



Seleção de rizobactérias como promotoras de crescimento em melancia

Screening of plant growth-promoting rhizobacteria in watermelon

A. K. L. Pais¹; J. R. da Silva²; F. C. Alencar³; A. R. Peixoto¹; J. C. de Souza¹; C. D. da Paz^{1*}

¹Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais, UNEB, 48900-000, Juazeiro-BA, Brasil

²Departamento de Agronomia, UFRPE, 52171-900, Recife-PE, Brasil

³Departamento de Engenharia Agrícola, UNIVASF, 48902-300, Juazeiro-BA, Brasil

*dapazcd@yahoo.com

(Recebido em 01 de outubro de 2015; aceito em 30 de março de 2016)

As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) são encontradas aderidas ao solo ou colonizando a superfície de raízes de muitas culturas, aumentando a sua produtividade. O objetivo deste trabalho foi caracterizar bactérias provenientes de solos cultivados com cucurbitáceas e avaliar o seu efeito no desenvolvimento de plântulas de melancia cv. Crimson Sweet. Após o isolamento das bactérias, procedeu-se a caracterização fenotípica e o agrupamento pelo método UPGMA com base no coeficiente de Bray-Curtis. Na avaliação da eficiência na promoção de crescimento, os tratamentos consistiram de 44 isolados bacterianos e a testemunha, utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Inoculou-se cada isolado bacteriano na concentração de $4,5 \times 10^{-8}$ UFC.mL⁻¹ nas sementes, durante 24 horas. As testemunhas foram imersas em água destilada e esterilizada pelo mesmo período de tempo. Decorridos 20 dias após a semeadura, avaliou-se o comprimento e a biomassa seca da parte aérea e radicular. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância. Dos 44 isolados bacterianos, o dendrograma permitiu a formação de 29 grupos distintos a 80% de similaridade. O isolado UNEB 55 proporcionou aumento no comprimento e biomassa seca da parte aérea e radicular da melancia. Os isolados UNEB 05, UNEB 27, UNEB 53 e UNEB 57 induziram aumento no comprimento da parte aérea, sem efeito deletério nas demais variáveis. Esses resultados indicam que estes isolados poderão ser utilizados como promotores de crescimento em melancia.

Palavras-chave: bacterização de sementes, BPCP, Cucurbitaceae

The plant growth-promoting bacteria (PGPB) have been found attached to the ground or colonizing the surface of roots in many crops increasing their yield. The aim of this study was to characterize bacterial strains from the rhizosphere of cucurbits and assess their effect on development of watermelon seedlings cv. Crimson Sweet. The strains were isolated and evaluated to the phenotypic characterization and grouping by UPGMA method based on coefficient of Bray-Curtis. The treatments consisted of 44 bacterial strains and the control using a completely randomized design with five replicates. Each strain was inoculated on the seeds with a concentration of 4.5×10^{-8} CFU.mL⁻¹ for 24 hours. Controls were immersed in distilled and sterilized water at the same time. In 20 days after sowing, it was evaluated the length and dry weight of root and shoot. The data were submitted to variance analysis and the averages compared by the Scott-Knott test at 5% of significance level. The dendrogram of the 44 strains showed the formation of 29 clusters with similarity of 80%. The strain UNEB 55 provided an increase in the length and dry weight of shoots and roots of watermelon. The strains UNEB 05, UNEB 27, UNEB 53 and UNEB 57 induced increase in the length of the shoot without deleterious effect on other variables. These results indicate that these strains may be used as plant growth-promoting bacteria in watermelon.

