos endofíticos em plantas: status atual e perspectivas. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y aromáticas**, v. 3, n. 4, p. 69-72, 2004.

PERIN, L. et al. Diazotrophic Burkholderia species associated with field-grown maize and sugarcane. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 5, p. 3103-3110, 2006.

PERRIG, D. et al. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of Azospirillum brasilense, and implications for inoculant formulation. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 75, p. 1143-1150, 2007.

PIKOVSKAYA, R. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. Mikrobiologiya 17: 362–370. **Plant Soil**, v. 287, p. 77-84, 1948.

PINEDO, Ignacio et al. Burkholderia phytofirmans PsJN induces long-term metabolic and transcriptional changes involved in Arabidopsis thaliana salt tolerance. **Frontiers in plant science**, v. 6, p. 466, 2015.

PLATERO, Raúl et al. Novel Cupriavidus strains isolated from root nodules of native Uruguayan Mimosa species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 11, p. 3150-3164, 2016.

PRINSEN, E. et al. Azospirillum brasilense indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 6, p. 609-609, 1993.

PROCHNOW, Luís Ignácio et al. Characterization and agronomic evaluation of single superphosphates varying in iron phosphate impurities. **Agronomy Journal**, v. 95, n. 2, p. 293-302, 2003.

PROTACHEVICZ, A. P. **DIVERSIDADE E FILOGENIA MOLECULAR DE RIZÓBIOS ASSOCIADOS A DESMODIUM spp. NATIVS DOS CAMPOS GERAIS DO PARANÁ**. Dissertação—UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA. 2018.

QU, Liqun et al. Rhizobia-inoculation enhances the soybean's tolerance to salt stress. **Plant and Soil**, v. 400, p. 209-222, 2016.

RAAIJMAKERS, Jos M. et al. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. **Rhizosphere: achievements and challenges**, v. 104, p. 536 p., 2010.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. Regulando o crescimento e o desenvolvimento: os hormônios vegetais. **RAVEN, PH Biologia vegetal**, v. 6, p. 649-675, 2001.

REED, Sasha C.; CLEVELAND, Cory C.; TOWNSEND, Alan R. Functional ecology of free-living nitrogen fixation: a contemporary perspective. **Annual review of ecology, evolution, and systematics**, v. 42, n. 1, p. 489-512, 2011.

REIS, Veronica Massena; PEREIRA, William; HIPÓLITO, G. de S. Métodos de aplicação de bactérias diazotróficas em cana-soca para fins de determinação da eficiência agrônômica. 2009.

REMANS, Roseline et al. Physiological and genetic analysis of root responsiveness to auxin-producing plant growth-promoting bacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant and soil**, v. 302, p. 149-161, 2008.

RIBEIRO, Vitória Palhares et al. Endophytic *Bacillus* strains enhance pearl millet growth and nutrient uptake under low-P. **Brazilian journal of microbiology**, v. 49, p. 40-46, 2018.

RICHARDSON, Alan E. et al. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. 2009.

RITTER, Lia Maris Orth; RIBEIRO, Milton Cezar; MORO, Rosemeri Segecin. Composição florística e fitofisionomia de remanescentes disjuntos de Cerrado nos Campos Gerais, PR, Brasil-limite austral do bioma. **Biota Neotropica**, v. 10, p. 379-414, 2010.

RODRÍGUEZ, Hilda; FRAGA, Reynaldo. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology advances**, v. 17, n. 4-5, p. 319-339, 1999.

ROSENBLUETH, Mónica; MARTÍNEZ-ROMERO, Esperanza. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 19, n. 8, p. 827-837, 2006.

SANTOS, J. B. et al. Ação de herbicidas sobre o crescimento de estirpes de *Rhizobium tropici*. **Planta Daninha**, v. 24, p. 457-465, 2006.

SANTOS, J. B. et al. Atividade microbiana do solo após aplicação de herbicidas em sistemas de plantio direto e convencional. **Planta Daninha**, v. 23, p. 683-691, 2005.

SCHLOSS, Patrick D.; HANDELSMAN, Jo. Toward a census of bacteria in soil. **PLoS computational biology**, v. 2, n. 7, p. e92, 2006.

SCHWAB, Stefan et al. Identification of NH₄⁺-regulated genes of *Herbaspirillum seropedicae* by random insertional mutagenesis. **Archives of microbiology**, v. 187, p. 379-386, 2007.

