



Francisco Mirador Fernandes

Seleção de *Mesorhizobium spp.* para crescimento a baixa temperatura

Orientador: Prof. Doutor Luís M. Vieira Alho

*Dissertação submetida à Universidade de Évora
para obtenção do grau de Mestre em Qualidade e Gestão do Ambiente*

Évora, 2012

“Esta dissertação inclui as sugestões feitas pelo júri.”



Francisco Mirador Fernandes

Seleção de *Mesorhizobium spp.* para crescimento a baixa temperatura

Orientador: Prof. Doutor Luís M. Vieira Alho

*Dissertação submetida à Universidade de Évora
para obtenção do grau de Mestre em Qualidade e Gestão do Ambiente*

Évora, 2012

Resumo

Seleção de *Mesorhizobium spp.* para crescimento a baixa temperatura

Técnicas laboratoriais e de estufa foram utilizadas no sentido de selecionar, de entre 42 isolados de *Mesorhizobium spp.*, os que tinham capacidade para crescimento e nodulação em grão-de-bico (*Cicer arietinum L.*), a baixa temperatura (12°C), verificou-se uma grande variação nesta capacidade. Os tempos de duplicação variaram entre as 15 horas e as 178 horas. A formação de nódulos a 12°C mostrou-se relacionada com o tempo médio de duplicação (TD) das estirpes ensaiadas a esta temperatura. A estirpe S15, com TD de 15 horas foi a que produziu mais nódulos por planta. Do conjunto de estirpes ensaiadas para nodulação a baixa temperatura (12°C), verificou-se que a um TD superior a 31 horas a formação de nódulos não ocorreu até 48 dias após inoculação (DAI). Foi possível evidenciar a importância da temperatura no tempo necessário para a formação de nódulos. A inoculação da estirpe *M. ciceri* em grão-de-bico a crescer à temperatura ambiente na raiz ($\approx 25^\circ\text{C}$) desenvolveu nódulos visíveis 12 DAI enquanto, que a 12°C apenas se observaram nódulos visíveis aos 28 DAI. Discutem-se os impactos da cultura de leguminosas em comparação ao uso de fertilizantes azotados, enquadrando a importância da seleção de rizóbios para crescimento a baixa temperatura como forma de incrementar a produção de grão-de-bico de sementeira Outono/Invernal.

Abstract

***Mesorhizobium spp.* selections for low temperature growth**

Laboratory and greenhouse experiments were conducted in order to select, among 42 isolates of *Mesorhizobium spp.*, the ability to growth and nodulate chickpea (*Cicer arietinum L.*) at low temperature (12°C). A wide variation in this capacity was detected. The mean doubling times varied between 15 hours and 178 hours. At 12°C nodulation was related to the average doubling time (TD) of the strains tested at this temperature. Strain S15, with a TD value of 15 hours produced a higher number of nodules per plant. The strains tested for nodulation at low temperature (12°C), revealed that with TD's values higher than 31 hours, nodulation did not occur 48 days after inoculation (DAI). It was possible to demonstrate the importance of root temperature in the time required for nodule formation. The inoculation of the strain *M. ciceri* in chickpea grown at room temperature ($\approx 25^{\circ}\text{C}$) developed visible nodules 12 DAI, while at 12°C visible nodules were only observed 28 DAI. The impact of legume crops in contrast with the use of nitrogen fertilizers is discussed, stressing the importance of rhizobia selected for growth at low temperature in order to increase the production of autumn / winter seeded chickpea.

Nota Prévia

A dissertação apresentada está estruturada de acordo com o formato, usualmente utilizado no âmbito das normas da Universidade de Évora. É apresentada por capítulos.

- Capítulo 1 apresenta a introdução;
- Capítulo 2 apresenta os objetivos;
- Capítulo 3 apresenta os materiais e métodos;
- Capítulo 4 e 5 apresenta os resultados e a discussão;
- Capítulo 6 apresenta uma revisão do balanço do azoto no ecossistema, incorporado sob a forma químico-industrial e biológica;
- Capítulo 7 apresenta as considerações finais;
- Capítulo 8 apresenta-se a bibliografia, seguida dos anexos.

De referir ainda, que a dissertação seguiu o modelo do Novo Acordo Ortográfico.

Agradecimentos

Mais um ciclo académico termina! Gostaria de agradecer às pessoas que de um modo positivo, contribuíram para que este passo se concretizasse.

Como a formação se constrói ao longo da vida, quero agradecer:

Aos meus pais e irmãos, pelo apoio que me deram, proporcionando a minha formação, ao longo de todo este tempo. A integração efetiva no trabalho e no desenvolvimento da minha pessoa, através de boas indicações e boas práticas na vida. A insistência e persistência são valores que me transmitiram.

Aos meus colegas de Mestrado, que me acompanharam, ao longo destes dois últimos anos, pela convivência, unidade de grupo e produção nas atividades letivas.

À equipa do Laboratório de Microbiologia do Solo, da Universidade de Évora, pelo acolhimento, por me ajudarem sempre que necessitei e pela partilha de conhecimentos.

À Dr.^a Ana Alexandre, que me cedeu material “*in vivo*” para o meu trabalho e pela sua simpatia.

À Dr.^a Marta Laranjo pela sua integridade e método.

À Professora Solange pela sua boa disposição.

À Clarisse Brígido, ao Francisco Nascimento e Rodrigo Abreu, pelos momentos alegres que proporcionaram nos “*coffe breaks*”.

À Gertrudes Mariano, pela sua disponibilidade e apoio.

Ao Carlos Vila-Viçosa pela amizade e disponibilidade em ceder bibliografia sobre Clima.

Às pessoas do Laboratório de Nematologia pela convivência.

Às pessoas do Laboratório de Fitopatologia que me prestaram apoio logístico.

Quero agradecer, especialmente ao meu orientador, Professor Doutor Luís Alho, pelo acolhimento no projeto. A sua boa disposição e simpatia geraram um clima coeso no trabalho. Ao seu empenho, no planeamento dos ensaios e execução do projeto e pelas muitas horas de envolvimento neste trabalho.

Sendo a pedra basilar a família, quero dedicar todo o meu esforço deste trabalho, à minha família, em especial, aos meus avós.

Índice

Resumo	i
Abstract	ii
Nota Prévia	iii
Agradecimentos	iv
Índice	vi
Lista de figuras	viii
Lista de tabelas	ix
Abreviaturas	x

1. Introdução

1.1. Importância do Azoto e da simbiose rizóbio-leguminosa	1
1.2. As bactérias rizóbio- Caracterização	2
1.3. Leguminosas- Caracterização	3
1.3.1. Grão-de-bico (<i>Cicer arietinum</i> L.)	4
1.4. Fatores abióticos e bióticos que afetam a cultura de Grão-de-bico	5
1.5. Caracterização do clima mediterrânico	6
1.5.1. Macroclima Mediterrâneo	6
1.5.2. Caracterização Climática de Portugal Continental	7
1.6. Especificidade rizóbio-leguminosa	9
1.7. Efeito da Temperatura na raiz, nos processos de infeção e nodulação	10
1.8. Crescimento bacteriano	12

2. Objetivos

3. Material e Métodos

3.1. Crescimento das bactérias “ <i>in vitro</i> ”, a 12 ° C e a 25 ° C	16
3.1.1. Preparação das placas “ELISA”	16
3.2. Análise e tratamento de resultados	20
3.3. Inoculação dos isolados <i>Mesorhizobium</i> spp. no grão-de-bico	20
3.3.1. Esterilização e Germinação das sementes	21
3.3.2. Quantificação de concentração dos diversos isolados para inoculação	21

3.4. Ensaio de crescimento de plantas para nodulação a 12° C.....	22
3.5. Resistência Intrínseca a Antibióticos	24
3.6. Ensaio de competição de estirpes para nodulação a 12° C	25
3.7. Ensaio de crescimento de plantas para nodulação com substrato (vermiculite)	25
3.7.1. Preparação do substrato	25
3.7.2. Inoculação de isolados <i>Mesorhizobium</i> spp., no grão-de-bico	25
3.8. Análise dos resultados	26
4. Resultados	
4.1. Velocidade de crescimento das bactérias “ <i>in vitro</i> ”, a 12° C	27
4.2. Comparação dos Tempos médios de Duplicação (horas) das estirpes a 12° C e a 25° C	31
4.3. Inoculação de isolados <i>Mesorhizobium</i> spp., no grão-de-bico	34
4.3.1. Quantificação da concentração dos diferentes isolados para inoculação	34
4.4. Ensaio de crescimento de plantas para nodulação a 12° C	35
4.4.1. Número de nódulos obtidos	35
5. Discussão	39
6. Balanço do azoto no ecossistema incorporado sob a forma químico-industrial e biológica	43
7. Considerações Finais (Perspetivas)	50
8. Bibliografia	52

Anexos

Lista de Figuras

Figura 1: Temperaturas médias de ar, da relva e do solo ao longo do ano. Média de 3 anos (2006, 2007 e 2008)	9
Figura 2: Curva de crescimento de <i>M. ciceri</i> a 12°C	13
Figura 3: Representação esquemática da inoculação de estirpes de bactérias em placas “ELISA”	17
Figura 4: Método de inoculação em tubos “Falkon” para pré-inoculação a 12°C e subsequente germinação em hidroponia.....	22
Figura 5: Raiz nodulada aos 48 DAI com crescimento a 12°C	23
Figura 6: Imagem do ensaio de crescimento de plantas para nodulação a 12°C	24
Figura 7: Crescimento das estirpes ao 4º dia	30
Figura 8: Tempos médios de duplicação das estirpes estudadas a 25°C em comparação com as mesmas estirpes a 12°C	32
Figura 9: Relação entre as 17 estirpes estudadas a 12°C	32
Figura 10: Relação entre 14 estirpes estudadas a 12°C	33
Figura 11: Relação entre as estirpes 93 Évora, a EE7EN e a <i>M. ciceri</i> a 12°C	34
Figura 12: Número médio de nódulos por planta ao 28 DAI, 41 DAI e 48 DAI e tempos médios de duplicação das estirpes selecionadas (horas) para o ensaio de crescimento de plantas para nodulação a 12°C	38

Lista de Tabelas

Tabela 1: Normais Climatológicas para a localidade de Évora correspondente a 1951-1980 (mapa Ombrotérmico)	8
Tabela 2: Isolados <i>Mesorhizobium</i> spp., com origem, número de plasmídeos, cluster filogenético a que pertencem, eficiência simbiótica (ES) e respetiva referência bibliográfica	19
Tabela 3: Isolados selecionados para inoculação no grão-de-bico	21
Tabela 4: Concentração das soluções “stock” de cada antibiótico usado na determinação da resistência intrínseca de estirpes	24
Tabela 5: Parâmetros de crescimento dos isolados durante o microcultura em ML a 12°C	29
Tabela 6: Parâmetros de crescimento dos isolados durante o microcultura em ML a 25°C	31
Tabela 7: Absorvância e nº de células por mililitro de 8 estirpes para inoculação no grão-de-bico	34
Tabela 8: Número de nódulos obtidos de 11 tratamentos Dados obtidos aos 12, 21, 28, 41 e 48 DAI	35
Tabela 9: Isolados do ensaio de crescimento a 12°C e Tempo médio de duplicação (h) .	36
Tabela 10: Intervalo de variação da proporção e quantidade de N2 estimado experimentalmente dos principais legumes	48

Abreviaturas

ABS- Absorvância

μ Max- Crescimento Máximo

Δ OD- Variação da Densidade Ótica

“Curling”- Enrolamento do pelo da raiz

DAI- Dias Após Inoculação

“ELISA”- Enzime-linked immunosorbent assay

etOH- Etanol

ES- Eficiência Simbiótica

FBN- Fixação Biológica de Azoto

IAA- Ácido Indol Acético

H₂O- Água

L-litro

mg- Miligramas

ML- Meio de Manitol-Levedura

MLA- Meio de Manitol-Levedura-Agar

ml- Mililitro

PBS- Tampão Fosfato

N- Azoto

n.d.- não determinado

Ni- Não inoculado

OD- Densidade Ótica

r- Coeficiente de correlação

r²- Coeficiente de determinação

TD ou Dt- Tempo de duplicação

Tg- Terograma

1. Introdução

1.1. Importância do Azoto e da simbiose rizóbio-leguminosa

O azoto é um nutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Práticas de cultura intensiva, que alcançam altos rendimentos, requerem fertilizantes químicos que, para além de caros do ponto de vista económico, constituem um fator de insustentabilidade ambiental. O uso extensivo de fertilizantes químicos está atualmente em debate, devido à crescente preocupação ambiental. Como consequência tem havido um aumento do interesse por práticas agrícolas sustentáveis como a agricultura biológica (Rigby e Caceres, 2001; Alexandre *et al*, 2006, Lee e Song, 2007, Ogutçu *et al*, 2008).

O interesse crescente pelos organismos fixadores de azoto (N_2) está relacionado com o azoto ser, frequentemente, o fator limitante na produção agrícola. O uso excessivo de fertilizantes azotados está associado a severos problemas de poluição ambiental, pelo que a utilização de organismos fixadores de N_2 , em particular os que desenvolvem a simbiose entre as plantas leguminosas (como o grão-de-bico) e bactérias vulgarmente conhecidas como rizóbio, assumem um papel importante.

O grão-de-bico é a terceira leguminosa mais consumida no mundo, tendo no passado tido grande importância agrícola em Portugal, mas cuja utilização e rendimento tem vindo a diminuir nas últimas décadas, como resultado de fatores políticos e sociais (Alexandre *et al*, 2006).

Em sistemas agrícolas, a simbiose rizóbio-leguminosas, é a mais importante fonte de azoto biologicamente fixado (Kahindi *et al*, 1997). A fixação biológica de azoto é, uma alternativa sustentável à fixação de azoto industrial, que está associada a vários problemas ambientais (Date e Ratcliff, 1989, Poustini *et al*, 2005).

A simbiose rizóbios com espécies leguminosas, é de especial importância global, produzindo 50% dos 175 milhões de toneladas do total de fixação biológica de azoto anualmente em todo o mundo (Sario.lu *et al*, 1993; Ogutçu *et al*, 2008). No

entanto apresenta-se sensível a algumas restrições ambientais (Hungria Bohrer, 2000; Junior Lira *et al*, 2004).

A FBN é ecologicamente benigna e, alargar a sua exploração, pode reduzir o uso de combustíveis fósseis sendo útil na reflorestação e na recuperação de terras para a produtividade (Burris, 1984; Sprent, 1990). Atualmente, o tema da FBN é de grande importância prática, porque o uso de fertilizantes azotados, resultou em níveis inaceitáveis de poluição da água (concentrações crescentes de nitratos tóxicos no abastecimento de água potável) e a eutrofização de lagos e rios (Dixon e Weeler, 1986; Sprent, 1990, Al-Sherif, 1998). Além disso, enquanto FBN pode ser adaptado às necessidades do organismo, a adição de azoto industrial é em geral aplicado em doses grandes, e até 50% deste pode ser lixiviado (Sprent, 1990). Isto não só é desperdício de energia e dinheiro, mas também leva a sérios problemas de poluição, particularmente em reservatórios de água.

As leguminosas são uma importante fonte de proteínas na alimentação humana e animal e desempenham um papel fundamental nas rotações de culturas em muitas partes do mundo. Quando cultivadas em rotação com outras culturas, podem melhorar a fertilidade do solo e reduzir a incidência de ervas daninhas, doenças e pragas (Mwanamwenge *et al*, 1998, Romdhane, 2007).

1.2. As bactérias rizóbio- Caracterização

Rizóbios são bactérias do solo, que pertencem à subdivisão alfa, das Proteobacterias, com capacidade de estabelecer simbiose com leguminosas. Essas simbioses, que envolvem fixação atmosférica do azoto, têm impacto sobre a agricultura em todo o mundo, aumentando a produtividade das culturas, sem adição de fertilizantes e conseqüente diminuição da poluição (Freiberg *et al*, 1997, Laranjo *et al*, 2001).

Rizóbios com capacidade de nodular o grão-de-bico têm sido descritos (Cadahi'a *et al*, 1986) e mais recentemente foram incluídos no género Mesorhizobium (Jarvis *et al*, 1997). Duas espécies foram identificadas: *M. ciceri* (Nour *et al* 1994), *M. mediterraneum* (Nour *et al* 1995; Laranjo *et al*, 2002). No entanto, nos últimos anos,

várias espécies de bactérias têm sido descritas por nodularem grão-de-bico com diferentes graus de eficiência simbiótica (Aouani *et al*, 2001; Kantar *et al*, 2003; Laranjo *et al*, 2004; Ben Romdhane *et al*, 2007a, b; Rivas *et al*, 2007, Romdhane, 2009).

Os rizóbios formam uma associação endossimbiótica na raiz de leguminosa capaz de realizar fixação de azoto. Estas bactérias colonizam células vegetais dentro de nódulos da raiz, estas convertem o azoto atmosférico em amónia e, em seguida, fornecem compostos orgânicos azotados, tais como glutamina ou ureia para a planta. A planta fornece às bactérias, compostos orgânicos produto da fotossíntese.

1.3. Leguminosas – Caracterização

As leguminosas, fazem parte de um conjunto de espécies, que pertencem à família *Fabaceae*, também conhecida como *Leguminosae*. Possuem uma ampla distribuição geográfica e, embora existam algumas exceções, uma característica típica desta família, é a presença de frutos em forma de vagem. Esta família é constituída por 430 géneros e cerca de 12 600 espécies e encontra-se dividida em três subfamílias, sendo a subfamília Faboideae considerada a mais importante do ponto de vista económico. O grão-de-bico, a ervilha, a fava, a lentilha, o feijão e o feijão-frade são exemplos de espécies desta subfamília, as quais são interessantes pelo conteúdo nutricional, são pobres em gordura e são excelentes fontes de proteína, fibra dietética, e uma variedade de micronutrientes e fitoquímicos. As leguminosas desempenham um papel importante nas dietas tradicionais de várias regiões em todo o mundo (Messina, Mark, 1999).

As leguminosas têm demonstrado a sua importância agrícola ao longo de milhares de anos, começando-se com a domesticação de lentilhas (*Lens esculenta*) no Irão, que datam 9.500 a 8.000 anos atrás, a sua utilização como fonte de alimento durante a pré-história da América do Norte e do Sul (feijão, mais de 3.000 anos atrás), e o seu uso pelo Império Romano como fonte de alimento e para a melhoria do solo (Graham e Vance, 2003). Estas são hoje cada vez mais uma fonte de alimento de valor inestimável não só para os seres humanos, sendo responsável por 27% da produção mundial de cultura principal, mas também para servir de ração para animais de criação (Graham e Vance, 2003). As leguminosas foram cultivadas em mais de 13% do total da

terra arável cultivada no mundo em 2004 (Gepts *et al*, 2005). As leguminosas de grão contribuem em 33% das necessidades de proteína na dieta dos seres humanos, enquanto a soja (*Glycine max*) e amendoim (*Arachis hypogaeae*) fornecem mais de 35% de óleo vegetal e mostra-se uma rica fonte de proteína dietética para a produção industrial de aves e suínos (Graham e Vance, 2003).