Keywords: Seeds bacterization, PGPR, Cucurbitaceae

1. INTRODUÇÃO

A melancia (*Citrullus lanatus* L.), uma das espécies mais importantes da família Cucurbitaceae, é cultivada em quase todo o território nacional, especialmente nas épocas quentes. Seu cultivo ocorre de forma intensiva com o uso de fertilizantes químicos, criando um ambiente seletivo que afeta negativamente a diversidade microbiana do solo. Por causa desse efeito indesejado, estratégias agrícolas mais eficientes e sustentáveis vêm sendo alvo de discussões [25, 21]. Nesse sentido, a microbiota do solo assume importante papel, uma vez que os microrganismos do solo disponibilizam elementos essenciais para as plantas e atuam na manutenção dos ecossistemas, minimizando os danos causados pelo uso intensivo do solo [28, 27]. Contudo, em relação ao comportamento dos microrganismos quando em contato com as plantas, os efeitos observados podem ser benéficos, com incremento no desenvolvimento das plantas, neutro ou deletério [19].

Entre os microrganismos que promovem efeitos benéficos destacam-se as bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP), que agem melhorando o desempenho do hospedeiro e como biocontroladores de fitopatógenos [7]. A utilização dessas bactérias no desenvolvimento das plantas vem sendo foco de pesquisas em culturas como melancia [6], pepino [17], feijão [8], arroz [12], soja e algodão [3], cana de açúcar [13] e milho [26].

Os mecanismos envolvidos na promoção de crescimento das plantas pelas bactérias podem estar relacionados à síntese de compostos que oferecem proteção contra os patógenos ou na absorção de nutrientes do ambiente, como é o caso da fixação biológica de N e da solubilização de fosfato inorgânico [20, 10]. Além destes mecanismos as bactérias podem produzir fitormônios que irão influenciar no desenvolvimento das plantas [14].

Diante do exposto, este trabalho objetivou a caracterização fenotípica de bactérias provenientes de solos cultivados com cucurbitáceas e a avaliação de seu efeito no desenvolvimento de plântulas de melancia cv. Crimson Sweet.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Fitopatologia e em casa de vegetação, do Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais - DTCS, da Universidade do Estado da Bahia - UNEB, Campus III, no município de Juazeiro – BA.

Em solos de cultivo de cucurbitáceas coletaram-se pequenas porções da rizosfera, totalizando 10 amostras.área⁻¹ que formaram amostra composta de onde se retirou 50 g e procedeu-se a diluição em 100 mL de água destilada. Alíquotas desta solução foram cultivadas em placas de Petri contendo meio ágar nutritivo-dextrose-extrato de levedura - NYDA [18], solidificado, de forma a obter isolados puros visando a caracterização. Os isolados foram conservados em tubos criogênicos contendo água destilada esterilizada – ADE.

Na caracterização foram analisados os seguintes aspectos: tamanho (grande: maior que 5 mm, média: de 2 a 5 mm e pequena: menor que 2 mm), forma (circular, irregular, rizóide, filamentosa e puntiforme), elevação (côncava, elevada, ondulada, protuberante, achatada e convexa), bordas (lisas, laceradas, lobadas, filamentosas e onduladas), estrutura (lisa, granulosa, filamentosa, rugosa), brilho (transparente, translúcida e opaca), cor (incolor e pigmentada) e aspecto (viscosa, úmida, membranosa e leitosa) [22]. Na avaliação da diversidade de rizobactérias no solo cultivado com cucurbitáceas, utilizou-se o agrupamento pelo método UPGMA, com base no coeficiente de similaridade Bray-Curtis, pelo software estatístico PaSt [15].

Após a caracterização, as bactérias foram plaqueadas e inoculadas em sementes de melancia cv. Crimson Sweet, no intuito de avaliar a sua eficiência na promoção de crescimento das plântulas. Cada isolado puro foi repicado e multiplicado pelo método de riscas [18], em duas placas de Petri, contendo meio NYDA. As suspensões bacterianas foram preparadas adicionando-se ADE em placas após 48 horas de crescimento bacteriano.