SHTIENBERG, D. et al. Incorporation of cultivar resistance in a reduced-sprays strategy to suppress early and late blights on potato. 1994.

SILVA FILHO, Germano Nunes; VIDOR, Caio. Solubilização de fostatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, p. 311-319, 2000.

SILVA, J. B. F. et al. Controle de plantas daninhas em feijão-de-corda em sistema de semeadura direta. **Planta daninha**, v. 21, p. 151-157, 2003.

SIQUEIRA, José Oswaldo et al. Microrganismos e processos biológicos do solo. **Embrapa-SPI, Brasília-DF**, 1994.

SONG, Ok-Ryul et al. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by Burkholderia cepacia DA23 isolated from cultivated soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 151-156, 2008.

SOUCHIE, Edson Luiz et al. Phosphate solubilization and synergism between P-solubilizing and arbuscular mycorrhizal fungi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 1405-1411, 2006.

SPAEPEN, Stijn et al. Characterization of phenylpyruvate decarboxylase, involved in auxin production of Azospirillum brasilense. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 21, p. 7626-7633, 2007.

STRANGE, Richard N. **Introduction to plant pathology**. John Wiley and Sons, 2003.

SUGAWARA, Satoko et al. Distinct characteristics of indole-3-acetic acid and phenylacetic acid, two common auxins in plants. **Plant and Cell Physiology**, v. 56, n. 8, p. 1641-1654, 2015.

SUGAWARA, Satoko et al. Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 13, p. 5430-5435, 2009.

TALBI, Chouhra et al. Burkholderia phymatum improves salt tolerance of symbiotic nitrogen fixation in Phaseolus vulgaris. **Plant and soil**, v. 367, p. 673-685, 2013.

TATE III, Robert L. **Soil microbiology**. John Wiley and Sons, 2020.

TRANNIN, I.C.B.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Crescimento e nodulação de *Enterolobium contortsiliquum*, *Acacia mangium* e *Sesbania virgata* em solo contaminado com metais pesados. **R. Bras. Ci. Solo**, 25:743-753, 2001.

TSAVKELOVA, Elena et al. Identification and functional characterization of indole-3-acetamide-mediated IAA biosynthesis in plant-associated Fusarium species. **Fungal Genetics and Biology**, v. 49, n. 1, p. 48-57, 2012.

TULLIO, Leandro Datola et al. Revealing the roles of y4wF and tidC genes in Rhizobium tropici CIAT 899: biosynthesis of indolic compounds and impact on symbiotic properties. **Archives of microbiology**, v. 201, p. 171-183, 2019.

VARGAS, Milton Alexandre Teixeira. **Biologia dos solos dos cerrados**. EMBRAPA-CPAC, 1997.

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

VAN DER VOORT, Menno et al. Impact of soil heat on reassembly of bacterial communities in the rhizosphere microbiome and plant disease suppression. **Ecology Letters**, v. 19, n. 4, p. 375-382, 2016.

WAGG, Cameron et al. Mycorrhizal fungal identity and diversity relaxes plant–plant competition. **Ecology**, v. 92, n. 6, p. 1303-1313, 2011.

WELLER, David M. et al. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. **Annual review of phytopathology**, v. 40, n. 1, p. 309-348, 2002.

WELLER, S. C.; WARREN, G. F. Superoxide generators and protoporphyrinogen oxidase inhibitors (Paraquat and Diquat). **HERBICIDE action course**. West Lafayette: Purdue University, 1995.

WOOD, Jennifer L.; TANG, Caixian; FRANKS, Ashley E. Microbial associated plant growth and heavy metal accumulation to improve phytoextraction of contaminated soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 103, p. 131-137, 2016.

XAVIER, Gustavo Ribeiro et al. Tolerância de rizóbio de feijão-caupi à salinidade e à temperatura em condição in vitro. **Revista Caatinga**, v. 20, n. 4, p. 1-9, 2007.

VALÉRIA, C. P.; ZAGO, H. P.; NORMA, G. Pseudomonas spp fluorescentes-Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola. **Embrapa-CNPAB**, v. 127, p. 32, 2000.