Muitas leguminosas formam nódulos de raiz para fixar azoto atmosférico numa relação simbiótica com as bactérias do solo, vulgarmente conhecidas como rizóbios. As leguminosas são extremamente versáteis para nodularem, mas nem todas as espécies possuem essa capacidade e há uma grande variedade de nódulos que se formam, dependendo da espécie em simbiose. Além dos seus usos, como alimento, as leguminosas ainda são usadas como ferramentas na agricultura e silvicultura. As próprias plantas ou produtos vegetais como folhas e vagens podem integrar-se no solo na sua forma residual como fonte de azoto ou podem servir nas rotações de culturas para a melhoria do solo. Estas técnicas são sustentáveis pois os agricultores, dispõem de um custo muito elevado de fertilizantes azotados (Graham e Vance, 2003).

Industrialmente, as leguminosas têm muitos usos na fabricação de plásticos biodegradáveis, óleos, corantes e combustíveis e biodiesel. Estas plantas são utilizadas tradicionalmente na medicina popular, mas também demonstram grande importância na medicina moderna. Isoflavonas, comumente encontradas em leguminosas estão a ser estudadas como agentes quimio terapêuticos no tratamento do cancro. Para além disso diminuem o colesterol e os fitoestrógenos da soja estão em investigação para uso em terapia de reposição hormonal na pós-menopausa (Graham e Vance, 2003). Também produzem um efeito hipoglicemiante às quais, fazem parte de dieta, tornando-os um alimento recomendado para diabéticos (Gepts *et al*, 2005).

1.3.1. Grão-de-bico (*Cicer arietinum L.*)

O grão-de-bico é uma proteagínosa que desempenha um importante papel na alimentação humana, como suplemento das necessidades em proteína, constituindo uma excelente fonte deste elemento nutritivo na dieta de muitos povos. As sementes de grão-de-bico constituem um alimento energético e uma fonte de proteína para

alimentação humana, principalmente nos países em desenvolvimento (Esfahani *et al*, 2010). O grão-de-bico, é uma das principais culturas de leguminosas em todo o mundo. É cultivada em grande escala em ambientes áridos e semiáridos, e tem considerável importância como alimentos, rações e forragens (Singh, 1997, Romdhane, 2007).

Portugal é um país deficitário em grão-de-bico, embora seja cultivado praticamente um pouco por todo o País, exceto nas regiões húmidas do norte e centro litoral e nas terras mais altas das Beiras. O Alentejo é a principal região produtora, com quase metade da produção nacional, contribuindo Trás-os-Montes com cerca de 12% da produção nacional. (Tavares de Sousa, 1989).

A maior tolerância do grão-de-bico à secura, comparativamente com outras espécies anuais mediterrânicas, e a recente seleção de variedades adaptadas à sementeira de Outono/Inverno, permite produções superiores, relativamente às de sementeira de Primavera, assim, fazem com que esta seja uma cultura promissora e alternativa para os sistemas agrícolas praticados em diferentes regiões do país.

1.4. Fatores abióticos e bióticos que afetam a cultura de grão-de-bico

Os três principais fatores que afetam a cultura do grão-de-bico, tradicionalmente cultivado em condições de Primavera-Verão são, a *Ascochyta rabiei* (doença da ferrugem), o bicho-mineiro (praga de insetos) e altas concentrações de sais devido à escassez de água (Nene e Reddy, 1987; Reed *et al*, 1987). Contudo, para antecipar a cultura de Primavera para Outono-Inverno, na qual se acrescenta o fator temperatura baixa como efeito adverso ao desenvolvimento da cultura, foram criadas variedades resistentes à doença da ferrugem e a pragas de insetos (fatores bióticos) e tolerantes ao frio (fator abiótico) (Sousa e Duarte, 1990).

As vantagens da sementeira Outono/Inverno permite obter substanciais acréscimos de rendimento, tendo em conta determinados pressupostos. O uso de cultivares ou linhas resistentes ou altamente tolerantes à *Ascochyta rabiei* e,

simultaneamente, tolerantes ao frio permite a sementeira outono-invernal (Sousa e Tavares, 1985).

O rendimento e a elevada eficiência do uso de água podem ser aumentados em 100% (Sousa e Tavares, 1985). Assim, a sementeira antecipada poderá estender a cultura a regiões marginais, para a sementeira tradicional de Primavera, onde os solos poderão ser mais ligeiros, não necessitando de uma tão elevada capacidade de retenção de água (Sousa e Duarte, 1990).

Outros fatores bióticos que afetam o grão-de-bico são a fusariose causada por *Fusarium oxysporum f.sp. ciceris*, podridão radicular seca causada por *Macrophomina phaseolina (Rhizoctonia bataticola)* e podridão do colo causada por *Sclerotium rolfsii*. O nematóide de galhas (*Meloidogyne javanica*) é um importante parasita de grão-de-bico. Pod broca (*Helicoverpa armigera*) e o verme de galha (*Agrotis ipsilon*) são comuns em insetos pragas de grão-de-bico no leste da África e da Índia.

De fatores abióticos temos ainda os parâmetros físico-químicos em que o solo se encontra, que podem criar constrangimentos ao crescimento do grão-de-bico, como são, o pH do solo, deficiência de nutrientes, toxicidade mineral, salinidade, a humidade do solo insuficiente ou excessiva, que pode conduzir a uma inadequada fotossíntese.

1.5. Caracterização do clima mediterrânico

O clima da Terra é classificado em 5 grandes tipos: tropical, mediterrâneo, temperado, boreal e polar (Rivas-Martínez, 2005). O Sul de Portugal Continental tem características de um clima Mediterrâneo (Ribeiro e Lautensach, 1988).

1.5.1. Macro bioclima Mediterrâneo

São considerados macro bioclimas Mediterrâneos, em qualquer altitude e valor da continentalidade, todos os territórios extratropicais da Terra pertencentes às cinturas eutemplada subtropicais (23 ° a 52 ° N e S), em que existem pelo menos dois meses consecutivos com aridez durante o período mais quente do ano, ou seja, onde o valor médio em milímetros de precipitação de dois meses do trimestre de verão mais

quente é inferior a duas vezes a temperatura média de dois meses mais quentes do trimestre de verão, expresso em graus Celsius ($P_{s2} < 2T_{s2}$), também nos territórios da cintura subtropical (23°S a 35°N), além dos regulamentados, sejam satisfeitas pelo menos dois dos três parâmetros e índices seguintes: valores inferiores á temperatura média 25 °C anual, temperatura média mínima do mês mais frio do ano 10 °C, ou um índice compensatório de termicidade 580 ($T < 25$ °, $m < 10$ °, $I_{tc} < 580$), entre os paralelos 23°-48° N e 23° -52° S.

O macro bioclima Mediterrâneo tem a sua maior representação territorial no centro e ocidente de todos os continentes, exceto na Antártida. Na Terra há 8 regiões biogeográficas onde se encontra este tipo de macroclima, nos continentes de África, Austrália, Polinésia, Eurásia, América do Norte e América do Sul (Rivas-Martínez S. 2005)

1.5.2. Caracterização Climática de Portugal Continental

À latitude de Portugal passa o limite entre dois grandes centros de ação da dinâmica da atmosfera, o anticiclone dos Açores e os fluxos de ar de Oeste. Durante o ano a localização destes centros oscila acompanhando o "movimento anual aparente do sol". No Inverno, as massas de ar polar marítimo podem descer aos 30° de latitude Norte. As massas de ar anticiclónicas subtropicais podem estacionar no nosso território por períodos longos durante o Verão, chegando a deslocarem-se aos 45° de latitude Norte. Na primeira situação ocorre precipitação e na segunda temos ausência de precipitação. Acresce ainda a localização do território do continente na fachada oceânica da Península.

Falando sobretudo da região Norte e Centro, às condições atrás descritas, juntamos o relevo. De Norte para Sul a quantidade de precipitação diminui devido à Cordilheira Central. O mesmo acontece de Oeste para Este em todo o Norte Português. A Barreira de Condensação impede a chegada dos ventos húmidos vindos de Oeste. Na vertente ocidental da Barreira de Condensação a precipitação total anual chega a atingir 3000 mm. Para Este desta Barreira a precipitação reduz-se consideravelmente, atingindo em Moncorvo apenas 500 mm anuais.

A insolação ou seja o número de horas de sol descoberto acima do horizonte varia conforme a região. As horas de sol nas montanhas do Minho são apenas 1800, aumentando à medida que se desce em latitude. A insolação é assim um elemento importante do clima.

No Verão encontramos situações semelhantes para quase todo o país, com exceção de uma pequena faixa no litoral Oeste, sobretudo Norte e Centro, em que as temperaturas médias mensais são iguais ou inferiores a 20° C. Para o interior Norte, mais propriamente a nordeste, o vale do douro e os seus principais afluentes, introduzem uma área quente e seca, atingindo frequentemente temperaturas variando entre os 30° C e 35° C.

No Inverno, todo o Norte é marcado por um tempo frio, sendo mais acentuado no Nordeste transmontano em que as temperaturas médias mensais são inferiores a 10°C, o que acontece de Novembro a Março. Os Invernos são então consideravelmente frios quando comparados com a estreita faixa litoral de temperatura mais moderada. Os anticlones de origem térmica são os grandes responsáveis pelas vagas de frio no Inverno.

A tabela seguinte apresenta as normais climatológicas para a localidade de Évora correspondente a 1951-1980, onde se verifica que na estação Invernal as temperaturas médias se situam num intervalo entre 9°C e os 12° C.

Tabela 1: Normais Climatológicas para a localidade de Évora correspondente a 1951-1980 (mapa Ombrotérmico) (T- temperaturas médias absolutas e P- precipitação média anual

	T (° C)	P (mm)
Jan	9,3	69,2
Fev	10,2	62,4
Març	11,9	64
Abr	14,1	44,8
Mai	17,6	30,2
Jun	21,2	21,3
Jul	24,2	3,2
Ago	24,1	1,7
Set	21,9	15,7
Out	17,6	65
Nov	12,8	64,7
Dez	9,8	69,6

A figura seguinte mostra que, entre os meses de Dezembro a Março, a temperatura do solo apresenta-se abaixo dos 10°C.

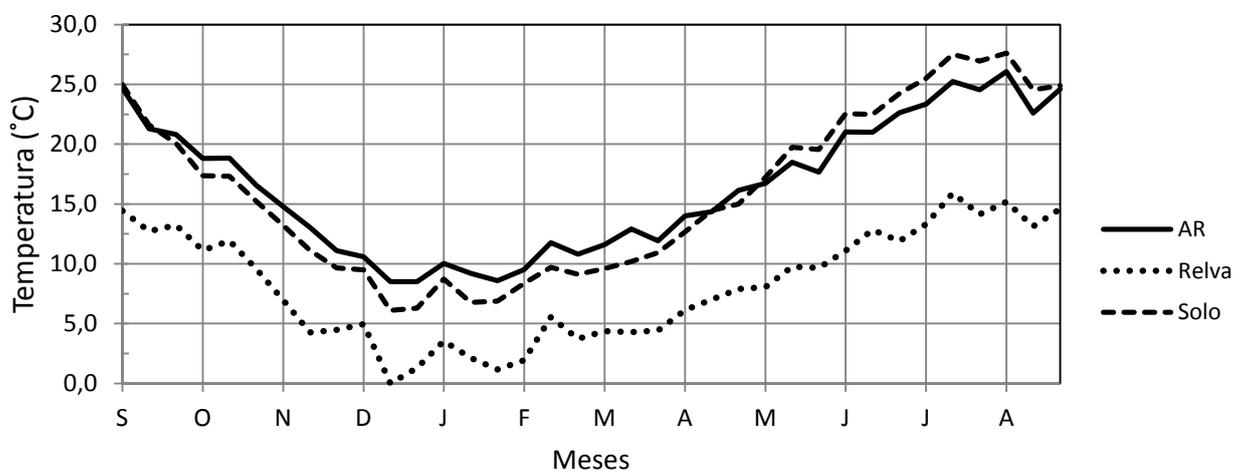


Figura 1: Temperaturas médias do ar, da relva e do solo ao longo do ano. Média de 3 anos (2006, 2007, 2008).

Fonte: Instituto de Meteorologia.

1.6. Especificidade rizóbio-leguminosa

O grão-de-bico (*Cicer arietinum L.*) é a terceira leguminosa de grão mais cultivada no mundo e constitui uma importante fonte de proteína (Somasegaran e Hoben, 1994; Alexandre *et al*, 2006). É uma cultura alternativa aos cereais, nas condições edafo-climáticas da região sul de Portugal. Recentemente, variedades melhoradas de grão-de-bico têm uso para cultura de Inverno, com maior potencial de rendimento em comparação com as variedades tradicionais de Primavera (Sousa e Duarte, 1990). No entanto, resultados recentes indicam que este maior potencial de rendimento é dependente das condições do local onde é cultivado (Laranjo *et al*, 2001).

Variedades melhoradas de grão-de-bico de Inverno foram adaptadas às condições de seca no Sul de Portugal (Duarte *et al*, 1992) e verifica-se, ser uma cultura interessante para sistemas de baixo custo agrícola (Laranjo *et al*, 2002).

O rizóbio que nodula o grão-de-bico é bastante específico na eleição de hospedeiro, encontram-se descritos alguns rizóbios com capacidade de nodular grão-de-bico entre os quais, *Mesorhizobium ciceri* (Nour *et al*, 1994) e *Mesorhizobium mediterraneum* (Nour *et al*, 1995). Nos últimos anos, várias espécies de bactérias, têm sido descritas, por serem capazes de nodular o grão-de-bico com diferentes graus de eficiência simbiótica (Aouani *et al*, 2001; Kantar *et al*, 2003; Laranjo *et al*, 2004; Ben Romdhane *et al*, 2007a, b; Rivas *et al*, 2007).

O grão-de-bico é cada vez mais semeado no Outono e não na Primavera. No entanto, as temperaturas baixas são consideradas um importante problema no grão semeado no Outono em países ao redor do Mar Mediterrâneo, nas terras altas tropicais, e nas regiões temperadas de cultura (Singh, 1993; Ogutçu *et al*, 2008).

Desde que as bactérias de rizóbio são um fator determinante na eficiência da fixação biológica de azoto a baixas temperaturas (Pankurst e Layzell 1984), a seleção destas, para adaptação ao frio, tem um bom potencial para melhorar a fixação simbiótica de azoto, demonstrado em vários estudos realizados em países de clima temperado (revisto por Prévost *et al*. 1999) (Prévost *et al*, 2004).

1.7. Efeito da Temperatura na raiz, nos processos de infeção e nodulação

Um modo comum de infeção das raízes das leguminosas por rizóbios é através os pelos radiculares. Em resposta aos exsudados libertados pela raiz, as bactérias multiplicam-se na rizosfera, sintetizam IAA, e causam o enrolamento dos pelos radiculares ou “curling”. A proporção desses pelos infetados, resulta do processo de infeção realizado pelas bactérias (Nutman, 1956; Sahlman e Fåhraeus, 1962; Higashi, Abe e Yanae, 1971). O processo de infeção, é uma sequência dirigida pelo núcleo do pelo radicular até á penetração no córtex. Assim, a entrada de rizóbios, através de aberturas criadas pelo surgimento de raízes laterais foi verificado no amendoim, *Arachis hypogaea* (Allen e Allen, 1940), e um modo semelhante de infeção, é proposto igualmente, para outros géneros, onde a nodulação é restrita às axilas das raízes laterais. O processo de infeção e nodulação, é muito influenciado pela temperatura a que a raiz se encontra, como é demonstrado por diversos estudos.

Lindemann e Ham (1979), observou que embora a temperatura na zona da raiz fosse o fator dominante de controlo da eficácia simbiótica e produtividade da soja, a nodulação e fixação do azoto atmosférico a uma dada temperatura, variava de acordo com o nº de bactérias presentes no inóculo e com a variedade de hospedeiro.

Um dos mais importantes constrangimentos ambientais para o desenvolvimento dos nódulos para o crescimento das leguminosas em zonas temperadas é a baixa temperatura, predominante durante o início da Primavera (Zang e Smith, 1994, Junior *et al*, 2004).

O crescimento das plantas depende da fixação de azoto que é mais dificultada pela baixa temperatura do solo do que plantas que receberam azoto (Abberton *et al*, 1998). Um dos efeitos da baixa temperatura do solo é o atraso na formação dos nódulos (Pan e Smith, 1998).

A baixa temperatura do solo, afeta a competitividade dos rizóbios para nodulação (Hardarson e Jones, 1979), retarda a infeção dos pelos radiculares (Gibson, 1971; Hafeez *et al*, 1995; Montanez *et al*, 1995; Serraj, 2003), a nodulação atrasa (Fyson e Sprent, 1982; Bordeleau e Prevost, 1994;), e a atividade dos nódulos é deprimida (Waughman, 1977; Ogutçu *et al*, 2008). No entanto, o rizóbio desempenha um papel importante na determinação da eficiência da fixação biológica de azoto a baixas temperaturas (Layzell *et al*, 1983; Pankurst e Layzell, 1984) e na variação existente, entre os rizóbios, em termos da capacidade de nodular, em condições de temperaturas baixas (Rupela e Kumar Rao, 1987). A maioria das bactérias isoladas de ambientes frios, são capazes de crescer e de mostrar anterior nodulação e maior atividade da nitrogenase a baixas temperaturas (Ek-Jander e Fahraeus, 1971; Nelson e Parkinson, 1978; Prevost *et al*, 1987^a; Ogutçu *et al*, 2008).

Roughley (1970) verificou, que o efeito inibitório de raiz a baixas temperaturas sobre a diferenciação dos bacteróides nos tecidos dos nódulos de *Trifolium subterraneum*, foi compensado pela inoculação com estirpes provenientes de ambientes frios (Linch e Smith, 1994).

A partir de estudos de efeitos sub-óptimos da temperatura da raiz na fixação de azoto atmosférico em soja e outras leguminosas subtropicais concluiu-se que, a baixa

temperatura na zona da raiz, há diminuição da nodulação e da atividade do nódulo. Matthews e Hayes mostraram que diminuindo a temperatura na zona da raiz de 25° C para 10°C resultou numa diminuição no crescimento dos nódulos e na fixação de azoto atmosférico (Zhang *et al*,1995).

Matthews e Hayes, (1982), mostraram que em áreas com temperaturas abaixo do ideal na zona da raiz, desde cedo na estação de crescimento, a fixação de azoto pelas leguminosas torna-se na maior limitação no rendimento das culturas assim como na fixação de azoto se torna mais sensível que o peso seco nessas condições (Date e Ratcliff, 1989). Temperaturas baixas na zona da raiz retardam a atividade da nitrogenase na fixação de azoto em soja (Zhang e Smith, 1995; Zhang *et al*, 1995, Poustini *et al*, 2005).

Temperaturas extremas afetam a fixação simbiótica de azoto severamente (Michiels *et al*, 1994; Hafeez *et al*, 1995;). A temperatura regula o metabolismo das bactérias (Vincent, 1977) e da planta (Delvin, 1975) bem como a associação bactéria-planta (Young, 2006). Os rizóbios diferem na sua capacidade de crescer, na nodulação das plantas hospedeiras e na expressão da atividade da enzima em temperaturas extremas (Naeem *et al*, 2008).