Antes da inoculação, as sementes foram lavadas em água corrente por 30 minutos para eliminação do excesso de fungicida, depois desinfestadas por 2 minutos em solução de hipoclorito de sódio (3:1) e 2 minutos em ADE. Então, procedeu-se a inoculação de cada isolado bacteriano

nas sementes de melancia, na concentração de $4,5 \times 10^{-8}$ UFC.mL⁻¹, durante 24 horas. As testemunhas foram imersas em ADE pelo mesmo período de tempo. As sementes bacterizadas e a testemunha foram postas para secar a 26°C por 12 horas. Posteriormente, essas sementes foram semeadas em bandejas de poliestireno previamente desinfestadas com hipoclorito, contendo substrato Plantmax® e mantidas em casa de vegetação.

Decorridos 20 dias após a semeadura, avaliou-se o comprimento e a biomassa seca da parte aérea e do sistema radicular. Esta última avaliação ocorreu após permanência da parte aérea e sistema radicular em estufa a 65 °C por 48h, quando procedeu-se a pesagem deste material. Os tratamentos consistiram de 44 isolados bacterianos e a testemunha, em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância utilizando o programa SISVAR 5.5 Build 82[11].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na rizosfera de cucurbitáceas foram identificados 44 isolados e pela caracterização morfológica 77,3% tinham colônia pequena, 50% estrutura lisa e 54% dos isolados em seu crescimento desenvolveram um aspecto úmido, essas características foram as mais expressivas quando comparadas com as demais. De acordo com Zahran (1999) [32] e Xavier et al. (2007) [31], as características fenotípicas dos microrganismos são influenciadas por condições edafoclimáticas específicas do local de origem. Stephan et al. (2000) [29], constataram que a presença de plantas leguminosas influenciou na diversidade microbiana do solo. Da mesma forma, as características predominantes neste trabalho podem estar relacionadas ao local de origem dos microrganismos, uma vez que todas as coletas foram realizadas em áreas com cultivo de cucurbitáceas.

A diversidade fenotípica rizobacteriana encontrada através da caracterização morfológica dos isolados pode ser observada no dendrograma da Figura 1, no qual o nível de similaridade variou de 0 a 100%. Os isolados que mostraram um nível igual ou maior que 80% formaram 29 grupos distintos com características similares.

Quanto à avaliação da promoção de crescimento no estágio inicial das plantas de melancia (Tabela1), nos resultados em relação ao crescimento da parte aérea (CPA), 25 isolados tiveram as maiores médias, pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Resultados semelhantes foram encontrados por Araújo (2008) [3], com o isolado de *Bacillus subtilis* quando aplicado juntamente com farinha de ostras em sementes de milho, o qual promoveu um acréscimo da área foliar e altura das plantas. Shaharoon et al. (2006) [26], trabalhando com milho, inocularam isolados de *Pseudomonas* spp. e nesse processo observaram um aumento significativo no tamanho de plantas e produção de grãos quando comparado com o controle sem inóculo.

Na avaliação do sistema radicular (CR), 13 isolados promoveram significativamente o crescimento das raízes quando comparado com a testemunha. As bactérias promotoras de crescimento, em associação com plantas, promovem maior crescimento da raiz, tornando a planta mais eficiente na absorção de água e nutrientes [19]. Esta eficiência pode estar associada à presença do ácido indol-3-acético (AIA) que atua no alongamento celular e na formação de raízes adventícias [30, 2, 4].

Na matéria seca da parte aérea (MSPA), dez isolados induziram aumento significativo nesta variável em relação à testemunha. Trabalho realizado com a estirpe de *Paenibacillus graminis* (MC 04.21) co-inoculada com *Bradyrhizobium* sp. (BR 3267) em feijão teve incremento na variável biomassa seca da parte aérea [23], assim como Lima (2009) [16], comprovou o aumento da MSPA em plantas de feijão-caupi inoculadas com *Glomusetunicatum*.

A maior produção da biomassa seca da raiz (MSR) foi induzida por seis isolados nas plântulas de melancia (Tabela 1). Assumpção et al. (2009) [5], inocularam *Enterobacter* sp. em sementes de soja e observaram benefícios na MSR concluindo que esse ganho pode estar relacionado com a capacidade do isolado produzir AIA e solubilizar fosfato. Em trabalho realizado com plântulas de

milho, Aguiar (2012) [1], justificou o aumento da biomassa à interação positiva entre planta e microrganismos.