APÊNDICE A - MATERIAL SUPLEMENTAR

Material Suplementar S1 - Teste de produção de biofilme avaliado em espectrofotômetro (D.O.₅₇₀) entre as diferentes estirpes. (Continua)

Estirpe	Controle	Temperatura		NaCl			pH		
		37°C	40°C	1%	2%	3%	3	4,5	6
Paraburkholderia sp.									
CNPSo 3474	0,019	0,049	0	0	0	0	0	0,064	0
CNPSo 3479	0,025	0	0	0,032	0,004	0	0,004	0,193	0
CNPSo 3480	0,585	0	0	0	0	0	0	0,052	0
CNPSo 3509	0,081	0,028	0	0,002	0	0	0,01	0,097	0
CNPSo 3010	0,26	0	0	0,101	0	0	0,068	0,036	0,075
CNPSo 3006	0,132	0,002	0	0	0	0,394	0,753	1,016	0,148
CNPSo 3032	0,402	0,002	0	0	0	0	0,081	1,217	0,292
CNPSo 3186	0,405	0,008	0	0,037	0	0,003	0	0,682	0,282
CNPSo 3009	0,258	0	0	0	0	0	0	0,072	0,008
CNPSo 3281	0,265	0,001	0	0	0	0,008	0,009	1,028	0,033
CNPSo 3273	0,272	0	0	0	0	0	0,021	0,627	0,101
CNPSo 3272	0,638	0,006	0	0,112	0	0,001	0,059	0,89	0,136
CNPSo 3268	0,055	0	0,003	0	0	0,002	0,026	0,18	0
CNPSo 3270	0,236	0	0,004	0,007	0	0,009	0,026	0,345	0,157
CNPSo 3274	0,332	0	0,007	0	0	0,009	0,033	0,55	0,174
CNPSo 3276	0,721	0	0	0	0,01	0	0,149	0,562	0,345
CNPSo 3278	1,225	0	0	0	0	0	0,019	0,641	0,496
CNPSo 3058	0,305	0	0	0	0,001	0	0,028	0,576	0,165
CNPSo 3034	0,095	0	0	0,211	0	0	0,035	0,232	0,095

Material Suplementar S1 - Teste de produção de biofilme avaliado em espectrofotômetro (D.O.570) entre as diferentes estirpes. (Conclusão)

CNPSo 3077	0,325	0	0	0	0	0	0,049	0,639	0,181
CNPSo 3076	0,192	0	0	0,055	0,094	0	0,104	0,294	0,137
CNPSo 3057	0,174	0	0	0	0,005	0	0,029	0,343	0,09
CNPSo 3031	0,148	0	0	0	0	0	0,025	0,304	0,073
CNPSo 3008	0,106	0	0	0,167	0	0	0,168	0,81	0
CNPSo 3248	0,116	0	0	0,088	0,181	0	0,27	0,702	0,027
CNPSo 2995	0,236	0,084	0	0	0,014	0	0,015	0,487	0,009
CNPSo 3016	0,405	0	0	0	0	0	0,26	0,344	0,012
CNPSo 3023	0,265	0	0	0	0	0	0,014	0,812	0,008
BR3437	0,353	0	0	0,099	0	0,007	0,004	0,009	0
<i>Bradyrhizobium sp.</i>									
CNPSo 3503	0,002	0,01	0,011	0	0,099	0,005	0,041	1,406	1,426
CNPSo 3512	0,92	0,086	0,077	0,454	0,536	0	0	0,821	0
CNPSo 3587	0,098	0,044	0	0	0	0,077	0,041	1,006	0,386
CNPSo 3588	0,115	0,075	0	0	0	0,118	0	0,449	0,11
CNPSo 3504	0,826	0,432	0,025	0,069	0,104	0,47	0,005	1,041	0,412
<i>Rhizobium sp.</i>									
CNPSo 3476	0,007	0,54	0	0	0	0,115	0	1,08	0,668
CNPSo 3482	0,824	0	0	0,024	0	0,065	0,017	1,228	0,025
CNPSo 3586	0,32	0,036	0	0	0	0,026	0	0,752	0,023
PRF81	0,007	0,039	0	0	0	0	0	0	0,012

Material suplementar S2 – Valores referentes ao teste *t* e Wilcoxon para comparações pareadas entre o controle (28°C) e as diferentes condições abióticas. Diferenças significativas $p < 0,05$.