1.8. Crescimento bacteriano

Uma população bacteriana é composta por milhares de indivíduos em crescimento ativo multiplicando-se por fissão binária, podendo-se assumir que em condições ótimas, a cada geração a população duplica o seu tamanho.

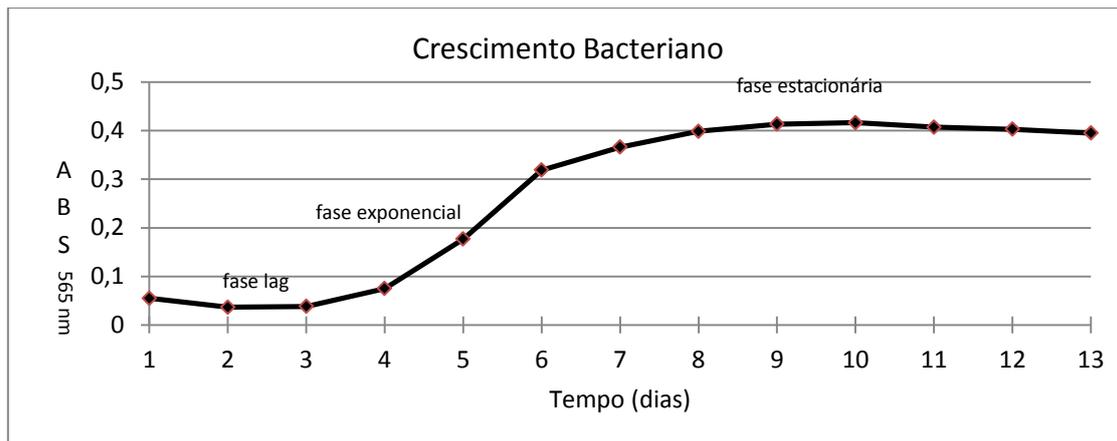


Figura 2: Curva de crescimento de *M. ciceri* a 12°C.

São normalmente descritas 4 fases para a curva de crescimento bacteriano, em ambiente fechado (Willey *et al*, 2009); a fase “lag” ou de adaptação, a fase exponencial, a fase estacionária e a fase de declínio, explicadas seguidamente:

- Fase “lag”

Fase de adaptação metabólica ao novo ambiente; o metabolismo celular está direcionado para sintetizar as enzimas requeridas para o crescimento nas novas condições ambientais encontradas pelas células.

O número de indivíduos não aumenta nesta fase, podendo até mesmo decrescer. A duração dessa fase depende das condições ambientais nas quais as células se encontravam anteriormente. A fase “lag” será tão mais longa quanto maiores as diferenças de composição do ambiente anterior ou se a população for constituído de bactérias esporuladas.

- Fase exponencial

Fase na qual o número de células da população dobra a cada geração. Esta taxa de crescimento não pode ser mantida indefinidamente em sistema fechado. Após um determinado período de crescimento exponencial, as condições ambientais tornam-se desfavoráveis pela escassez de nutrientes essenciais, acúmulo de metabólitos tóxicos e limitação de espaço. À medida que a disponibilidade de nutrientes diminui, as células tornam-se menos capazes de gerar ATP e a taxa de crescimento diminui. A duração da

fase exponencial, é altamente variável, dependendo tanto das características genéticas da bactéria, quanto das condições ambientais.

- Fase estacionária

Fase em que a taxa de crescimento diminui significativamente, devido às condições limitantes do meio. As células continuam-se a metabolizar e a se dividir, mas parte das células torna-se inviável e a taxa de divisão celular é muito próxima da taxa de morte celular, o que mantém constante o número de células viáveis na população. A curva de crescimento atinge um ponto máximo constante. A duração da fase estacionária depende do balanço entre a taxa de divisão celular e o número de células que vão se tornando inviáveis (morte celular ou incapacidade de se dividir), devido às condições ambientais se tornarem, progressivamente desfavoráveis.

- Fase de declínio

Fase em que as células perdem a capacidade de se dividir, a taxa de morte celular torna-se maior que a taxa de divisão e o número de células viáveis decresce exponencialmente até a completa extinção da população. Nesta fase muitas células assumem formas incomuns. Em bactérias formadoras de esporos sobrevivem mais esporos que células vegetativas. A duração desta fase é variável dependendo tanto das características genéticas da bactéria quanto das condições ambientais.

2. Objetivos

Os objetivos principais são, a determinação da velocidade de crescimento a baixa temperatura (12°C) de 42 isolados de *Mesorhizobium spp.* oriundos a 6 regiões de Portugal continental e uma região insular (Madeira) e determinação da velocidade de crescimento a 25°C de 17 isolados de *Mesorhizobium spp.*, para verificação da variação relativamente ao crescimento a estas duas temperaturas. A determinação do número de nódulos formados a baixa temperatura (12°C), como critério para seleção de isolados *Mesorhizobium spp.*, mais eficientes na simbiose com variedades de grão-de-bico de sementeira antecipada Outono/Inverno.

No capítulo 6, dá-se ênfase, através de uma revisão bibliográfica, dos contributos da Fixação Biológica de Azoto (FBN) e dos impactos do fornecimento de azoto, na sua forma químico-industrial, na qualidade do ambiente.

3. Material e métodos

3.1. Velocidade de crescimento de *Mesorhizobium spp.* “in vitro”, a 12° C e a 25° C

3.1.1 Preparação das placas “ELISA”

1. Limpeza

As placas “ELISA” foram lavadas com água destilada procedendo-se á escovagem dos 96 poços. Após a lavagem mergulharam-se duas vezes em recipiente com água destilada.

2. Desinfecção

Com uma escova, desinfetaram-se, os 96 poços das placas ELISA com hipoclorito de sódio com 3% de cloro livre, em seguida, procedeu-se á lavagem com álcool a 96% e passaram-se as placas por água destilada.

3. Esterilização

As placas “ELISA” foram fechadas em saco de plástico e esterilizadas a 80°C, durante 15 minutos em autoclave. Posteriormente, secaram-se dentro dos sacos, em estufa a 50°C.

4. Introdução do meio de cultura

Em câmara de fluxo laminar, pipetou-se com micropipeta multicanal, 250 µL de ML para os poços de placas “ELISA”. Foi introduzido ML em 8 poços por cada pipetagem.

Inoculação

Previamente foram repicados 40 estirpes da bactéria *Mesorhizobium spp.* (tabela 2) e duas estirpes de referência (*Mesorhizobium ciceri* e *Mesorhizobium mediterraneum*), para placas de *Petri*, contendo MLA, as quais se incubaram em estufa a 28° centígrado, para crescimento.

Ao se obterem crescimentos, as placas de *Petri*, foram fechadas com “parafilme” e refrigeradas (4-8°C), para que, ao se inocularem nos poços das placas

“ELISA” se mantivesse uma uniformização do estado fisiológico da população. As estirpes foram inoculadas nas placas recorrendo ao uso de palitos previamente esterilizados. Este método de inoculação foi escolhido para que, por um lado, tornar possível a inoculação de um grande número de estirpes num curto espaço de tempo e, por outro, que a cada picada na colónia, a quantidade de inóculo transportado para o meio, fosse sempre de um número equivalente de bactérias.

A primeira e as duas últimas linhas e a primeira e última coluna das placas serviram como controlo, não sendo inoculadas com qualquer isolado (figura 3).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni
B	Ni	M. cic	M. med	Estirpe 1	Est. 2	Est. 3	Est. 4	Est. 5	Est. 6	Est. 7	Est. 8	Ni
C	Ni	M. cic	M. med	Estirpe 1	Est. 2	Est. 3	Est. 4	Est. 5	Est. 6	Est. 7	Est. 8	Ni
D	Ni	M. cic	M. med	Estirpe 1	Est. 2	Est. 3	Est. 4	Est. 5	Est. 6	Est. 7	Est. 8	Ni
E	Ni	M. cic	M. med	Estirpe 1	Est. 2	Est. 3	Est. 4	Est. 5	Est. 6	Est. 7	Est. 8	Ni
F	Ni	M. cic	M. med	Estirpe1	Est. 2	Est. 3	Est. 4	Est. 5	Est. 6	Est. 7	Est. 8	Ni
G	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni
H	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni	Ni

Figura 3: Representação esquemática da inoculação de estirpes de bactérias em placas “ELISA”.

5. Incubação e crescimento

Foram realizadas 5 réplicas por cada isolado. No sentido de otimização das condições requeridas (temperatura a 12°C e a 25°C), as placas foram fechadas dentro de uma caixa de plástico, em condições de câmara húmida (uso de papel absorvente humedecido no fundo, para evitar a evaporação das culturas). Uma placa adicional serviu de fecho das outras, que se mantiveram sobrepostas, para evitar contaminações e evaporação.

As culturas mantiveram-se em câmara de refrigeração a 12°C, as culturas para medição a 25°C mantiveram-se incubadas a esta temperatura, com agitação a 150 ciclos por minuto durante o tempo em que foram efetuadas as leituras.

6. Leitura das Absorvâncias

Leram-se as absorvâncias, com o aparelho Leitor Microplate BioRad Modelo 680, a 565 nm. As leituras do crescimento das estirpes *Mesorhizobium spp.* a 12°C e a 25°C, leu-se o tempo zero, tempo em que foram realizadas as inoculações e a cada 24 horas seguintes ao tempo da primeira leitura, durante 10 dias consecutivos.

A cada leitura de cada placa foi utilizado um “pano de óculos” desinfetado com álcool para eliminar condensações no fundo das placas, de modo a não introduzir erros de leitura.

Tabela 2: Isolados *Mesorhizobium spp.*, com origem, número de plasmídeos, cluster filogenético a que pertencem, eficiência simbiótica (ES) e respetiva referência bibliográfica; n.d.- não determinado

Estirpes	Origem	N° de Plasmídeos	Cluster	ES (%)	Referência
T5-Telhado	Beira Baixa	0	A	56	Alexandre, A. <i>et al</i> (2009)
CR3-Caldas da Rainha	Estremadura	0	C	77	Alexandre, A. <i>et al</i> (2009)
CR32-Caldas da Rainha	Estremadura	0	C	57	Brígido, C. <i>et al</i> (2007)
S15-Sintra	Estremadura	0	B	79	Alexandre, A. <i>et al</i> (2009)
S26-Sintra	Estremadura	0	B	68	Alexandre, A. <i>et al</i> (2009)
CV1- Elvas	Alto Alentejo	0	A	28	Laranjo, M. <i>et al</i> (2002)
CV11- Elvas	Alto Alentejo	0	A	21	Laranjo, M. <i>et al</i> (2002)
EE7 ENMP Elvas	Alto Alentejo	0	B	84	Laranjo, M. <i>et al</i> (2001)
93-Évora	Alto Alentejo	0	C	27	Alexandre, A. <i>et al</i> (2009)
102-Évora	Alto Alentejo	0	A	54	Alexandre, A. <i>et al</i> (2009)
T4-Telhado	Beira Baixa	1	A	86	Alexandre, A. <i>et al</i> (2009)
T7-Telhado	Beira Baixa	1	A	54	Alexandre, A. <i>et al</i> (2009)
T8-Telhado	Beira Baixa	1	A	31	Alexandre, A. <i>et al</i> (2009)
S8-Sintra	Estremadura	1	B	83	Alexandre, A. <i>et al</i> (2009)
STR4-Santarém	Ribatejo	1	A	50	Alexandre, A. <i>et al</i> (2009)
STR10-Santarém	Ribatejo	1	A	28	Alexandre, A. <i>et al</i> (2009)
STR14-Santarém	Ribatejo	1	C	64	Alexandre, A. <i>et al</i> (2009)
75-Elvas	Alto Alentejo	1	B	35	Laranjo, M. <i>et al</i> (2001)
78-Elvas	Alto Alentejo	1	A	63	Laranjo, M. <i>et al</i> (2001)
79-Elvas	Alto Alentejo	1	B	47	Laranjo, M. <i>et al</i> (2001)
83-Elvas	Alto Alentejo	1	A	49	Laranjo, M. <i>et al</i> (2001)
85-Elvas	Alto Alentejo	1	A	60	Laranjo, M. <i>et al</i> (2001)
94- Évora	Alto Alentejo	1	A	33	Alexandre, A. <i>et al</i> (2009)
PT-35-Portalegre	Alto Alentejo	1	A	56	Brígido, C. <i>et al</i> (2007)
27-Beja	Baixo Alentejo	1	B	41	Laranjo, M. <i>et al</i> (2001)
64b.-Beja	Baixo Alentejo	1	A	70	Laranjo, M. <i>et al</i> (2001)
PMI-1 Portimão	Algarve	1	B	80	Alexandre, A. <i>et al</i> (2009)
PMI-6 Portimão	Algarve	1	A	81	Alexandre, A. <i>et al</i> (2009)
98-Évora	Alto Alentejo	2	A	72	Alexandre, A. <i>et al</i> (2009)
6b-Beja	Baixo Alentejo	2	D	76	Laranjo, M. <i>et al</i> (2001)
7a-Beja	Baixo Alentejo	2	B	39	Alexandre, A. <i>et al</i> (2009)
PM-1-Portimão	Algarve	2	D	51	Alexandre, A. <i>et al</i> (2009)
PM-14-Portimão	Algarve	2	D	33	Alexandre, A. <i>et al</i> (2009)
PM-17-Portimão	Algarve	2	D	84	Alexandre, A. <i>et al</i> (2009)
S1-Sintra	Estremadura	3	D	53	Alexandre, A. <i>et al</i> (2009)
SA 17 Serra de Água	Madeira	3	A	16	Alexandre, A. <i>et al</i> (2009)
EE-14 ENMP	Alto Alentejo	4	D	32	Laranjo, M. <i>et al</i> (2002)
EE-29 ENMP	Alto Alentejo	4	D	21	Alexandre, A. <i>et al</i> (2009)
89a-Évora	Alto Alentejo	4	A	n.d.	Alexandre, A. <i>et al</i> (2009)
29-Beja	Baixo Alentejo	6	D	71	Brígido, C. <i>et al</i> (2007)

3.2. Análise e tratamento de resultados

Foram obtidas, as curvas de crescimento dos valores das densidades óticas dos diferentes isolados durante os 10 dias de leituras, por “software” Excel e calculados os tempos de duplicação para as diferentes estirpes de *Mesorhizobium* spp..

As diferenças de crescimento foram analisadas por transformação dos dados de absorvância, numa escala logarítmica. Três parâmetros foram calculados para cada isolado: crescimento máximo (ΔOD), definido pela diferença entre o OD máximo e OD mínimo, a taxa de crescimento máximo (μ_{Max}) determinado pela regressão linear, quando a bactéria cresce exponencialmente (Zwietering *et al*, 1990) e o tempo médio de duplicação.

O tempo médio de duplicação é definido, como o tempo decorrido entre o valor de OD no início do crescimento exponencial e o dobro desse valor, e foi calculado pela conversão dos valores de OD em \log_2 . Transformando os valores em $\log_2 OD$ em função do tempo, nas 3 leituras consecutivas que maximizam o valor do coeficiente de correlação (r^2) da regressão linear, o inverso do declive corresponde ao tempo necessário para que a cultura aumenta a sua densidade em 1 $\log_2 OD$. Uma vez tratar-se de uma escala logarítmica de base 2, a variação de uma unidade de absorvância significa que a absorvância duplicou (Singleton, 1999).

Ao se obterem os tempos médios de duplicação das estirpes a 25°C, verificou-se a relação entre os tempos de duplicação a esta temperatura e a 12°C. Analisou-se as diferenças de crescimento entre estirpes e verificou-se se existiu diferentes velocidades de crescimento relacionando-se com os tempos médios de duplicação. A análise estatística utilizada, adicionada a representações gráficas e atendendo aos níveis de significância, foi a Análise de Variância com separação de médias pelo teste de Student-Neuam-Keul, usando o programa informático M-STAT-C.

3.3. Inoculação de isolados *Mesorhizobium* spp., no grão-de-bico

Seis isolados *Mesorhizobium* spp. foram selecionados segundo critério de tempos de duplicação, a 12°C. Dois de crescimento lento, dois de crescimento

mediano e dois de crescimento rápido e 2 isolados de referência (*Mesorhizobium ciceri* e *Mesorhizobium mediterraneum*) (Tabela 3), para inoculação em grão-de-bico.

Tabela 3: Isolados selecionados para inoculação em grão-de-bico

Isolados Seleccionados
<i>Mesorhizobium ciceri</i>
<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>
93 Évora
STR-14 Santarém
S15 Sintra
PMI-1 Portimão
CR-32 Portimão
64b-Beja

As sementes previamente esterilizadas e germinadas foram inoculadas com diferentes estirpes de *Mesorhizobium* spp.. As sementes permaneceram em tubos contendo inóculo devidamente protegido da luminosidade e em ambiente refrigerado com agitação, durante aproximadamente 12 horas, “overnight” (Figura 4).

3.3.1. Esterilização e germinação das sementes

As sementes foram previamente desinfetadas, com uma lavagem com álcool a 70% e com hipoclorito de sódio com 3% de cloro livre e seis lavagens com água destilada estéril. Na última lavagem permaneceram durante 2 horas para embebição.

Um tabuleiro, contendo vermiculite e sementes de grão-de-bico, foi humidificado com 1,5 L de água destilada estéril, em seguida, foi acondicionado, na estufa a 27°C, durante dois dias, para germinação.

3.3.2. Quantificação de concentração dos diferentes isolados para inoculação

Fizeram-se culturas de crescimento em meio líquido, para os 8 isolados, usando 75 ml de meio ML com a repicagem de cada isolado para Erlenmeyers de 150 ml e incubou-se as culturas a 28°C em estufa com agitação (Vincent, 1970), até se obter

alguma turvação do meio de cultura (48h). Transferiu-se 10 ml de cada cultura, para tubos “falcon” e centrifugou-se, em centrifugadora “Sigma Nr. 11192”, a 5.000 g. Rejeitou-se o sobrenadante, ressuspendeu-se “pellet” em 5 ml de PBS e agitou-se, com vortex “Labinco L46”. Centrifugou-se novamente durante 10 minutos a 5.000 g. Voltou-se a rejeitar o sobrenadante e ressuspendeu-se “pellet” em 5 ml PBS.

Procedeu-se a diluições 1:50, 1:100, 1:1000, 1:10000 e 1:100000 a partir dos crescimentos em meio líquido. Na última diluição utilizaram-se 100 µL para contagem de bactérias, em câmara de contagem Neubauer (0.02 mm profundidade) utilizando microscópio ótico “Olympus BX 50”, ampliação 400X e utilizando-se contraste de fase para melhor observação das células bacterianas.

Adicionalmente, transferiram-se 3 ml de cada tubo para “cuvettes” e fizeram-se as leituras da absorvância em espectrofotômetro “CECIL CE 1021 1000 Series”, a 600 nm.

3.4. Ensaio de crescimento de plantas para nodulação a 12° C

O ensaio realizou-se em estufa, numa câmara de germinação de sementes, modificada, no sentido de se controlar as condições de baixa temperatura exigidas no trabalho (figura 6).