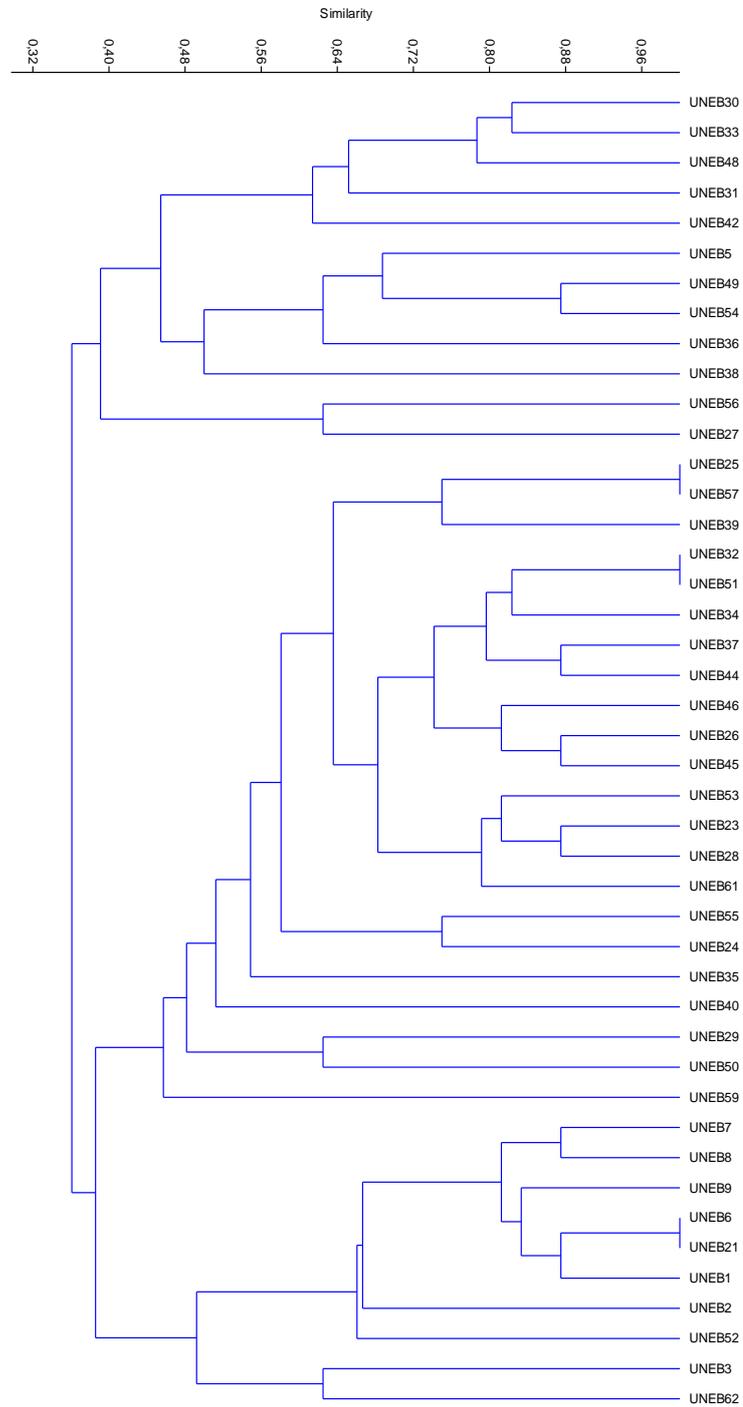


Figura 1. Dendrograma das características culturais de rizobactérias obtidas da rizosfera de Cucurbitáceas.

Tabela 1. Avaliação de crescimento de plântulas de melancia inoculadas com bactérias promotoras de crescimento.