(Continua)

Estirpe	Temperatura		NaCl			pH		
	37°C	40°C	1%	2%	3%	3	4,5	6
<i>Paraburkholderia sp</i>								
CNPSo 3474	0,029	0,029	0,029	0,029	0,029	0,029	0,343	0,029
CNPSo 3479	0,029	0,029	0	0,029	0,029	0,027	0,094	0,056
CNPSo 3480	0,003	0,029	0,029	0,029	0,029	0,029	0,029	0,006
CNPSo 3509	0,029	0,029	0,029	0,021	0,021	0,029	0,03	0,016
CNPSo 3010	0,029	0,029	0,029	0,029	0,029	0	0,012	0,005
CNPSo 3006	0,003	0,029	0,001	0,029	0,029	0,029	0,121	0,015
CNPSo 3032	0,029	0,021	0,029	0,029	0,029	0,029	0,309	0,006
CNPSo 3186	0,021	0,029	0,084	0,029	0,004	0,029	0,183	0,033
CNPSo 3009	0,029	0,029	0,002	0,029	0,029	0,021	0,034	0,002
CNPSo 3281	0,005	0,029	0,029	0,029	0,021	0,029	0,553	0,002
CNPSo 3273	0,029	0,029	0,029	0,029	0,029	0,029	0,844	0,029
CNPSo 3272	0,032	0,029	0,029	0,029	0,029	0,029	0,029	0,029
CNPSo 3268	0,029	0,028	0	0,029	0,029	0,029	0,27	0,013
CNPSo 3270	0,029	0,029	0,889	0,029	0,029	0,021	0,895	0,083
CNPSo 3274	0,029	0,029	0,027	0,029	0,029	0,021	0,072	0,116
CNPSo 3276	0,772	0,001	0,002	0,029	0,029	0,021	0,8	0,317
CNPSo 3278	0,008	0,001	0,002	0,029	0,029	0,021	0,232	0,586
CNPSo 3058	0,101	0,029	0,029	0,029	0,029	0,021	0,032	0,017
CNPSo 3034	0	0,06	0,029	0,029	0,029	0,021	0,035	0,469
CNPSo 3077	0,067	0,014	0,001	0,029	0,029	0,021	0,011	0,12
CNPSo 3076	0,02	0,001	0,003	0,001	0,029	0,021	0,005	0,285

Material suplementar S2 – Valores referentes ao teste *t* e Wilcoxon para comparações pareadas entre o controle (28°C) e as diferentes condições abióticas. Diferenças significativas $p < 0,05$.

								(Conclusão)
CNPSo 3057	0,003	0,001	0	0,029	0,029	0,021	0,058	0,007
CNPSo 3031	0,029	0,001	0,029	0,029	0,029	0,021	0,755	0,079
CNPSo 3008	0,029	0,002	0,01	0,029	0,029	0	0,121	0,073
CNPSo 3248	0,025	0,029	0,949	0,029	0,029	0,02	0,518	0,19
CNPSo 2995	0	0,029	0,949	0,029	0,029	0	0,343	0,027
CNPSo 3016	0,035	0,029	0,388	0,029	0,029	0,029	0,029	0
CNPSo 3023	0,029	0,029	0,029	0,029	0,029	0,029	0,029	0
BR3437	0,029	0	0,001	0,029	0,024	0,029	0,381	0,017
<i>Bradyrhizobium sp.</i>								
CNPSo 3503	0,029	0,029	0,188	0,029	0,029	0,029	0,667	0,729
CNPSo 3512	0,62	0,029	0,029	0,029	0,029	0,029	0,343	0,147
CNPSo 3587	0,004	0,029	0,029	0,029	0,029	0,021	0,027	0,006
CNPSo 3588	0,003	0,021	0,029	0,029	0,029	0,029	0,002	0,001
CNPSo 3504	0,018	0,029	0,004	0,029	0,087	0,029	0,166	0,073
<i>Rhizobium sp.</i>								
CNPSo 3476	0,343	0,029	0,029	0,029	0,029	0,029	0,026	0,018
CNPSo 3482	0,029	0,029	0,076	0,029	0,029	0,029	0	0
CNPSo 3586	0,029	0,029	0,029	0,029	0,029	0,029	0,029	0,029
PRF81	0,029	0,107	0,026	0,027	0	0,018	0,075	0,01

Em destaque resultados que não foram significativos ($p > 0,05$).