Figura 4: Método de inoculação em tubos “Falcon” para pré-incubação a 12°C e subsequente germinação em hidroponia

A câmara de germinação de sementes, modificada, para o ensaio em estudo é composta por 40 reentrâncias que foram utilizadas para colocar 40 amostras, 8 isolados com quatro réplicas/ isolado, em solução nutritiva. A “construção” das amostras em solução nutritiva foi realizada com material de baixo custo, como esferovite, tubos PVC, tubos “falcon”, sacos de plástico, difusores de oxigênio de aquários, foi também montado um sistema de oxigenação a temperatura baixa, com um “jerican” contendo gelo (o qual foi adicionado duas vezes por dia, de manhã e ao fim da tarde) para arejamento da solução nutritiva. O “jerican” com duas aberturas, uma de receção do ar de um compressor e outra de saída de ar fresco para a solução nutritiva. Dois tratamentos com 4 réplicas cada um serviram como controlo, não sendo inoculados. Um tratamento ficou á temperatura ambiente, para se poder comparar com os que estavam a baixa temperatura, outro ao qual foi adicionado solução nutritiva azotada foi utilizado também como controlo positivo. Foram contados o número de nódulos da raiz das plantas na 1ª semana após inoculação e substituiu-se a solução nutritiva. Durante 7 semanas consecutivas, foi realizado o mesmo procedimento.



Figura 5: Raiz nodulada aos 48 dias após inoculação com crescimento a 12°C

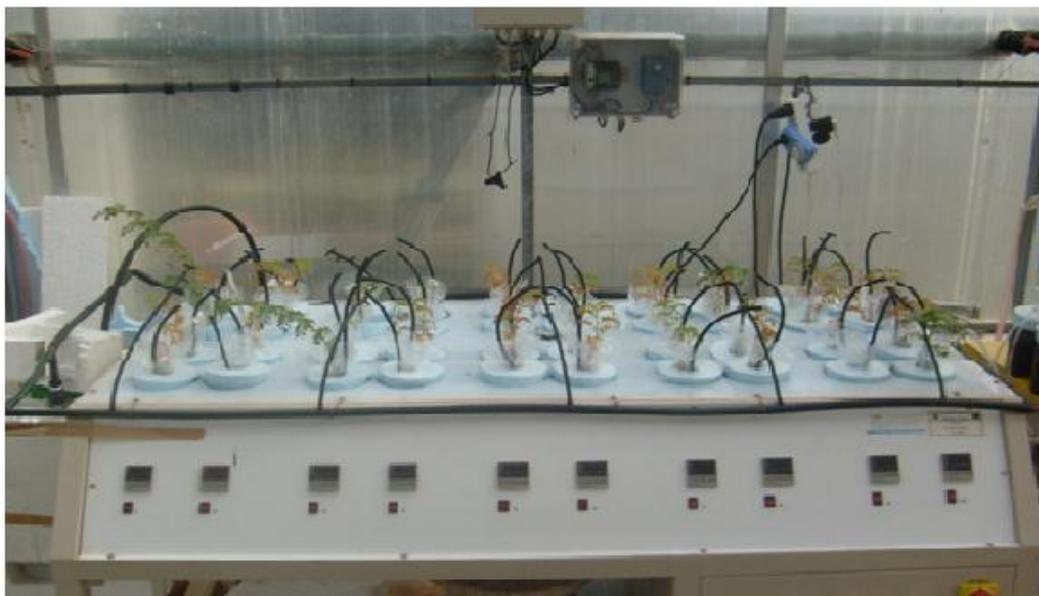


Figura 6: Imagem do ensaio de crescimento de plantas para nodulação a 12°C

3.5. Resistência Intrínseca a Antibióticos

Realizou-se um ensaio de perfil de resistência das 6 estirpes e das espécies de referência, utilizadas no ensaio de crescimento de plantas para nodulação a 12° C, a 6 diferentes antibióticos.

Para este ensaio preparou-se 2 placas de Petri contendo MLA e Vermelho do Congo e numa das placas adicionou-se 20 µL/ml de cada antibiótico. A placa a qual não se adicionou antibiótico serviu como referência de comparação de crescimento de colónias. Marcou-se na placa 24 subdivisões e deu-se uma “picadela” com palitos em cada 3 subdivisões/ estirpe. Para crescimento, as placas foram colocadas em estufa a 27° C. Observaram-se e registaram-se, os crescimentos de colónias ao 4° dia e ao 5° dia de crescimento.

Tabela 4: Concentração das soluções “stock” de cada antibiótico usado na determinação da resistência intrínseca de estirpes.

Antibiótico	Cloranfenicol	Ampicilina	Tetraciclina	Rifampicina	Estreptomicina	Kanamicina	Ciprofloxacina
Solução stock	100 mg/mL. 70% EtOH	100 mg/mL. H ₂ O	100 mg/mL. 70% EtOH	100 mg/mL. 0.1 N HCl	100 mg/mL. H ₂ O	100 mg/mL. H ₂ O	35 mg/mL. H ₂ O

3.6. Ensaio de competição de estirpes para a nodulação a 12°C

Um segundo ensaio foi realizado para competição entre estirpes. As estirpes inoculadas foram a *M. mediterraneum* e a S15. Foram utilizados três níveis de representação: na proporção 1:1; 10:1; 1:10. Três tratamentos foram analisados, temperaturas a 12°C, a 15°C e á temperatura ambiente da estufa.

Como foi efetuado, no ensaio de crescimento a 12°C, para as 6 estirpes selecionadas e para as estirpes tipo, *M. ciceri* e *M. mediterraneum*, as temperaturas controlaram-se no germinador de sementes e realizaram-se 4 réplicas por cada estirpe. Assim, 24 reentrâncias do germinador foram utilizadas, para este ensaio.

3.7. Ensaio de crescimento de plantas para nodulação com substrato (vermiculite)

O ensaio realizou-se em estufa, numa câmara de germinação de sementes, modificada, no sentido de se controlar as condições de baixa temperatura (12°C).

A câmara de germinação de sementes, modificada, para o ensaio em estudo é composta por 40 reentrâncias que foram utilizadas para colocar 40 amostras, 8 isolados com quatro réplicas/ isolado, em substrato de vermiculite, as restantes 8 amostras (4 de *M. ciceri* e 4 amostras não inoculadas), serviram de controlo.

3.7.1. Preparação do substrato

Procedeu-se ao “enchimento” dos sacos com 65 gramas de vermiculite, adicionaram-se 200 ml de solução nutritiva e autoclavou-se os sacos a 80° C durante 15 minutos. Após este procedimento, os sacos foram pesados e numerados.

3.7.2. Inoculação de isolados *Mesorhizobium* spp., no grão-de-bico

Previamente repicou-se os isolados selecionados (tabela 3), e utilizou-se a técnica do espalhamento em placas de “Petri”.

A esterilização e germinação das sementes de grão-de-bico realizou-se seguindo o procedimento que está anteriormente descrito.

No que concerne á preparação dos inócuos, preparou-se solução nutritiva diluída em ¼ da concentração. Em 2 frascos de 250 ml, colocou-se 50 ml da solução

nutritiva e adicionou-se 150 ml de água destilada. Esterilizaram-se os frascos em autoclave a 80°C durante 10 minutos.

Em seguida, pipetou-se 15 ml da solução diluída para o fundo das placas com crescimento e homogeneizou-se com pipeta. Pipetou-se toda a suspensão das placas de Petri, para tubos “falkon” e homogeneizou-se no vortex. Conservaram-se as suspensões inóculo em refrigeração a 4°C.

Após, haver crescimentos em massa nas placas procedeu-se á inoculação do grão-de-bico.

Para se inocularem as sementes de grão, pipetou-se 2 ml de cada inóculo, diretamente na semente, previamente inserida nos sacos com vermiculite. A cada mudança de inóculo, foi substituída a ponta da pipeta, para evitar contaminações.

3.8. Análise de resultados

Foram contados o número de nódulos formados nos 8 tratamentos e nos tratamentos controlo (negativo, positivo e com suplemento de azoto), apuraram-se o número de nódulos obtidos ao 28 DAI, 41 DAI e 48 DAI e o número de nódulos médio por planta.

4. Resultados

4.1. Velocidade de crescimento das bactérias “*in vitro*”, a 12°C

A Figura 7 apresenta o crescimento das estirpes ao fim de 4 dias a 12°C. Este tempo é aquele em que se detetam diferenças significativas no crescimento das estirpes. Como se pode observar, encontramos estirpes em pleno crescimento e estirpes que ainda não o iniciaram. Ou seja, encontramos estirpes que ao fim de 4 dias estão em condições de crescer e formar nódulos (são exemplos: PT35, 7aBej e STR10) e estirpes que ainda não crescem (são exemplos: T7Tel, CV1-Elv e T8Tel) e que, por isso, não estão em condições de formar nódulos a 12°C. Apesar de existirem diferenças significativas entre certas estirpes no seu crescimento ao 4º dia, a maioria não difere significativamente.

Quando calculados os tempos de duplicação das estirpes *Mesorhizobium* a baixa temperatura (12°C) observamos uma grande variação (Tabela 5), na qual a estirpe que cresce mais rapidamente (S15) apresenta valores de tempo de duplicação de 15 horas, e a estirpe que cresce mais lentamente a esta temperatura (PT35), apresentam valores de tempo de 178 horas. O tempo médio de duplicação condiciona a capacidade de nodular e a capacidade competitiva de uma determinada estirpe (Naeem *et al*, 2008). De notar que não existe uma relação entre o início do crescimento e o tempo de duplicação, uma vez que a estirpe PT35 apresenta os melhores valores de crescimento ao 4º dia mas que esse crescimento é lento uma vez que o seu tempo de duplicação é o mais elevado de todas as estirpes testadas. Pelo contrário, a estirpe S15 que demora a iniciar o seu crescimento é no entanto muito rápida a crescer a 12°C, com tempo de duplicação de apenas 15 horas. Das 39 estirpes em que foi possível calcular o tempo de duplicação, 8 (21%) apresentam um tempo de duplicação inferior a 24 horas, 18 entre 24 e 48 horas e 13 (33%) superior a 48 horas. Será de esperar que as estirpes com menores tempos médio de duplicação a 12°C, sejam aquelas que mais rapidamente formarão nódulos quando a temperatura da raiz for mais baixa, (Ogutçu *et al*,2008). Pelos resultados obtidos na determinação do tempo médio de duplicação a 12°C, podemos constatar uma grande variabilidade

entre os isolamentos testados oriundos de diferentes regiões de Portugal, pelo que a capacidade de nodular e fixar azoto em grão-de-bico de sementeira Outono/Invernal estará dependente da presença de estirpes no solo com capacidade para crescer, nodular e fixar azoto a baixa temperatura. Não foi detetada qualquer interação entre o tempo médio de geração das estirpes, a sua origem geográfica.

Tabela 5: Parâmetros de crescimento dos isolados durante o microcultura em ML a 12°C (nível de significância: *p ≤ 0,1, pouco significativo; **p ≤ 0,05, significativo; ***p ≤ 0,01 muito significativo; n.d.- não determinado)

Isolado	Crescimento Max ΔOD (Unidades OD)	μMax (Unidades OD)	r	Significância	TD (horas)
M. cic	0,345	0,983	1,000	***	24
M. med	0,251	0,782	0,998	**	31
T5 Tel	0,226	1,238	0,998	**	19
CR3	0,267	1,127	0,998	**	21
CR32	0,257	0,542	0,994	**	44
S15	0,287	1,593	0,997	**	15
S26	0,201	1,265	0,994	**	19
CV1-Elv	0,074	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CV11-El	0,059	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
EE7EN	0,213	0,175	0,992	**	137
93 Ev	0,212	0,190	0,999	**	126
102Ev	0,244	0,190	0,999	**	124
T4 Tel	0,236	0,148	1,000	***	162
T7 Tel	0,105	1,031	0,996	**	23
T8 Tel	0,112	0,492	1,000	***	49
S8	0,214	0,755	0,999	**	32
STR4	0,031	0,557	1,000	***	43
STR10	0,197	1,127	0,991	**	21
STR14	0,082	0,439	0,996	**	55
75 Elvas	0,177	0,254	0,961	*	94
78 Elvas	0,131	0,748	0,997	**	32
79 Elvas	0,185	0,358	0,959	*	67
83 Elvas	0,144	0,800	0,999	**	30
85 Elvas	0,162	0,638	1,000	***	38
94 Ev	0,251	0,158	1,000	***	152
PT 35	0,279	0,135	0,999	**	178
27 Beja	0,204	0,617	1,000	***	39
64b Beja	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PMI-1	0,247	0,868	0,986	*	28
PMI-6	0,191	0,235	0,998	**	102
98 Ev	0,253	0,944	1,000	***	25
6b Beja	0,075	0,464	0,998	**	52
7a Bej	0,035	1,067	0,999	**	23
PM 1	0,145	0,471	1,000	***	51
PM 14	0,240	0,810	0,990	**	30
PM 17	0,135	0,295	0,983	*	81
S1	0,124	0,850	0,985	*	28
SA 17	0,104	0,711	0,996	**	34
EE14EN	0,219	0,631	0,998	**	38
EE29EN	0,226	0,731	0,997	**	33
89a Ev	0,108	0,583	0,989	**	41
29 Bej	0,118	0,540	0,991	**	44

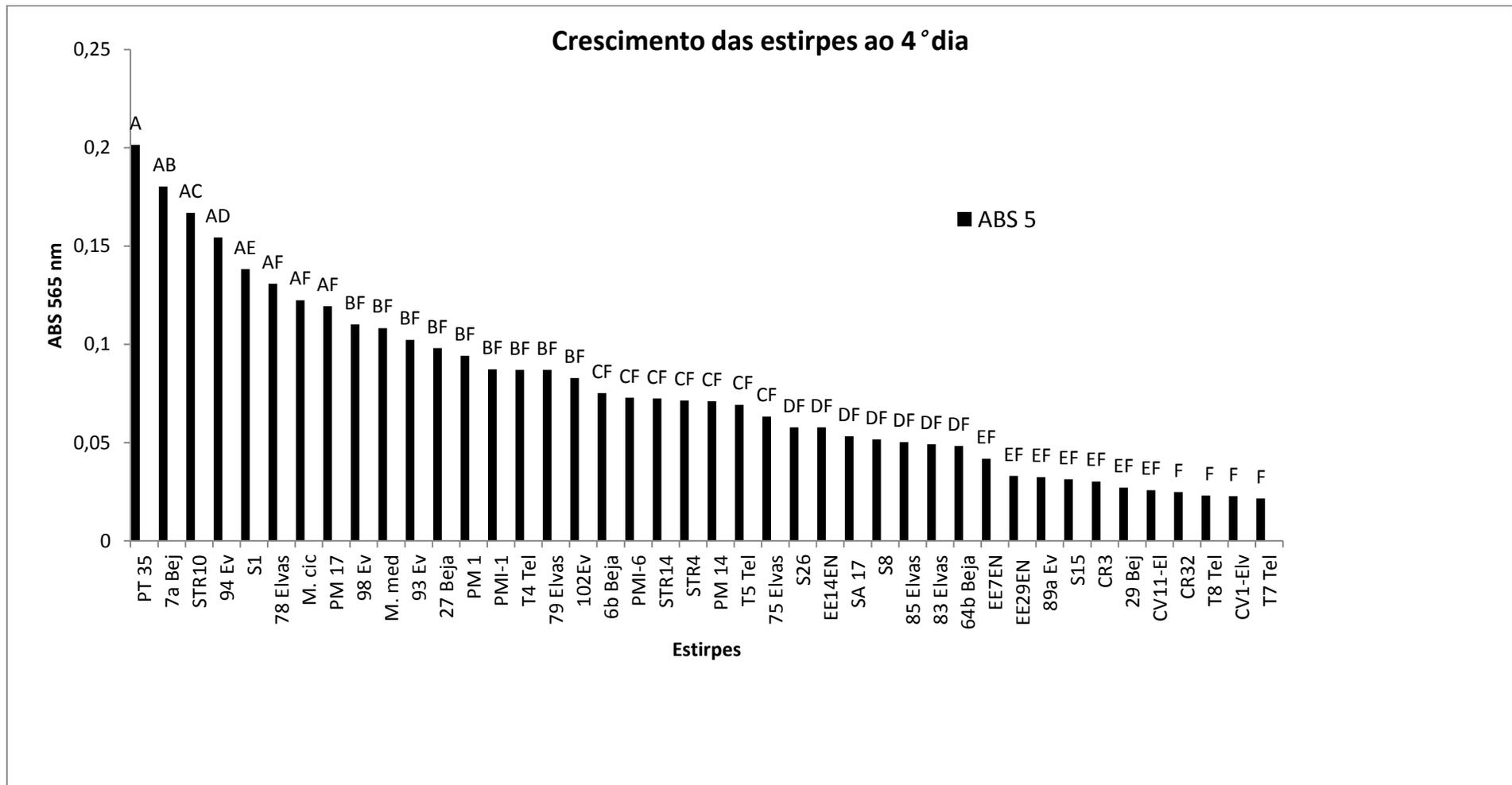


Figura 7: Crescimento das estirpes ao 4º dia a 12°C. Valores seguidos de mesma letra não diferem significativamente ($P \leq 0,05$)

4.2. Comparação dos Tempos Médios de Duplicação (horas) das estirpes, a 12°C e a 25°C

Um grupo de 19 estirpes *Mesorhizobium spp.* foram estudadas para avaliação da relação de crescimento (Tempo médio de duplicação em horas) entre as temperaturas de 12°C e 25°C.

A tabela 6 apresenta os parâmetros obtidos para a obtenção dos tempos de duplicação a 25°C.

Tal como observado para os 12° C, os tempos médios de duplicação a 25°C mostram alguma variação, com os valores a variar entre as 4 horas e as 14 horas (Tabela 6).