ISOLADOS	CPA(cm)	CR (cm)	MSPA (mg)	MSR (mg)
UNEb 01	14.62d	8.97b	104.80c	21.80c
UNEb 02	14.46d	9.45b	83.00d	11.60c
UNEb 03	14.33d	9.21b	121.90b	16.60c
UNEb 05	19.38a	10.46a	169.40a	20.30c
UNEb 06	14.05d	10.05a	107.40c	13.20c
UNEb 07	16.25c	9.22b	114.10c	16.80c
UNEb 08	12.75e	8.26b	94.80c	13.50c
UNEb 09	15.98c	10.94a	118.20c	11.70c
UNEb 21	13.45d	8.75b	100.10c	11.10c
UNEb 23	15.67c	9.30b	107.40c	14.10c
UNEb 24	15.03c	8.80b	103.90c	18.60c
UNEb 25	14.35d	8.43b	112.00c	12.70c
UNEb 26	14.18d	11.23a	109.20c	20.50c
UNEb 27	16.52b	9.08b	129.20b	25.50b
UNEb 28	16.12c	7.48b	115.20c	20.80c
UNEb 29	15.30c	8.67b	123.00b	15.90c
UNEb 30	12.71e	9.36b	95.10c	13.40c
UNEb 31	15.23c	8.25b	105.60c	12.90c
UNEb 32	15.26c	9.82a	96.40c	13.60c
UNEb 33	15.16c	9.45b	102.20c	13.90c
UNEb 34	13.47d	9.66a	83.60d	13.30c
UNEb 35	14.92c	9.89a	87.00d	46.40a
UNEb 36	15.77c	7.76b	112.10c	12.60c
UNEb 37	12.85e	8.37b	78.00d	10.10c
UNEb 38	15.79c	8.12b	115.20c	12.70c
UNEb 39	13.30d	10.1a	95.80c	26.00b
UNEb 40	14.09d	8.58b	106.40c	18.90c
UNEb 42	12.68e	9.04b	69.70d	12.60c
UNEb 44	15.60c	9.80a	138.70b	19.80c
UNEb 45	12.86e	9.34b	82.30d	14.90c
UNEb 46	15.23c	8.85b	133.30b	16.20c
UNEb 48	16.16c	9.16b	148.10a	20.20c
UNEb 49	15.57c	8.94b	96.40c	14.60c
UNEb 50	15.05c	9.42b	98.30c	11.00c
UNEb 51	10.25f	7.11b	66.70d	12.30c
UNEb 52	14.00d	8.73b	103.70c	12.50c
UNEb 53	16.84b	10.7a	155.70a	22.20c
UNEb 54	13.07e	7.95b	94.60c	13.10c
UNEb 55	15.89c	11.9a	171.40a	31.60b
UNEb 56	14.90c	8.62b	100.40c	18.40c
UNEb 57	17.44b	10.2a	127.10b	15.40c
UNEb 59	14.17d	8.45b	88.20d	17.00c
UNEb 61	15.38c	8.48b	114.80c	30.20b
UNEb 62	14.80c	11.2a	115.80c	25.80b
TESTEMUNHA	13.54d	9.39b	96.20c	14.10c
CV%	12.82	20.74	33.41	32.44

CPA = comprimento da parte aérea; CR = comprimento da raiz MSPA = massa seca parte aérea; MSR = massa seca da raiz.
Médias na coluna seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Contudo, além de apresentar efeito benéfico, as bactérias também podem estar envolvidas em processos que desestabilizam o desenvolvimento e a produção, sendo consideradas deletérias ou prejudiciais. Dessa forma, Assumpção et al. (2009) [5], trabalhando com inoculação de bactérias em sementes de soja analisaram alguns isolados que apresentaram efeito deletério em algumas das variáveis. Da mesma forma, nesta pesquisa, 16% dos isolados tiveram efeito deletério na variável Comprimento da Parte Aérea (CPA) e 18,2% na Massa Seca Parte Aérea (MSPA), comparados à testemunha, porém nas variáveis Comprimento da Raiz (CR) e Massa Seca da Raiz (MSR) não houve esse efeito em nenhum dos isolados.