Tabela 6: Parâmetros de crescimento dos isolados durante o microcultura em ML a 25°C (nível de significância: *p ≤ 0,1, pouco significativo; **p ≤ 0,05, significativo; ***p ≤ 0,01 muito significativo; n.d.- não determinado)

Isolado	Crescimento Máx ΔOD (Unidades OD)	μMáx (Unidades OD)	r	Significância	TD (horas)
M. cic	0,310	0,851	0,984	**	14
M. med	0,169	1,668	0,997	**	7
EE7ENMP	0,980	3,290	0,998	**	4
83 Elvas	0,213	1,969	0,930	**	6
PM17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
STR4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
98 Evr	0,205	2,168	0,999	**	6
S26	0,086	2,1	0,882	*	6
64b Beja	0,238	2,267	0,992	**	5
S15	0,557	3,453	0,986	**	4
STR14	0,053	1,243	0,931	**	10
93 Evr	0,252	1,966	0,995	**	6
PMI-1	0,119	1,808	0,967	**	7
CR32	0,056	1,335	0,888	*	9
S1	0,217	2,090	0,970	**	6
T5-Tel	0,156	2,5	0,952	**	5
78 Elvas	0,080	1,393	0,988	**	9
27 Beja	0,120	2,258	0,971	**	5
STR10	0,238	2,474	0,986	**	5

A Figura 8 apresenta a comparação dos tempos de duplicação de 19 estirpes a 25°C e a 12°C

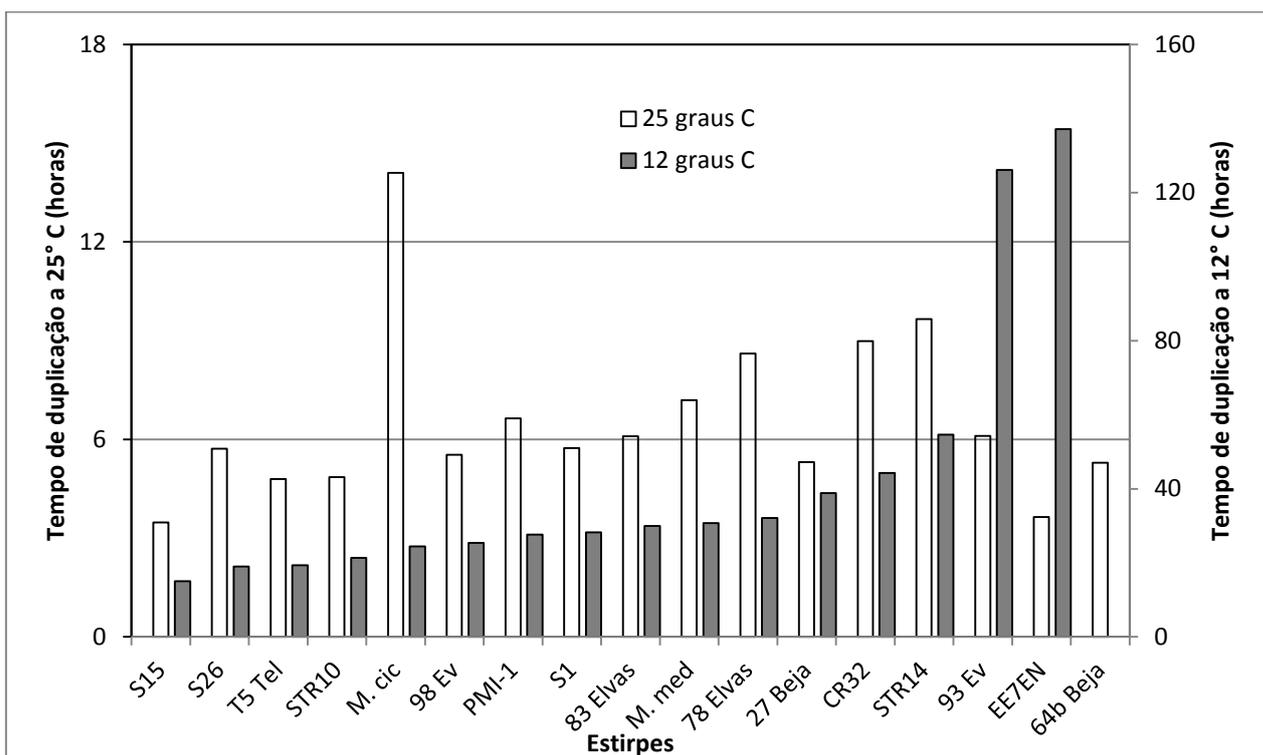


Figura 8: Tempos de duplicação das estirpes estudadas a 25°C em comparação com as mesmas estirpes a 12°C.

A Figura 9 mostra a relação entre as 17 estirpes estudadas a 12°C e a 25°C. A relação é pouco significativa em relação às estirpes apresentarem o mesmo comportamento de crescimento (TD).

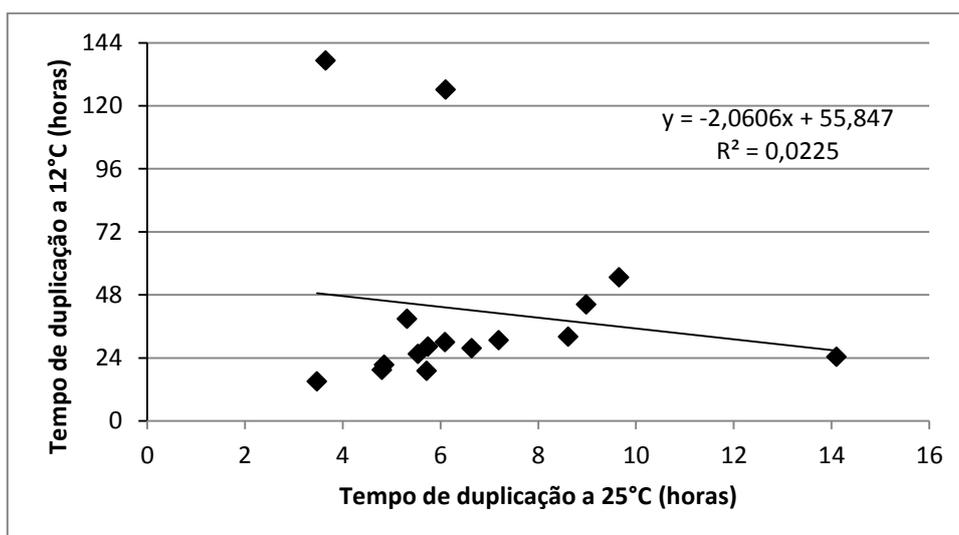


Figura 9: Relação entre tempos de duplicação a 12°C e a 25°C das 17 estirpes estudadas.

A Figura 10 mostra uma relação significativa entre 15 estirpes a 12°C e a 25°C. Nesta Figura ao se eliminaram a 93 Évora, a EE7EN e a *M. ciceri*, obteve-se um comportamento semelhante entre as estirpes a 12°C e a 25°C, em que as estirpes que crescem bem a 12°C crescem da mesma forma a 25°C.

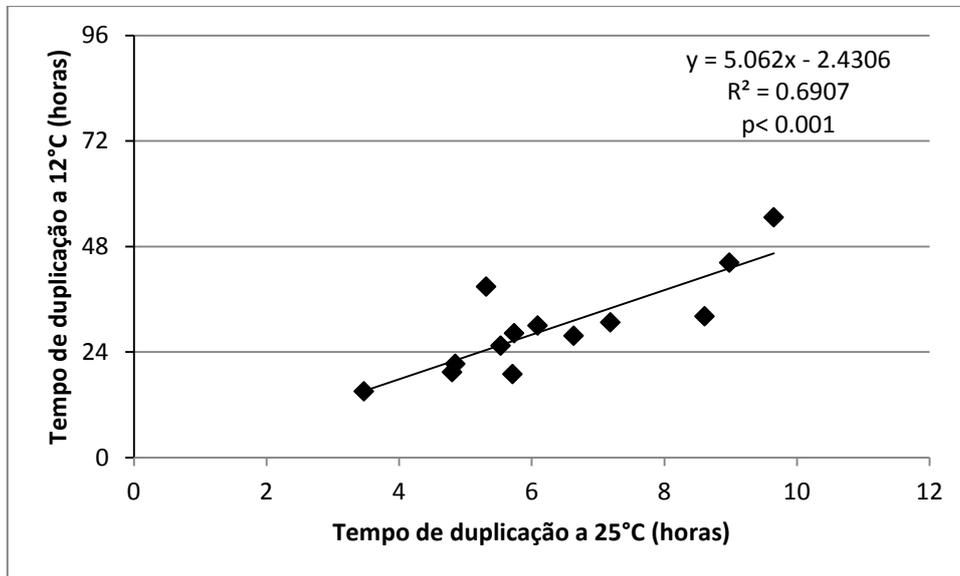


Figura 10: Relação entre tempos de duplicação a 12°C e a 25°C das estirpes estudadas, retirando da análise as estirpes 93 Évora, EE7EN e *M. ciceri*.

A figura 11 apresenta uma relação diferente (regressão) muito significativa no comportamento das estirpes anteriormente eliminadas (93 Évora, a EE7EN e a *M. ciceri*). Estas estirpes diferem de uma forma antagónica em relação às duas temperaturas estudadas, ou seja a relação é inversamente proporcional entre as duas temperaturas em estudo. Ou seja, para a maior parte das estirpes o tempo médio de geração a 12°C é diretamente proporcional ao tempo médio de geração a 25°C, existem no entanto algumas que apresentam uma relação inversamente proporcional quando crescem nestes dois valores de temperatura.

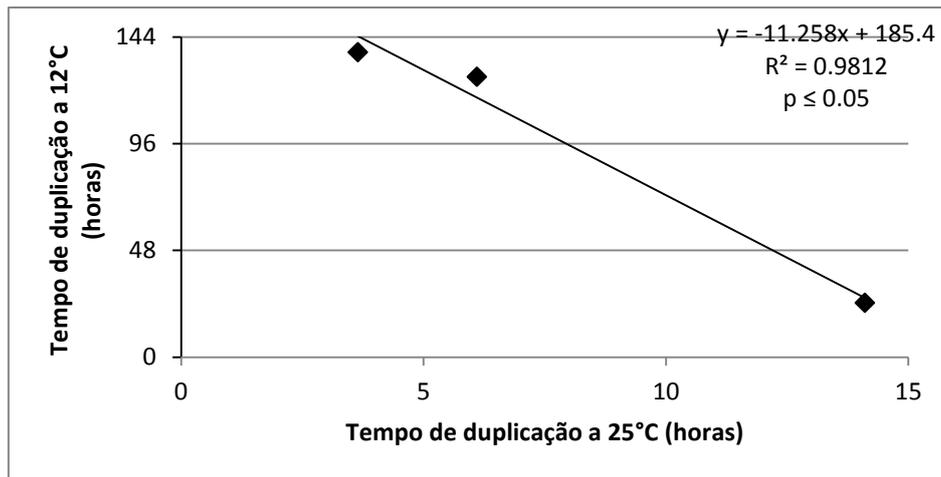


Figura 11: Relação entre tempos de duplicação a 12°C e a 25°C das estirpes 93 Évora, EE7EN e *M. ciceri*.

4.3. Inoculação de isolados *Mesorhizobium* spp. no grão-de-bico

4.3.1. Quantificação de concentração dos diferentes isolados para inoculação

Tabela 7: Absorvância e nº de células por mililitro de 8 estirpes para inoculação no grão-de-bico

Estirpes	STR14	CR32	M.med.	PMI-1	S15	M.cic	64b	93 Evr
Media (nº de células)	105,29	88,5	58,88	101,57	47,13	57,75	71,88	44,25
Desvio Padrão	9,2	14,9	18,99	4,43	12,54	9,35	16,32	5,82
Absorvancia 590 nm	0,121	0,067	0,075	0,124	0,096	0,116	0,112	0,086
Nº de células/ml	$2,63 \cdot 10^8$	$2,21 \cdot 10^8$	$1,47 \cdot 10^8$	$2,54 \cdot 10^8$	$1,18 \cdot 10^8$	$1,44 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^8$	$1,11 \cdot 10^8$

Na tabela 7 mostra-se os valores as contagens de células dos diferentes isolados usados no ensaio de crescimento para a nodulação a 12° C. O objetivo era o de avaliar a densidade ótica das culturas a fim de obter inóculos com valores equivalentes do número de células de modo a não introduzir variações entre estirpes, na formação de nódulos. Como se pode verificar, com as densidades óticas indicadas, todas as estirpes apresentam populações de 10^8 células por mililitro, com naturais mas negligenciáveis variações entre elas.

4.4. Ensaio de crescimento de plantas para nodulação a 12° C

4.4.1. Número de nódulos obtidos

Tabela 8: Número de nódulos obtidos de 11 tratamentos Dados obtidos aos 12, 21, 28, 41 e 48 DAI; Tempos de duplicação e número médio de nódulos por planta; n.d.- não determinado; DAI- dias após inoculação

Tratamento	Amostras	Estirpes	TD	Nº de nódulos					Média de nódulos/ Planta		
				12DAI	21DAI	28DAI	41DAI	48 DAI	28DAI	41DAI	48 DAI
1	1	93 Ev	126	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	93 Ev	126	0	0	0	0	0			
	3	93 Ev	126	0	0	0	0	0			
2	1	STR 14	55	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	STR 14	55	0	0	0	0	0			
	3	STR 14	55	0	0	0	0	0			
3	1	S 15	15	0	0	5	18	66	4	24	70
	2	S 15	15	0	0	1	21	48			
	3	S 15	15	0	2	5	32	96			
4	1	PMI-1	28	0	0	0	4	49	1	12	59
	2	PMI-1	28	0	0	3	25	111			
	3	PMI-1	28	0	0	1	8	17			
5	1	CR 32	44	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	CR 32	44	0	0	0	0	0			
	3	CR 32	44	0	0	0	0	0			
6	1	64b Bj	n.d.	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	64b Bj	n.d.	0	0	0	0	0			
	3	64b Bj	n.d.	0	0	0	0	0			
7	1	M. med	31	0	0	0	5	10	1	4	8
	2	M. med	31	0	0	0	0	5			
	3	M. med	31	0	0	3	6	8			
8	1	M. cic	24	0	0	4	4	6	2	10	14
	2	M. cic	24	0	0	0	21	25			
	3	M. cic	24	0	0	1	6	11			
9	1	N		0	0	0	0	5	0	0	2
	2	N		0	0	0	0	1			
	3	N		0	0	0	0	1			
10	1	Ni		0	0	0	0	5	2	9	15
	2	Ni		0	0	2	22	36			
	3	Ni		0	0	5	5	5			
11	1	M. cic		9	10	14	18	23	25	28	34
	2	M. cic		5	16	18	20	26			
	3	M. cic		3	33	45	47	52			

Para o ensaio de crescimento de plantas para nodulação a 12°C, foram realizados 11 tratamentos. Oito tratamentos com inoculação de estirpes *Mesorhizobium spp.*, e três tratamentos que serviram de controlo, com 3 réplicas de cada tratamento (De início 4 réplicas, mas como houve morte de planta na 2ª réplica de S15 e de 2ª réplica de *M. mediterraneum*, eliminou-se a 2ª réplica de cada tratamento). Dos tratamentos utilizados para controlo, um tratamento ficou à temperatura ambiente (inoculado com a estirpe *Mesorhizobium ciceri* sendo utilizado como controlo positivo, um não inoculado que serviu como controlo negativo e um terceiro não inoculado com suplemento de solução azotada (tabela 8).

Tabela 9: Isolados do ensaio de crescimento a 12°C e Tempos médios de duplicação (horas); n.d.- não determinado

Isolados	Tempos de duplicação (horas)
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	24
<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>	31
93 Évora	126
STR-14	55
S15	15
PMI-1	28
CR-32	44
64b-Beja	n.d.

No tratamento da estirpe 93 Évora, STR14, CR32 e 64b Beja não ocorreu nodulação durante o ensaio. Ao 48 DAI, a estirpe S15 foi a que apresentou maior número de nódulos dos tratamentos realizados a 12°C, apresentando uma média de 70 nódulos por planta. O tratamento PMI-1 apresentou 59 nódulos por planta. O tratamento com a *M. mediterraneum* apresentou 14 nódulos por planta.

Relativamente aos controlos, no tratamento em que foi adicionado suplemento de azoto na solução nutritiva, ocorreram a formação de poucos nódulos.

No tratamento das plantas não inoculadas (controlo negativo) houve a ocorrência de nódulos (contaminação).

À temperatura ambiente (controlo positivo) houve grande número de nódulos formados. Esta formação de nódulos em tratamentos não inoculados poderá ser devida á falta de condições de assepsia no local onde se realizou o crescimento de plantas. O facto de haver formação de nódulos nestes tratamentos a partir de 28 DAI pode significar que a origem destes contaminantes seja os sacos onde crescia grão-de-bico inoculado com a estirpe S15. Como se tratava de um suporte de crescimento em solução nutritiva com arejamento forçado, poderá residir aqui a origem de algumas destas contaminações.

De referir ainda que relativamente á maioria dos tratamentos a 12°C a primeira nodulação ocorreu aos 28 DAI, já, no controlo positivo, tratamento á temperatura ambiente (25°C) a nodulação ocorreu aos 12 DAI, mostrando a importância da temperatura da raiz na velocidade de formação de nódulos tal como referido em seus estudos, por Pan e Smith, 1998; Zang e Smith, 2002; Junior *et al*, 2004, Poustini *et al*, 2005, Naeem *et al*, 2008.

A figura 12 apresenta o número médio de nódulos por planta ao 28 DAI, 41 DAI e 48 DAI e os tempos de duplicação das estirpes seleccionadas no ensaio de crescimento de plantas a 12°C. Como se pode observar, as estirpes com tempos médios de duplicação a 12°C superiores a 31 horas não formaram nódulos nestas condições de ensaio, mesmo após um período de 48 DAI. De entre as estirpes que formaram nódulos, a estirpe S15 forma nódulos logo a partir de 28 DAI, sendo a estirpe que forma mais nódulos aos 48 DAI.

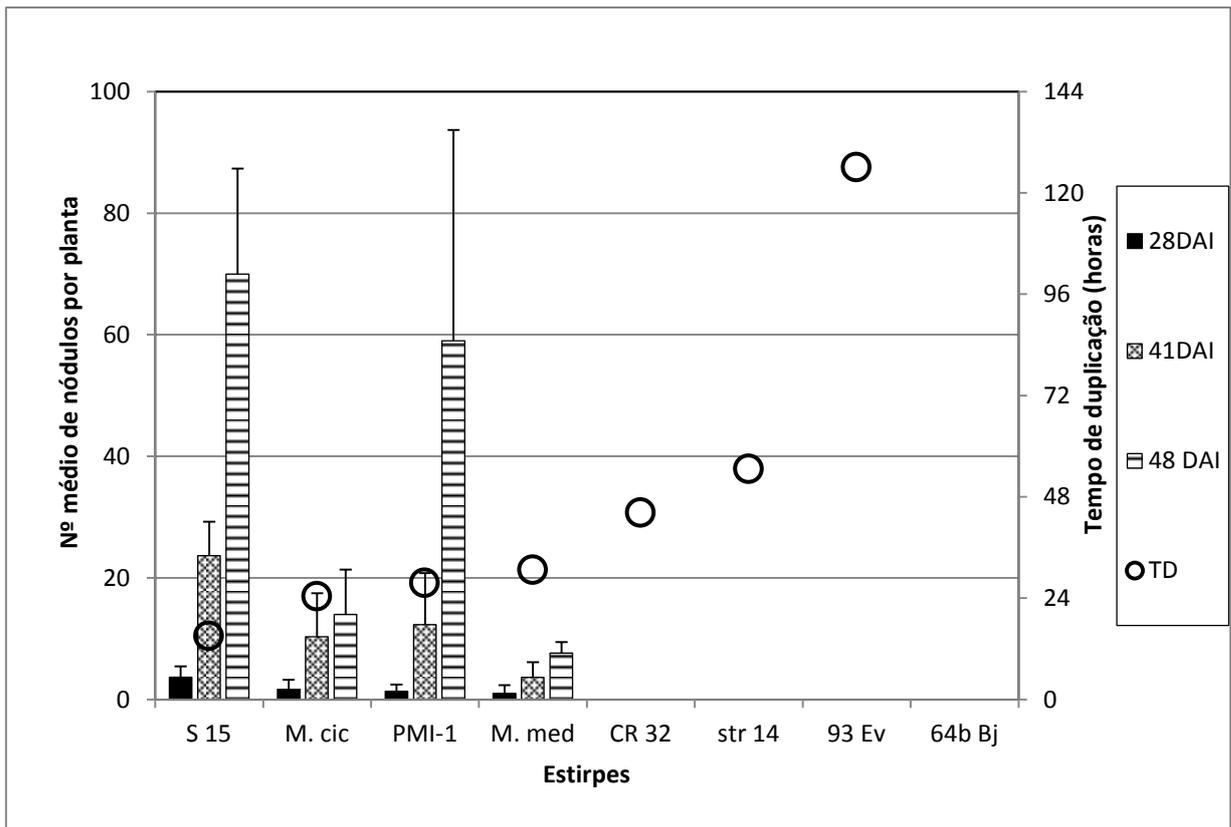


Figura 12: Número médio de nódulos por planta aos 28 DAI, 41 DAI e 48 DAI e tempos médios de duplicação (horas) das estirpes selecionadas para o ensaio de crescimento de plantas para nodulação a 12°C. T representa o erro padrão da média de cada observação.

Parece assim evidente que com temperaturas da raiz de 12°C a formação de nódulos é condicionada pela capacidade das estirpes inoculadas crescerem em condições térmicas desta ordem de grandeza.

Três ensaios foram realizados no sentido de se obterem resultados que reforçassem o conteúdo do presente estudo, entre os quais, a resistência intrínseca a antibióticos, ensaio de competição de plantas inoculadas com diferentes estirpes e ensaio de crescimento de plantas para nodulação com substrato (vermiculite). Não se obtiveram resultados, devido a avaria do sistema de aclimatização da estufa durante o período em que foram realizados os respectivos ensaios.

5. Discussão

Velocidade de crescimento das bactérias *Mesorhizobium spp.* "in vitro", a 12°C

A 12°C o tempo de duplicação das estirpes avaliadas têm uma grande variação, entre as 15 horas e as 178 horas, o que vai ao encontro dos resultados de Wendel Rice *et al*, 1994 que também obteve tempos de duplicação com grande intervalo de variação, entre 1 e 155 horas, no crescimento de *Rhizobium meliloti* a 10°C.

A temperatura ótima descrita para o género *Mesorhizobium* situa-se entre 25°C e 30°C (Laranjo, M. e Oliveira S., 2010), apesar do intervalo de temperatura que estas bactérias toleram seja entre os 4°C e os 42°C (Chen *et al*, 2005). Muitas estirpes do género *Mesorhizobium* possuem diferenças fenotípicas, já que existem diferenças na velocidade de crescimento. Muitas crescem melhor a baixas temperaturas do que a elevadas temperaturas (Laranjo, M. e Oliveira S., 2010).

Selecionar estirpes que crescem rapidamente a baixa temperatura e que tenham eficiências simbióticas elevadas é de extrema importância e torna-se num importante critério para posterior inoculação no hospedeiro, no sentido de se atingir uma boa produtividade da planta e criar uma otimização na fixação de azoto atmosférico.

Os tempos de duplicação, não se relacionam com o número de plasmídeos das estirpes, nem com o cluster filogenético a que pertencem.

Como seria de esperar, o tempo médio de duplicação a 25°C das estirpes avaliadas tem um intervalo menor que a 12°C, entre as 4 horas e as 14 horas.

Os tempos de duplicação das estirpes a 12°C não se encontram relacionados com o crescimento ao 4º dia após inoculação, como se verifica nas figuras 8 e 9.

Os tempos médios de duplicação são uma forma de avaliação da velocidade de crescimento de estirpes de bactérias, mas nem sempre, os crescimentos apresentados

por algumas estirpes, poderão ser calculados, pois se não se obter na curva de crescimento, uma fase exponencial com pelo menos 3 observações, estes não poderão ser calculados. A 12°C e 25°C, estirpes que não apresentam crescimentos, ou cujo crescimento não evidencie uma clara fase logarítmica, não se conseguem calcular os respectivos tempos de duplicação.

O stress térmico, neste caso, de temperaturas baixas, revela-se um fator importante na velocidade de crescimento das estirpes, já que estas apresentam diferentes comportamentos.

Ensaio de crescimento de plantas para nodulação a 12°C

Respetivamente aos resultados obtidos no ensaio de crescimento de plantas a 12°C pode inferir-se que o tempo para a formação dos nódulos depende da temperatura na raiz e da capacidade da bactéria crescer a baixa temperatura. Assim, o tratamento testemunha inoculado com *M. ciceri*, e deixado á temperatura ambiente na estufa (com uma média aproximada de 25°C) formou nódulos logo aos 12 DAI, enquanto a mesma estirpe a 12°C apenas iniciou a formação de nódulos aos 28 DAI.

Lindemann e Ham (1979) observaram que embora a temperatura na zona da raiz fosse o fator dominante de controlo da eficácia simbiótica e produtividade da soja, a nodulação e fixação do azoto atmosférico a uma dada temperatura, variava também com o nº de bactérias presentes no inóculo e com a variedade de hospedeiro.

A baixa temperatura do solo, afeta a competitividade de rizóbio para nodulação (Hardarson e Jones, 1979), retarda a infeção dos pelos radiculares (Gibson, 1971; Hafeez *et al*, 1995; Montanez *et al*, 1995; Serraj, 2003), a nodulação atrasa (Fyson e Sprent, 1982; Bordeleau e Prevost, 1994;), e a atividade dos nódulos é deprimida (Waughman, 1977; Ogutçu *et al*, 2008).

Estudos de efeitos sub-óptimos da temperatura da raiz na fixação de azoto atmosférico em soja e outras leguminosas subtropicais concluíram que, a baixa temperatura na zona da raiz, diminuiu a nodulação e a atividade do nódulo. A temperatura regula o metabolismo das bactérias (Vincent, 1977)

Relativamente ao tempo para nodulação, e de acordo com o que diversos autores comprovaram, a nodulação, teve um atraso de 3 semanas após inoculação a 12° C, a infeção das estirpes no córtex da raiz foi inibida a esta temperatura. Lynch e Smith mostraram que a 15°C na zona da raiz da soja, houve inibição tanto na infeção pela bactéria *Bradyrhizobium japonicum* e no desenvolvimento dos nódulos e atrasou a atividade dos nódulos até aproximadamente 4-6 semanas depois da inoculação.

Os nódulos obtidos do ensaio de nodulação, eram inefetivos, dado que o ensaio decorreu em condições de solução nutritiva, pelo que o azoto (N₂) não foi solubilizado. Isso verificou-se com a observação dos nódulos que a 12°C eram pequenos e de cor esbranquiçada, em relação aos nódulos a 25°C, que tinham a forma normal e a cor rosada. Isto sugere que os nódulos formados a 12°C podem-se desenvolver, mas são retardados pelo efeito da baixa temperatura. De acordo, com Fyson e Sprent que observaram um atraso no desenvolvimento dos nódulos na *Vicia faba*, a temperatura baixa na zona da raiz, sem haver uma diminuição no número de nódulos, também não houve diminuição do número de nódulos no presente estudo.

Dos 11 tratamentos deste ensaio, a estirpe S15, foi a que produziu mais nódulos por planta. Esta estirpe, como se observou, tem um crescimento rápido a 12°C e é eficiente na fixação de azoto (SE=79%).

A PMI-1 teve também um razoável número de nódulos por planta, e constata-se que tem também um crescimento rápido avaliado por um tempo médio de duplicação de 28 horas.

Já a estirpe 93 Évora que tem um crescimento mais lento que as duas anteriores (tempo médio de duplicação de 126 horas), não formou nódulos.

Verifica-se que o crescimento das bactérias, está relacionado com o número médio de nódulos por planta. E a temperatura está correlacionada com o tempo para nodulação. A 12°C apenas começaram a aparecer na generalidade dos tratamentos aos 28 DAI, no entanto no tratamento a 25°C (controlo positivo) os nódulos foram observados aos 12 DAI.

No controlo negativo (não inoculado), houve contaminação, pois as plantas nodularam, e não era esperada essa ocorrência.

No controlo onde se adicionou suplemento de solução azotada á solução nutritiva, o número de nódulos formados foi pequeno, pois em geral a adição de azoto, reduz a nodulação e a fixação de azoto. A planta na presença de azoto favorece a diminuição de energia despendida, para a fixação de azoto, já que há azoto presente que está disponibilizado no substrato (Wani; Rupela e Lee, 1995)

Matthews e Hayes mostraram que diminuindo a temperatura na zona da raiz de 25°C para 10°C resultou numa diminuição no crescimento de nódulos total e na fixação de azoto atmosférico por planta da soja. Isto foi atribuído à inibição de infeção e iniciação da nodulação pela bactéria *Bradyrhizobium japonicum* (Zhang *et al*, 1995).

6. Balanço do azoto no ecossistema incorporado sob a forma industrial e biológica

Custos associados às leguminosas em relação á forma sintética de azoto

As quantidades globais de N fixado com origem antrópica duplicaram desde a época pré-industrial até aos nossos dias. Segundo Crews e Peoples (2004) a estimativa de 140 Tg de N fixados pela intervenção do homem, entre 25 a 40 Tg são resultantes da cultura intensiva de leguminosas, 80 Tg resultantes da aplicação agrícola de compostos azotados de origem sintética e 20 resultantes da queima de combustíveis fósseis para produção de energia.

Existem numerosas consequências ecológicas associadas ao comportamento humano na utilização de azoto e ao seu próprio ciclo nos ecossistemas terrestres. Os fertilizantes sintéticos são identificados como causa principal de impacto negativo no ambiente (Vitousek *et al*, 1997; Fillery, 1999; Howarth *et al*, 2002). Isto acontece, pois os fertilizantes constituem a maior e mais recente influência antrópica sobre o ciclo de azoto global. A questão da sustentabilidade dos ecossistemas está em debate, a alternativa surge com o cultura de leguminosas, sendo que esta mesma alternativa se reveja com algumas lacunas no que respeita a três perspetivas, que são a integridade ecológica, a energética e a segurança no abastecimento alimentar. A primeira perspetiva abordada toma em atenção os vários problemas associados á relação integração/aplicação de compostos azotados e alteração dos ecossistemas, como é o caso dos fluxos de perda de azoto nos ecossistemas, pois, em geral os sistemas agrícolas têm baixa eficiência na absorção de nutrientes pelas culturas. É típico, as culturas absorverem 50% ou menos do azoto aplicado (Peoples *et al*, 1995 ab; Cassman *et al*, 2002), também, o sistema de rotações de culturas com leguminosas tem mostrado igualmente baixa eficiência na utilização do azoto que é aplicado ou que está disponível no solo (Giller e Cadisch, 1995; Peoples *et al*, 1995b; Fillery, 2001). Algumas destas baixas eficiências podem ser atribuídas á natureza volátil e á

mobilidade do azoto, assim como ao momento em que é fornecido ao sistema e ao uso anual pelas culturas.

Relativamente, á mobilidade do azoto, a lixiviação de nitrato inorgânico dissolvido ou formas de azoto orgânico, são um dos principais fatores de perda dos ecossistemas, outras vias onde as perdas são dominantes são as perdas para a atmosfera na forma de NH_3 , N_2O e N_2 , este último resultante de processos de desnitrificação (Peoples *et al*, 1995a).

Como foi referido anteriormente, as perdas de produtos azotados e o seu ciclo global estão associados a problemas ambientais. A acidificação do solo é um desses problemas, pois pode reduzir o desempenho de culturas através de várias vias, incluindo toxicidade nas plantas, com excesso de alumínio e manganês, assim como, provocar a redução de vários nutrientes essenciais (Ritchie, 1989).

Outro impacte ecológico negativo reside na lixiviação de nitrato. Este tipo de impacte resulta essencialmente de condições em que existem no subsolo, tais como, aquíferos ou linhas de água onde, os nutrientes são arrastados ou diluídos e provocam contaminação nas águas subterrâneas. Em todo o mundo, este problema está constituído como dos mais adversos no que respeita á qualidade das águas. Na Europa a adubação excessiva e generalizada, com compostos azotados está implicada, como fator importante que ameaça a saúde pública (Juergens-Gshwind, 1989), através da eutrofia (enriquecimento de massa de água por nutrientes) (Schindler, 1978) e á saúde animal, através da depleção de oxigénio que conduz á hipoxia (ausência de oxigénio) que origina mortandade de peixes, contaminando a água e provoca um sobre aumento de algas que libertam toxinas (cianobactérias) (Rabalais *et al*, 2002).

O aumento de perdas de azoto em sistemas de cultura de leguminosas ocorre durante o verão ou em rotações onde decorre o pousio na época de inverno, após aplicação de fertilizantes, mas antes de culturas subsequentes (Fillery, 2001). No entanto, aquando da cultura com leguminosas na época de pousio, que não só fixam azoto, mas também têm alguma capacidade de retenção e absorção de azoto, as perdas de azoto são menores (George *et al*, 1994), pois são incorporadas nas plantas e

fixadas no solo, conduzindo a uma redução no uso de azoto sob a forma sintética bem como a uma redução das perdas por lixiviação.

Em linha, com os problemas de perda de azoto, temos a volatilização da amónia, esta pode ocorrer de uma forma gradual, em regiões onde os solos são irrigados e onde predominem solos alcalinos. A deposição da amónia pode levar a um conjunto de fenómenos em cadência, que são o aumento das taxas de acidificação e alteração na composição da comunidade de plantas (Wedin e Tilman, 1996).

A volatilização da amónia pode ser agravada, a partir de resíduos de leguminosas, deixados na superfície do solo, mas não sendo muito significativos como os sistemas fertilizados de forma sintética (Larsson *et al*, 1998).

Ainda, na integridade ecológica, temos os fluxos de óxidos de azoto. Óxidos azotados (NO) e óxidos nitrosos (N₂O) são gases traço que se formam normalmente durante os processos microbianos de nitrificação e desnitrificação. As emissões de NO, tem impacto no meio ambiente a uma escala local e regional. Estes contribuem para a formação de “smog” na troposfera e de ozono, bem como chuvas ácidas (Vitousek *et al*, 1997). Os efeitos das emissões de N₂O ocorrem a uma escala global. Óxido nitroso é um gás de efeito de estufa elevado, em que uma molécula tem aproximadamente mais de 200 vezes o potencial do CO₂ para o aquecimento global (Peoples *et al*, 1995a). Este também pode catalisar o ozono estratosférico (Crutzen e Ehhalt, 1977). A concentração de N₂O na atmosfera aumentou cerca de 13% nos últimos 200 anos (NRC, 2001). Múltiplas atividades têm contribuído para um aumento antrópico de N₂O (Vitousek *et al*, 1997), no entanto, a agricultura com uso de fertilizantes constitui a maior fonte, representando 70% do aumento (Matson *et al*, 1998).

Poucos estudos estão realizados, no que respeita á comparação dos fluxos de óxidos de azoto entre leguminosas e os fertilizantes na forma sintética e dentro desses estudos não existem comparações diretas entre estes dois tipos de fertilização do solo (Davidson e Kinglerlee, 1997).

Um importante fenómeno negativo no meio ambiente á escala global é o potencial de aquecimento global (GWP). Robertson e colaboradores (2000)

compararam a saída de gases de efeito de estufa combinados ($\text{CO}_2 + \text{N}_2\text{O} + \text{CH}_4$), associados a uma gama de fertilizantes sintéticos e sistemas de cultura de leguminosas. No seu estudo, a plantação convencional e agro-sistema fertilizado tinha um GWP líquido de 114 e a base de leguminosas tinha um GWP de 41. Estes baixos valores relativos ao cultura de leguminosa devem-se essencialmente à energia fóssil despendida para realizar os processos de cultura. Segundo Robertson e colaboradores (2000), também a longo prazo, culturas com leguminosas têm um menor potencial para o aquecimento global que outros sistemas de cultura estudados.

Relativamente à perspetiva energética, os rizóbios ou *Bradyrhizobium* que fixam azoto a partir de nódulos radiculares de leguminosas obtêm a sua energia de foto-assimilados da planta hospedeira. Atkins (1984) num estudo que publicou refere que entre 3 e 25% de foto-assimilados de leguminosa podem ser mobilizados para a raiz para suporte de fixação de N_2 . Alguns desses compostos nutritivos podem ser utilizados diretamente na manutenção da atividade do nódulo, e outra fração pode ser exportado para a planta na forma de compostos azotados (Atkins, 1984). Numa escala de sistema de produção onde a rotação de leguminosa é realizada, no sentido de fornecer azoto para culturas posteriores, o custo de foto-assimilados de fixação de N_2 está subjacente e é altamente renovável. A energia solar é essencialmente utilizada na fixação de N_2 pela planta e pelo microsimbionte.

Os custos energéticos envolvidos na síntese de fertilizantes azotados são muito elevados, mesmo tendo em conta as melhorias de eficiência energética nos últimos 50 anos que era mais de $80 \text{ GJ t}^{-1} \text{ NH}_3$ antes de 1955 para 27 GJ t^{-1} no final de 1990 (Smil, 2001). Globalmente, apenas 1,3% de toda a energia produzida é utilizada para fertilizantes (Smil, 2001), mas a longo prazo as energias fósseis que são finitas e estão a ser sobre utilizadas, vão fazer disparar o preço e assim aumentar o custo de síntese de fertilizantes e tornar assim insustentável o seu uso. Também o custo ambiental de síntese de fertilizantes se torna insustentável pela queima de combustíveis fósseis que contribui para o aquecimento global do planeta. O Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas previu que as atividades humanas resultarão num aumento médio da temperatura entre 1,4 e 5,8°C neste século (Houghton *et al*, 2001).

A terceira perspectiva tem em conta as mudanças económico-sociais do abastecimento de alimento às suas populações. Existem países que hoje quer, devido a razões de pobreza ou por razão política, não têm acesso aos fertilizantes. Sanchez (2002) relatou sobre a produção dos alimentos no Saara, em África. Ele enfatizou a importância da investigação sobre o sistema de cultura á base de leguminosas que sejam economicamente e tecnicamente acessíveis aos agricultores. De acordo com Sanchez, o nível de pobreza nesta região é tal, que o uso de fertilizantes e outros consumíveis de alto custo eram proibidos. A experiência de Cuba desde o fim da União Soviética, em 1991, é um exemplo claro de como o isolamento político pode resultar num “deficit” de fertilidade da produção. Antes de 1991, Cuba recebia grandes quantidades de combustíveis fósseis e fertilizantes da antiga União Soviética. Em 1988, os agricultores cubanos aplicavam 598 mil toneladas de fertilizantes nas suas lavouras, enquanto em 1994 essa taxa caiu para 124 mil toneladas (FAO, 2002). Como forma de se assegurar a agricultura após 1991, Cuba transformou as técnicas de fertilização na cultura da cana-de-açúcar, passou a utilizar leguminosas para a fertilidade das suas produções agrícolas. Este exemplo, gerado por um conflito político ilustra, como estes podem afetar profundamente a segurança alimentar indiretamente através da disponibilidade de energia e nutrientes.