Considerando as variáveis analisadas, os isolados UNEB 05, UNEB 27, UNEB 53 e UNEB 57 promoveram os maiores incrementos no CPA, porém o UNEB 55 se destacou em todas as variáveis, portanto, estes isolados podem ser considerados promotores de crescimento em melancia. Os mecanismos usados pelas bactérias para beneficiar o desenvolvimento das plantas são citados por vários autores [14, 9], todavia, a capacidade de produzir fitormônios é amplamente distribuída entre os microrganismos do solo. Cerca de 80% das bactérias isoladas da rizosfera são produtoras de AIA [24], que é uma das principais auxinas fisiologicamente ativas de importância para crescimento e desenvolvimento vegetal [30]. Diante disto, Gray & Smith (2005) [14] afirmam que a produção dos fitormônios (auxinas, giberelinas e citocininas) é o mecanismo mais encontrado na promoção de crescimento em plantas por bactérias promotoras de crescimento vegetal.

4. CONCLUSÃO

Os 44 isolados bacterianos formaram 29 grupos distintos com 80% de similaridade comprovando a diversidade fenotípica da microbiota do solo de cultivo das cucurbitáceas.

O isolado UNEB 55, UNEB 05, UNEB 27, UNEB 53 e UNEB 57 podem ser considerados como promotores de crescimento em melancia.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguiar KP. Prospecção de bactérias promotoras do crescimento vegetal associadas a vermicompostos. [Dissertação]. Campos dos Goytacazes (RJ): Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; 2012. 100 p.
2. Antoun H, Beauchamp CJ, Goussard N, Chabot R, Lalende R. Potential of Rhizobium and Bradyrhizobium species as plant growth promoting rhizobacteria on no-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant and Soil*. 1998 Jul;204(1):57-67, doi: 10.1023/A:1004326910584.
3. Araujo FF. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis* formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de Milho, soja e algodão. *Ciência e Agrotecnologia*. 2008 Mar/Abr;32(2):456-462, doi: 10.1590/S1413-70542008000200017.
4. Asghar H, Zahir Z, Arshad M, Khaliq A. Relationship *in vitro* production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. *Biology and Fertility of Soils*. 2002 Jun;35(4):231-237, doi: 10.1007/s00374-002-0462-8.
5. Assumpção LC, Lacava PT, Dias ACF, Azevedo JL, Menten JOM. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 2009 Mai;44(5):503-510,doi: 10.1590/S0100-204X2009000500010.
6. Carvalho, FCQ, Karasawa M, Paz CD. Influência de bactérias promotoras de crescimento de plantas no rendimento de melancia. *Cultivar HF*. 2010 Mar;60:17-19.
7. Compant S, Clément C, Sessitsch A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology & Biochemistry*. 2010 Mai;42(5):669-678, doi: 10.1016/j.soilbio.2009.11.024.
8. Custódio CC, Araújo FF, Ribeiro AM, Filho NVS, Machado-Neto NB. Seed treatment with *Bacillus subtilis* or indol butyric acid: germination and early development of bean seedlings. *Interciência*. 2013 Abr;38(4):273-274,doi: 0378-1844/13/04/273-07.