Tabela 10: Intervalo de variação da proporção e quantidade de N₂ estimado experimentalmente das principais leguminosas

Espécies	Proporção fixada (%)	Quantidade N ₂ fixado (Kg N ha ⁻¹)
Grão de bico (<i>Cicer arietinum</i>)	8-82	3-141
Lentilha (<i>Lens culinaris</i>)	39-87	10-192
Ervilha (<i>Pisum sativum</i>)	23-73	17-244
Fava (<i>Vicia faba</i>)	64-92	53-330
Tremoço (<i>Lupinus angustifolius</i>)	29-97	32-288
Soja (<i>Glycin max</i>)	0-95	0-450
Amendoim (<i>Arachis hypogea</i>)	22-99	37-206
Feijão vulgar (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	0-73	0-125
Feijão-frade (<i>V. unguiculata</i>)	32-89	9-201
Luzerna (<i>Medicago sativa</i>)	46-92	90-386
Trevo branco (<i>Trifolium repens</i>)	62-93	54-291
Red clover (<i>T. Pratense</i>)	35-87	69-373
Trevo subterrâneo (<i>T. subterraneum</i>)	50-93	2-206

Recolhido por Peoples e Craswell (1992), Herridge *et al*, (1993), e Peoples *et al*, (1994a). Dados adicionais de Jensen (1987)- ervilha, Evans *et al*, (1989), Tremoço e fava, Hardarson *et al*, (1993)- feijão vulgar.

Considerando Portugal, como o enquadramento geográfico e o grão-de-bico como objeto (sendo hospedeiro específico de *Mesorhizobium spp.*) deste estudo, pode inferir-se que existe potencialidade para esta cultura, pois há bastante área agrícola disponível, com solos com uma gestão que têm conduzido a uma degradação progressiva e sub aproveitados. Portugal e em particular o centro e sul do país tiveram grande tradição da cultura de cereal, que recentemente tem tido uma diminuição desta produção. Aliar uma eficiente simbiose entre *Mesorhizobium spp.* e grão-de-bico, torna assim possível melhorar a fertilidade dos solos portugueses para posterior utilização de outras culturas (e.g. cerealíferas), tendo ainda o retorno benéfico que é a produção de grão para alimentação humana e animal. Um bom sistema de rotação de culturas, com a utilização de leguminosa e seu manejo otimizado, pode trazer benefícios a médio prazo tanto socio económicos como ambientais. Um bom manejo, no caso do grão é a colheita de corte, pois a raiz da planta após a colheita, permanecendo no solo, aumenta a sua fertilidade. Pela tabela 10, podemos verificar que o potencial desta planta em fixar azoto é mais baixo que as restantes leguminosas, mas pode aumentar-se o nível de azoto no solo, alargando o tempo da cultura no solo, com o aumento da sua biomassa.

Na estação invernal, plantas de grão-de-bico que nodulam e fixam azoto, tornam-se vantajosas, pois por terem um ciclo vegetativo mais alargado e disponibilidade de água produzem mais biomassa vegetal e assim aumentam o rendimento do grão-de-bico.

Se não formar nódulos efetivos e fixar azoto, aquando da ocorrência de baixas temperaturas durante o Inverno, o grão-de-bico irá crescer consumindo o azoto disponível do solo, o que torna assim, uma desvantagem para a cultura durante a Primavera, pois esta verá limitadas as disponibilidades de azoto para a produção de grão.

Inoculando uma estirpe que seja eficaz a fixar azoto atmosférico, como a estirpe S15, que possui ES=79% e nodula bem a baixas temperaturas, logo nos primeiros estádios de desenvolvimento, então a estirpe irá beneficiar a produção de biomassa, resultando num aumento de produtividade e enriquecendo o solo em azoto orgânico, que posteriormente poderá ser usado por outras culturas sem adição de adubo na forma sintética, a qual atenua os efeitos adversos provocados no ambiente.

7. Considerações Finais (Perspetivas)

O sucesso da inoculação exige que uma estirpe inoculante seja altamente eficaz na fixação de azoto e altamente competitivo contra as estirpes indígenas na formação de nódulos. A fixação de azoto no grão-de-bico é realizada por duas espécies do género *Mesorhizobium*, *M. ciceri* (Nour *et al*, 1994) e *M. mediterraneum* (Nour *et al*, 1995). A simbiose entre rizóbio e grão-de-bico e sua especificidade foi recentemente estudada em vários países-Tunísia (Aouani *et al*, 2001a), Marrocos (Maatallah *et al*, 2002), Canadá (Kyei-Boahen *et al*, 2002), Turquia (Icgen *et al*, 2002) e Portugal (Laranjo *et al*, 2001, 2002; Romdhane, 2007).

A melhoria da eficiência da fixação simbiótica de azoto em leguminosas cultivadas sob condições de frio pode trazer grandes benefícios para a agricultura. Estima-se que o estabelecimento de uma simbiose efetiva uma semana mais cedo na estação de crescimento pode duplicar a quantidade de azoto fixado e aumentar a produtividade das culturas de leguminosas (Sprent 1979, Prévost *et al*, 2004). Nas nossas condições e no que se refere á cultura de grão-de-bico, a antecipação da data de sementeira fez com que as fases iniciais da cultura se façam sob temperaturas médias do solo muitas vezes abaixo dos 10°C aos 10 cm de profundidade, que condicionam, como vimos no presente estudo, o crescimento de *Mesorhizobium*, e assim, o sucesso da nodulação a baixa temperatura. Assim sendo, a seleção de inoculantes para leguminosas de sementeira Outono/Invernal, usando o crescimento e capacidade de nodular a baixa temperatura como critério, terá naturalmente consequência na capacidade fixadora de azoto e, por essa via, impacto redução da incorporação de fertilizantes azotados com as desejáveis consequências ambientais que daí resultam.

O aumento do papel de biofertilizantes como rizóbios reduziria a necessidade de fertilizantes químicos e diminuiria os efeitos ambientais adversos. Portanto, no desenvolvimento e implementação do desenvolvimento sustentável das técnicas de agricultura, a bio-fertilização é de grande importância para atenuar a poluição ambiental e a degradação do ambiente (Elkoca *et al*, 2008).

No sentido de se obter estirpes inoculantes eficientes, tolerantes às condições de stress ambiental, é importante estudar os mecanismos envolvidos na resposta ao stress. (Laranjo e Oliveira, 2010).

A tolerância ao stress dos rizóbios é válida para melhoria das estirpes na agricultura e na bio remediação dos solos e por isso é de alta importância biotecnológica, desde que é mais prático e menos dispendioso selecionar naturalmente estirpes de rizóbio tolerantes, que transformar estirpes geneticamente modificadas, para esse efeito. (Laranjo e Oliveira, 2010).

Estudos futuros para determinar a base da adaptação ao frio em simbiose devem incluir alguns aspetos da interação microsimbionte-planta, como a determinação da base molecular da competição, colonização da raiz, infeção e atividade da nitrogenase em nódulos (Prevost *et al*, 2004).

8. Bibliografia

- Abberton, M. et al, (1998). Characterization of novel inbred lines of white clover (*Trifolium repens* L.). Dynamics of plant growth and nodule development in flowing solution culture. *Euphytica* 103, 35–43.
- Alexandre, A. et al, (2006). Natural Populations of Chickpea Rhizobia Evaluated by Antibiotic Resistance Profiles and Molecular Methods. *Microbial Ecology*. 51: 128–136).
- Aouani, M. et al, (2001a) Characterization of rhizobia nodulating chickpea in Tunisia. *Agronomie* 21:577–581
- Atkins, C. (1984). Efficiencies and inefficiencies in the legume/ Rhizobium symbiosis—A review. *Plant Soil* 82, 273–284.
- Romdhane, B. et al, (2007a). Inefficient nodulation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in the arid and Saharan climates in Tunisia by *Sinorhizobium meliloti* biovar *medicaginis*. *Annals of Microbiology* 57, 15–20.
- Cadahía, E. et al, (1986). Indigenous plasmids and cultural characteristics of rhizobia nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *Archives Microbiology* 146, 239–244.
- Cassman, K. et al (2002). Agroecosystems, nitrogen-use efficiency, and nitrogen management. *Ambio* 31, 132–140.
- Crutzen, P. & Ehhalt, D. (1977). Effects of nitrogen fertilizers and combustion on the stratospheric ozone layer. *Ambio* 6, 112–117.
- Davidson, E. & Kinglerlee, W. (1997). A global inventory of nitric oxide emissions from soils. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 48, 37–50.
- Date, R. & Ratcliff, D. (1989). Growth, nodulation and nitrogen fixation in *Stylosanthes* : effect of different root temperatures and two shoot temperatures. *Experimental Agriculture* , 25, 447–460.
- Delvin, R. (1975). Plant physiology. 3rd edition. D Van Nostrand Company, New York 600p.
- Duarte, I. et al, T.P. (1992). Duas novas cultivares de grão-de-bico para sementeira antecipada de Outono: ELMO e ELVAR. *Pastagens E Forragens* 13, 125–134.
- Fillery, I. (1999). Monitoring water and nutrient fluxes down the profile: closing the nutrient budget. In: Rengel, Z. (Ed.), *Mineral Nutrition of Crops*. Food Products Press, New York, pp. 289–325.
- Fillery, I. (2001). The fate of biologically fixed nitrogen in legume-based dryland farming systems: a review. *Aust. J. Exp. Agric.* 41, 361–381.
- Freiberg, C. et al (1997) Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and leguminosas. *Nature* 387, 394–401.
- George, T. et al (1994). Legumes as nitrate catch crops during the dry-to-wet transition in lowland rice cropping systems. *Agron. J.* 86, 267–273.

- Gepts, P. et al (2005). Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference. *Plant Physiology* 137: 1228–1235.
- Gibson, A. (1971). Factors in the physical and biological environment affecting nodulation and nitrogen fixation by legumes. *Plant and Soil Special Volume*, 139–152.
- Giller, K. & Cadisch, G. (1995). Future benefits from biological nitrogen fixation: an ecological approach to agriculture. *Plant Soil* 174, 255–277.
- Graham, P. & Vance C. (2003). Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* 131: 872 – 877.
- Hafeez, F. et al (1988). Effect of salinity and inoculation on growth, nitrogen fixation and nutrient uptake of *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Plant and Soil*, 106: 3-8.
- Hardarson, G. & Jones, D. (1979). Effect of temperature on competition amongst strains of *Rhizobium trifolii* for nodulation of two white clover varieties. *Ann. Appl. Biol.* 92: 229–236.
- Harper, J. & Gibson, A. (1984). Differential Nodulation Tolerance to Nitrate Among Legume Species *Crop Sci.* 24: 797–801.
- Hernandez, M. (2005) *Phenotypic Characterization of Rhizobia That Nodulate Ball Clover*, Texas A. & M. University.
- Houghton, J. et al (2001). *Climate Change 2001: The Scientific Basis. Contribution of Working Group I to the Third Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Howarth, R. et al (2002). Nitrogen use in the United States from 1961–2000 and potential future trends. *Ambio* 31, 88–96.
- Hungria, M. & Bohrer, T. (2000). Variability of nodulation and dinitrogen fixation capacity among soybean cultivars. *Biology and Fertility of Soils* 31, 45–52.
- Juergens-Gschwind, S. (1989), Groundwater nitrates in other developed countries (Europe)—relationships to land use patterns. In: Follet, R.F. (Ed.), *Nitrogen Management and Groundwater Protection.* Elsevier, Amsterdam, pp. 75–138.
- Junior, M. et al (2004), Effect of root temperature on nodule development of bean, lentil and pea, *Soil Biology & Biochemistry* 37 (2005) 235–239.
- Kahindi, J. et al (1997). Agricultural intensification, soil biodiversity and ecosystem function in the tropics: the role of nitrogen-fixing bacteria. *Applied Soil Ecology*, 6, 55–76.
- Kantar, F. et al (2003). Chickpea yields in relation to *Rhizobium* inoculation from wild chickpea at high altitudes. *Journal of Agronomy and Crop Science* 189, 291–297.
- Laranjo et al (2001). Rhizobia of chickpea from southern Portugal: symbiotic efficiency and genetic diversity, *Journal of Applied Microbiology* 2001, 90, 662±667.
- Laranjo et al (2002). Comparison of chickpea rhizobia isolates from diverse Portuguese natural populations based on symbiotic effectiveness and DNA fingerprint, *Journal of Applied Microbiology* 2002, 92, 1043–1050.
- Laranjo, M. et al (2004). High diversity of chickpea *Mesorhizobium* species isolated in a Portuguese agricultural region. *FEMS Microbiology Ecology* 48, 101–107.

- Larsson, L. et al (1998). Ammonia and nitrous oxide emissions from grass and alfalfa mulches. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 51, 41–46.
- Lee, J. & Song, S. (2007). Evaluation of groundwater quality in coastal areas: implications for sustainable agriculture. *Environmental Geology.* 52: 1231-1242.
- Lindemann, W. & Ham, G. (1979). Soybean plant growth, nodulation, and nitrogen fixation as affected by root temperature. - *Soil Sci. Soc. Am. J.* 43: 1134-1137.
- Matson, P. et al (1998). Integration of environmental, agronomic, and economic aspects of fertilizer management. *Science* 280, 112–115.
- Michiles, J. et al (1994). Effects of temperature stress on bean nodulating *Rhizobium* strains. *Appl Environ Microbiol.*, 1206-1212.
- Mwanamwenge, J. et al (1998). Growth, seed yield and water use of faba bean (*Vicia faba* L.) in a short-season Mediterranean-type environment *Australian Journal of Experimental Agriculture* 38, 171-180.
- Naeem F. et al (2008), *PISUM SATIVUM-RHIZOBIUM* INTERACTIONS UNDER DIFFERENT ENVIRONMENTAL STRESSES, *Pak. J. Bot.*, 40(6): 2601-2612, 2008.
- Nene, Y. & Reddy M. (1987). Chickpea diseases and their control. In: M.C. Saxena & K.B. Singh (Eds). *The Chickpea*. p. 233-270. C A B International, Wallingford, Oxon, U.K.
- Nour, S. et al (1994). *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *Int J Syst Bacteriol* 44: 511 522.
- Nour, S. et al (1995). Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 45: 640–648.
- NRC (National Research Council), (2001). *Climate Change Science: An Analysis of Some Key Questions*. National Academy Press, Washington, DC.
- Ogutçu et al (2008), The Determination of Symbiotic Effectiveness of *Rhizobium* Strains Isolated from Wild Chickpeas Collected from High Altitudes in Erzurum, *Turk J Agric For* 32:241-248.
- O Clima de Portugal, Normais Climatológicas da Região de “Alentejo e Algarve” correspondentes a 1951-1980, Fascículo XLIX, Volume 4- 4ª Região, *Instituto Nacional de Meteorologia e Geofísica*, Lisboa, 1991.
- Pan, B. & Smith, D. (1998). Genistein and daidzein concentrations and contents in seedling roots of three soybean cultivars grown under three root zone temperatures. *Journal of Agronomy and Crop Science* 180, 77–82.
- Pankurst, C. & Layzell, D. (1984). The effect of bacterial strain and temperature changes on the nitrogenase activity of *Lotus pedunculatus* root nodules. *Physiol. Plant.* 62: 404–409.
- Peoples, M. et al (1995a). Minimizing gaseous losses of nitrogen. In: Bacon, P.E. (Ed.), *Nitrogen-Fertilization in the Environment*. Marcel Dekker, New York, pp. 565–602.
- Peoples, M. et al (1995b). Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production. *Plant Soil* 174, 3–28.

- Poustini, K. et al (2004). Low root zone temperature effects on bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants inoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv. Phaseoli pre-incubated with methyl jasmonate and/or genistein, *Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science*, 2005; 55: 293-298.
- Prévost, D. et al (1999). The potential use of cold-adapted rhizobia to improve nitrogen fixation in legumes cultivated in temperate regions. In *Biotechnological applications of cold-adapted organisms*. Edited by R. Margesin and F. Schinner. Springer-Verlag, Berlin. pp. 161-176.
- Prévost, D. et al (2004), Cold-adapted rhizobia for nitrogen fixation in temperate regions, *Special Issue on Plant and Microbe Adaptations to Cold*.
- Rabalais et al (2002). Nutrient-enhanced productivity in the northern Gulf of Mexico: past, present and future. *Hydrobiologia* 475-476, 39-63.
- Reed, W. et al (1987). The chickpea insect pests and their control. In: M.C. Saxena & K.B. Singh (Eds). *The Chickpea*. p. 283-318. C A B International, Wallingford, Oxon, U.K.
- Ribeiro O., et al (1988). *Geografia de Portugal - O Ritmo Climático e a Paisagem*, Vol II. Edições João Sá da Costa, Lisboa.
- Rigby, D. & Caceres, D. (2001). Organic farming and the sustainability of agricultural systems. *Agricultural Systems*. 68: 21-40.
- Ritchie, G. (1989). The chemical behaviour of aluminium, hydrogen and manganese in acid soils. In: Robson, A.D. (Ed.), *Soil Acidity and Plant Growth*. Academic Press, Sydney, pp. 1- 60.
- Rivas- Martínez, et al (2007). Strains of *Mesorhizobium amorphae* and *Mesorhizobium tianshanense*, carrying symbiotic genes of common chickpea endosymbiotic species, constitute a novel biovar (ciceri) capable of nodulating *Cicer arietinum*. *Letters in Applied Microbiology* 44, 412-418.
- Rivas-Martínez (2005). *Avances en Geobotánica. Discurso de Apertura del Curso Académico de la Real Academia Nacional de Farmacia de año 2005*, Madrid. 142p.
- Robertson, G. et al (2000). Greenhouse gases in intensive agriculture: contributions of individual gases to the radiative forcing of the atmosphere. *Science* 289, 1300- 1922.
- Romdhane, S. et al (2009) The diversity of rhizobia nodulating chickpea (*Cicer arietinum*) under water deficiency as a source of more efficient inoculants, *Soil Biology & Biochemistry* 41 2568-2572.
- Roughley, R. (1970). The influence of root temperature, *Rhizohium* strain and host selection on the structure and nitrogenfixing efficiency of the root nodule.i of *Trifolium subterraneum*. - *Ann. Bot*, 34: 631-646.
- Sario.lu, G. et al (1993). Selection of effective nodosity bacteria (*Rhizobium leguminosarum* biovar. viceae) from lentil grown in Elazi.. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 17: 569-573.
- Schindler, D. (1978). Factors regulating phytoplankton production and standing crop in the world's freshwaters. *Limnol. Oceanogr.* 23, 478-486.