9. Dashti N. Plant growth promoting rhizobacteria accelerate nodulation and increase nitrogen fixation activity by field grown soybean (*Glycine max* (L.) Merr) under short season conditions. *Plant and Soil*. 1998 Abr;200(2):205-213, doi: 10.1023/A:1004358100856.
10. El-khawas H, Adachi K. Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. *Biology and Fertility of Soils*. 1999 Feb; 28(3):377-381, doi: 10.1007/s003740050507.
11. Ferreira DF. SISVAR: A computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*. 2011; 35(6): 1039-1042, doi: 10.1590/S1413-70542011000600001.
12. Ferreira EPB, Knupp AM, Martin-Didonet CCG. Crescimento de cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) Influenciado pela inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas. *Bioscience Journal*. 2014 Mai/Jun;30(3):655-665.
13. Gírio LAS, Dias FLF, Reis VM, Urquiaga S, Schultz N, Bolonhezi D, Mutton MA. Bactérias promotoras de crescimento e adubação nitrogenada no crescimento inicial de cana-de-açúcar proveniente de mudas pré-brotadas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 2015 Jan;50(1):33-43, doi: 10.1590/S0100-204X2015000100004.
14. Gray EJ, Smith DL. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*. 2005 Mar; 37(3):395-412, doi: 10.1016/j.soilbio.2004.08.030
15. Hammer ϕ , Harper DAT. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and data Analysis. *Paleontologia Eletrônica*. 2001. 9 p.
16. Lima AST. Maximização da fixação biológica do N₂ pela interação BPCPs x rizóbios x FMA no Caupi [Dissertação]. Recife (PE): Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2009. 57 p.
17. Lucon CMM, Akamatsu MA, Harakava R. Promoção de crescimento e controle de tombamento de plântulas de pepino por rizobactérias. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 2008 Mai;43(6):691-697, doi: 10.1590/S0100-204X2008000600004.
18. Mariano RLR, Silveira EB (Coords.) Manual de práticas em Fitobacteriologia. 2 ed. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2005. 184 p.
19. Mariano RLR, Silveira EB, ASSIS SMP, Gomes AMA. Nascimento ARP, Donato VMTS. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*. 2004;1:89-111.
20. Melo IS, Azevedo JL. Ecologia Microbiana. Jaguariúna. EMBRARA- CNPMA, 1998. Capítulo 3, Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas: Descrição de Potencial de Uso na Agricultura; p. 86-116.
21. Miransari M. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and soil bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011 Feb;89(4):917-930, doi: 10.1007/s00253-010-3004-6.
22. Moreira FMS, Siqueira JO, Brussaard L. Biodiversidade do Solo em Ecossistemas Brasileiros. Lavras: UFLA; 2008. 798 p.
23. Rodrigues AC, Antunes JEL, Medeiros VV, Barros BGF, Figueiredo MVB. Resposta da co-inoculação de Bactérias Promotoras de Crescimento em plantas e *Bradyrhizobium* sp. em Caupi. *Bioscience Journal*. 2012. Mar; 28(1):196-202.
24. Sahasrabudhe M. Screening of rhizobia for indole acetic acid production. *Annals of Biological Research*. 2011 Abr;2(4):460-468.
25. Santos Júnior WE, Carvalho MRM, Cabral CS, Reis A. Seleção de Híbridos e Acessos de Tomate para Resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* Raça 3. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento*. Brasília: Embrapa Hortaliças. 2009. 19 p.
26. Shaharoon B, Zahir ZA, Khalid A. Performance of *Pseudomonas* spp. Containing ACC- deminase for improving growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in the presence of nitrogenous fertilizer. *Soil Biology and Biochemistry*. 2006 Set; 38(9):2971-2975, doi: 10.1016/j.soilbio.2006.03.024.
27. Silveira APD, Freitas SS (Ed.). Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental. Campinas - SP: Instituto Agronômico; 2007. 317 p
28. Souza VCD, Silva RAD, Cardoso GD, Barreto AF. Estudos sobre fungos micorrízicos. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. 2006 Jul/Set;10(3):612-618, doi: 10.1590/S1415-43662006000300011.
29. Stephan A, Meyer AH, Schmid B. Plant diversity affects culturable soil bacteria in experimental grassland communities. *Journal of Ecology*. 2000 Dez; 88(6):988-998, doi: 10.1046/j.1365-2745.2000.00510.x.
30. Taiz L, Zeiger E. *Fisiologia Vegetal*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed. 2009. 722 p.

31. Xavier GR, Martins LMV, Ribeiro JRA, Rumjanek NG. Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão-caupi de diferentes nacionalidades. *Revista Caatinga*. 2006 Jan/Mar;19(1):25-33.
32. Zahran HH. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1999 Dez;63(4):968-989.