- Singh, K. (1993). Problems and prospects of stress resistance breeding in chickpea. In: Breeding for Stress Tolerance in Cool-season Food Leguminosae (Eds.: K.B. Singh and M.C. Saxena). John Wiley & Sons, Chichester, pp. 17-37.
- Singh, K. (1997). Chickpea (*Cicer arietinum* L.). Field Crops Research 53, 161-170. Turner, N.C., Wright, G.C., Siddique, K.H.M., 2001. Adaptation of grain leguminosae (pulses) to water limited environments. Advances in Agronomy 71, 193-231.
- Singleton, P. (2004) Bacteria in biology, biotechnology and medicine. 6th ed. John Wiley & Sons Ltd. England.
- Smil, V. (2001). Enriching the Earth. MIT Press, Cambridge, MA.
- Smil, V. (2002). Biofixation and nitrogen in the biosphere and in global food production. In: Finan, T., O'Brian, M., Layzell, D., Vessey, K., Newton, W. (Eds.), Nitrogen Fixation: Global Perspectives. CAB International, UK, pp. 7-9.
- Somasegaran, P. & Hoben, H. (1994) Handbook for Rhizobia- 2,3 Methods in Leguminosa-*Rhizobium* Technology. Springer Verlag, NY, USA.
- Sanchez, P. (2002). Soil fertility and hunger in Africa. Science, 295, 201-202.
- Sprent, J. (1979). The biology of nitrogen-fixing organisms. McGraw-Hill Book Company Ltd., New York.
- Crews, T. & Peoples M. (2004) / Agriculture, Ecosystems and Environment 102 279-297
- Tavares de Sousa, M. & Duarte, I. (1990) *Ascochyta rabiei* em grão-de-bico. Estratégia de melhoramento. Pastagens E Forragens 11, 179±189.
- Vincent, J. (1977). Rhizobium General biology. In: A treatise on Dinitrogen Fixation Section-III. (Eds.): R.W.F. Hardy and W.S. Silver. John Wiley and Sons, New York. pp. 237- 266.
- Vitousek, P. et al (1997). Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. Ecol. Appl. 7, 737-750.
- Young, J. et al (2006). The genome of *Rhizobium leguminosarum* has recognizable core and accessory components. Genome
- Willey, J. et al (2009) Prescott's *Principles of Microbiology*, McGraw-Hill.
- Zhang, F. & Smith, D. (1994). Effects of low root zone temperatures on the early stages of symbiosis establishment between soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] and *Bradyrhizobium japonicum*. Journal of Experimental Botany 45, 1467-1473.
- Zhang, F. et al (1995). Impact of low root zone temperatures in soybean [*Glycine max* (L.) Merr] on nodulation and nitrogen fixation. Environmental and Experimental Botany, 35, 279-285.
- <http://www.prof2000.pt/>

Anexos

Solução nutritiva

Valores por 5L de Volume

$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -----1,75 gramas

$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ -----0,200 gramas

KH_2PO_4 -----0,055 gramas

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ----- 1,250 gramas

KSO_4 -----1,050 gramas

CaCl -----0,280 gramas

Sequestrene-----0,110 gramas

Micronutrientes (Volume= 100ml)

H_3BO_3 -----0,286 gramas

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -----0,208 gramas

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -----0,022 gramas

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -----0,010 gramas

Na_2MoO_4 -----0,012 gramas

Pipetar 5 ml para cada Volume de 5L de solução nutritiva

MLA- (Manitol Levedura Agar)

Manitol 10 gramas

$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,675 gramas

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 gramas

NaCl 0,1 gramas
 Estrato de levedura 0,5 gramas
 Bacto Agar 15 gramas
 Água destilada 1L

Junta-se tudo, exceto o Bacto Agar, que só se junta depois de ajustar o pH que é entre 7 e 7,2. Vai a dissolver e finalmente esteriliza-se a 121 ° Centígrados por 15 minutos.

PBS-A

(pH 7,2)- 0,8% NaCl -0,02% KH₂PO₄ -0,144% Na₂HPO₄.2H₂O

Titulo : Comparação do crescimento de todas as estirpes a 12 graus para o 2º DAI

Case Range : 2199 - 2240
 Variable 6 : ABS
 Function : RANGE

Error Mean Square = 0.002000
 Error Degrees of Freedom = 1680
 No. of observations to calculate a mean = 5

Student-Neuman-Keul's Multiple Range Test
 s_α = 0.02000 at alpha = 0.050
 x

	Original Order			Ranked Order	
Mean	1 =	0.03400	A	Mean	21 = 0.05440 A
Mean	2 =	0.03860	A	Mean	22 = 0.04360 A
Mean	3 =	0.02560	A	Mean	9 = 0.04060 A
Mean	4 =	0.02300	A	Mean	17 = 0.04040 A
Mean	5 =	0.02260	A	Mean	30 = 0.03960 A
Mean	6 =	0.02640	A	Mean	41 = 0.03940 A
Mean	7 =	0.02860	A	Mean	2 = 0.03860 A
Mean	8 =	0.03480	A	Mean	23 = 0.03820 A
Mean	9 =	0.04060	A	Mean	25 = 0.03740 A
Mean	10 =	0.02860	A	Mean	26 = 0.03720 A
Mean	11 =	0.02920	A	Mean	34 = 0.03700 A
Mean	12 =	0.02680	A	Mean	33 = 0.03680 A
Mean	13 =	0.02920	A	Mean	42 = 0.03580 A
Mean	14 =	0.02800	A	Mean	40 = 0.03580 A
Mean	15 =	0.02820	A	Mean	18 = 0.03500 A
Mean	16 =	0.03300	A	Mean	8 = 0.03480 A
Mean	17 =	0.04040	A	Mean	20 = 0.03440 A
Mean	18 =	0.03500	A	Mean	1 = 0.03400 A
Mean	19 =	0.02940	A	Mean	31 = 0.03400 A
Mean	20 =	0.03440	A	Mean	35 = 0.03360 A

Mean	21 =	0.05440	A	Mean	27 =	0.03360	A
Mean	22 =	0.04360	A	Mean	24 =	0.03320	A
Mean	23 =	0.03820	A	Mean	16 =	0.03300	A
Mean	24 =	0.03320	A	Mean	28 =	0.03260	A
Mean	25 =	0.03740	A	Mean	38 =	0.03220	A
Mean	26 =	0.03720	A	Mean	32 =	0.03160	A
Mean	27 =	0.03360	A	Mean	39 =	0.03140	A
Mean	28 =	0.03260	A	Mean	29 =	0.03140	A
Mean	29 =	0.03140	A	Mean	37 =	0.03140	A
Mean	30 =	0.03960	A	Mean	36 =	0.02960	A
Mean	31 =	0.03400	A	Mean	19 =	0.02940	A
Mean	32 =	0.03160	A	Mean	11 =	0.02920	A
Mean	33 =	0.03680	A	Mean	13 =	0.02920	A
Mean	34 =	0.03700	A	Mean	10 =	0.02860	A
Mean	35 =	0.03360	A	Mean	7 =	0.02860	A
Mean	36 =	0.02960	A	Mean	15 =	0.02820	A
Mean	37 =	0.03140	A	Mean	14 =	0.02800	A
Mean	38 =	0.03220	A	Mean	12 =	0.02680	A
Mean	39 =	0.03140	A	Mean	6 =	0.02640	A
Mean	40 =	0.03580	A	Mean	3 =	0.02560	A
Mean	41 =	0.03940	A	Mean	4 =	0.02300	A
Mean	42 =	0.03580	A	Mean	5 =	0.02260	A

3° DAI

Case Range : 2241 - 2282

Variable 6 : ABS

Function : RANGE

Error Mean Square = 0.002000

Error Degrees of Freedom = 1680

No. of observations to calculate a mean = 5

Student-Neuman-Keul's Multiple Range Test

$s_{\bar{x}} = 0.02000$ at alpha = 0.050

\bar{x}

Original Order				Ranked Order			
Mean	1 =	0.03580	A	Mean	26 =	0.07360	A
Mean	2 =	0.04160	A	Mean	25 =	0.05380	A
Mean	3 =	0.02680	A	Mean	21 =	0.05160	A
Mean	4 =	0.02240	A	Mean	2 =	0.04160	A
Mean	5 =	0.02440	A	Mean	34 =	0.04080	A
Mean	6 =	0.02720	A	Mean	33 =	0.04060	A
Mean	7 =	0.03160	A	Mean	30 =	0.03960	A
Mean	8 =	0.03240	A	Mean	27 =	0.03900	A
Mean	9 =	0.03420	A	Mean	22 =	0.03900	A
Mean	10 =	0.02940	A	Mean	1 =	0.03580	A
Mean	11 =	0.03160	A	Mean	31 =	0.03540	A
Mean	12 =	0.02880	A	Mean	18 =	0.03520	A
Mean	13 =	0.03020	A	Mean	23 =	0.03480	A
Mean	14 =	0.02740	A	Mean	35 =	0.03480	A
Mean	15 =	0.02960	A	Mean	17 =	0.03440	A
Mean	16 =	0.03100	A	Mean	9 =	0.03420	A
Mean	17 =	0.03440	A	Mean	20 =	0.03400	A
Mean	18 =	0.03520	A	Mean	28 =	0.03360	A

Mean	19	=	0.02780	A	Mean	37	=	0.03320	A
Mean	20	=	0.03400	A	Mean	29	=	0.03320	A
Mean	21	=	0.05160	A	Mean	39	=	0.03280	A
Mean	22	=	0.03900	A	Mean	32	=	0.03280	A
Mean	23	=	0.03480	A	Mean	24	=	0.03260	A
Mean	24	=	0.03260	A	Mean	8	=	0.03240	A
Mean	25	=	0.05380	A	Mean	38	=	0.03180	A
Mean	26	=	0.07360	A	Mean	11	=	0.03160	A
Mean	27	=	0.03900	A	Mean	7	=	0.03160	A
Mean	28	=	0.03360	A	Mean	16	=	0.03100	A
Mean	29	=	0.03320	A	Mean	42	=	0.03100	A
Mean	30	=	0.03960	A	Mean	36	=	0.03040	A
Mean	31	=	0.03540	A	Mean	13	=	0.03020	A
Mean	32	=	0.03280	A	Mean	41	=	0.02980	A
Mean	33	=	0.04060	A	Mean	15	=	0.02960	A
Mean	34	=	0.04080	A	Mean	10	=	0.02940	A
Mean	35	=	0.03480	A	Mean	12	=	0.02880	A
Mean	36	=	0.03040	A	Mean	40	=	0.02840	A
Mean	37	=	0.03320	A	Mean	19	=	0.02780	A
Mean	38	=	0.03180	A	Mean	14	=	0.02740	A
Mean	39	=	0.03280	A	Mean	6	=	0.02720	A
Mean	40	=	0.02840	A	Mean	3	=	0.02680	A
Mean	41	=	0.02980	A	Mean	5	=	0.02440	A
Mean	42	=	0.03100	A	Mean	4	=	0.02240	A

4° DAI

Case Range : 2283 - 2324

Variable 6 : ABS

Function : RANGE

Error Mean Square = 0.002000

Error Degrees of Freedom = 1680

No. of observations to calculate a mean = 5

Student-Neuman-Keul's Multiple Range Test

$s_{\bar{x}}$ = 0.02000 at alpha = 0.050

\bar{x}

Original Order					Ranked Order				
Mean	1	=	0.06320	A	Mean	33	=	0.09240	A
Mean	2	=	0.06740	A	Mean	26	=	0.08600	A
Mean	3	=	0.03160	A	Mean	21	=	0.07260	A
Mean	4	=	0.02100	A	Mean	25	=	0.07160	A
Mean	5	=	0.01980	A	Mean	34	=	0.07100	A
Mean	6	=	0.02240	A	Mean	2	=	0.06740	A
Mean	7	=	0.03000	A	Mean	27	=	0.06480	A
Mean	8	=	0.03360	A	Mean	18	=	0.06440	A
Mean	9	=	0.03720	A	Mean	37	=	0.06400	A
Mean	10	=	0.03520	A	Mean	1	=	0.06320	A
Mean	11	=	0.05860	A	Mean	36	=	0.05980	A
Mean	12	=	0.04380	A	Mean	11	=	0.05860	A
Mean	13	=	0.05000	A	Mean	35	=	0.05820	A
Mean	14	=	0.02860	A	Mean	32	=	0.05820	A
Mean	15	=	0.02960	A	Mean	31	=	0.05740	A
Mean	16	=	0.03860	A	Mean	19	=	0.05740	A

Mean 17 = 0.04840 A	Mean 30 = 0.05400 A
Mean 18 = 0.06440 A	Mean 22 = 0.05280 A
Mean 19 = 0.05740 A	Mean 29 = 0.05180 A
Mean 20 = 0.04420 A	Mean 39 = 0.05020 A
Mean 21 = 0.07260 A	Mean 13 = 0.05000 A
Mean 22 = 0.05280 A	Mean 38 = 0.04880 A
Mean 23 = 0.04080 A	Mean 24 = 0.04860 A
Mean 24 = 0.04860 A	Mean 17 = 0.04840 A
Mean 25 = 0.07160 A	Mean 28 = 0.04540 A
Mean 26 = 0.08600 A	Mean 20 = 0.04420 A
Mean 27 = 0.06480 A	Mean 12 = 0.04380 A
Mean 28 = 0.04540 A	Mean 23 = 0.04080 A
Mean 29 = 0.05180 A	Mean 16 = 0.03860 A
Mean 30 = 0.05400 A	Mean 9 = 0.03720 A
Mean 31 = 0.05740 A	Mean 10 = 0.03520 A
Mean 32 = 0.05820 A	Mean 41 = 0.03400 A
Mean 33 = 0.09240 A	Mean 8 = 0.03360 A
Mean 34 = 0.07100 A	Mean 40 = 0.03340 A
Mean 35 = 0.05820 A	Mean 3 = 0.03160 A
Mean 36 = 0.05980 A	Mean 42 = 0.03140 A
Mean 37 = 0.06400 A	Mean 7 = 0.03000 A
Mean 38 = 0.04880 A	Mean 15 = 0.02960 A
Mean 39 = 0.05020 A	Mean 14 = 0.02860 A
Mean 40 = 0.03340 A	Mean 6 = 0.02240 A
Mean 41 = 0.03400 A	Mean 4 = 0.02100 A
Mean 42 = 0.03140 A	Mean 5 = 0.01980 A

5° DAI

Case Range : 2325 - 2366 DIA 5
 Variable 6 : ABS
 Function : RANGE

Error Mean Square = 0.002000
 Error Degrees of Freedom = 1680
 No. of observations to calculate a mean = 5

Student-Neuman-Keul's Multiple Range Test
 $s_{\bar{x}} = 0.02000$ at alpha = 0.050

Original Order			Ranked Order		
Mean 1 = 0.1224	ABCDEF	Mean 26 = 0.2014	A		
Mean 2 = 0.1082	BCDEF	Mean 33 = 0.1802	AB		
Mean 3 = 0.06920	CDEF	Mean 18 = 0.1668	ABC		
Mean 4 = 0.03020	EF	Mean 25 = 0.1544	ABCD		
Mean 5 = 0.02480	F	Mean 37 = 0.1382	ABCDE		
Mean 6 = 0.03140	EF	Mean 21 = 0.1308	ABCDEF		
Mean 7 = 0.05780	DEF	Mean 1 = 0.1224	ABCDEF		
Mean 8 = 0.02280	F	Mean 36 = 0.1194	ABCDEF		
Mean 9 = 0.02580	EF	Mean 31 = 0.1102	BCDEF		
Mean 10 = 0.04180	EF	Mean 2 = 0.1082	BCDEF		
Mean 11 = 0.1022	BCDEF	Mean 11 = 0.1022	BCDEF		
Mean 12 = 0.08280	BCDEF	Mean 27 = 0.09800	BCDEF		
Mean 13 = 0.08700	BCDEF	Mean 34 = 0.09420	BCDEF		
Mean 14 = 0.02160	F	Mean 29 = 0.08720	BCDEF		

Mean 15 = 0.02300	F	Mean 22 = 0.08700	BCDEF
Mean 16 = 0.05160	DEF	Mean 13 = 0.08700	BCDEF
Mean 17 = 0.07140	CDEF	Mean 12 = 0.08280	BCDEF
Mean 18 = 0.1668	ABC	Mean 32 = 0.07520	CDEF
Mean 19 = 0.07240	CDEF	Mean 30 = 0.07280	CDEF
Mean 20 = 0.06320	CDEF	Mean 19 = 0.07240	CDEF
Mean 21 = 0.1308	ABCDEF	Mean 17 = 0.07140	CDEF
Mean 22 = 0.08700	BCDEF	Mean 35 = 0.07100	CDEF
Mean 23 = 0.04920	DEF	Mean 3 = 0.06920	CDEF
Mean 24 = 0.05020	DEF	Mean 20 = 0.06320	CDEF
Mean 25 = 0.1544	ABCD	Mean 7 = 0.05780	DEF
Mean 26 = 0.2014	A	Mean 39 = 0.05780	DEF
Mean 27 = 0.09800	BCDEF	Mean 38 = 0.05320	DEF
Mean 28 = 0.04820	DEF	Mean 16 = 0.05160	DEF
Mean 29 = 0.08720	BCDEF	Mean 24 = 0.05020	DEF
Mean 30 = 0.07280	CDEF	Mean 23 = 0.04920	DEF
Mean 31 = 0.1102	BCDEF	Mean 28 = 0.04820	DEF
Mean 32 = 0.07520	CDEF	Mean 10 = 0.04180	EF
Mean 33 = 0.1802	AB	Mean 40 = 0.03300	EF
Mean 34 = 0.09420	BCDEF	Mean 41 = 0.03240	EF
Mean 35 = 0.07100	CDEF	Mean 6 = 0.03140	EF
Mean 36 = 0.1194	ABCDEF	Mean 4 = 0.03020	EF
Mean 37 = 0.1382	ABCDE	Mean 42 = 0.02700	EF
Mean 38 = 0.05320	DEF	Mean 9 = 0.02580	EF
Mean 39 = 0.05780	DEF	Mean 5 = 0.02480	F
Mean 40 = 0.03300	EF	Mean 15 = 0.02300	F
Mean 41 = 0.03240	EF	Mean 8 = 0.02280	F
Mean 42 = 0.02700	EF	Mean 14 = 0.02160	F

6° DAI

Case Range : 2367 - 2408

Variable 6 : ABS

Function : RANGE

Error Mean Square = 0.002000

Error Degrees of Freedom = 1680

No. of observations to calculate a mean = 5

Student-Neuman-Keul's Multiple Range Test

$s_x = 0.02000$ at $\alpha = 0.050$

x

Original Order			Ranked Order		
Mean 1 = 0.2464	A		Mean 1 = 0.2464	A	
Mean 2 = 0.1982	ABCDEF		Mean 18 = 0.2430	A	
Mean 3 = 0.1778	ABCDEFG		Mean 26 = 0.2396	A	
Mean 4 = 0.05960		IJK	Mean 25 = 0.2236	AB	
Mean 5 = 0.06260		HIJK	Mean 33 = 0.2154	ABC	
Mean 6 = 0.08020		GHIJK	Mean 31 = 0.2110	ABCD	
Mean 7 = 0.1644	ABCDEF	GH	Mean 37 = 0.2084	ABCDE	
Mean 8 = 0.02440		K	Mean 21 = 0.2062	ABCDE	
Mean 9 = 0.02640		JK	Mean 2 = 0.1982	ABCDEF	
Mean 10 = 0.1000		FGHIJK	Mean 29 = 0.1888	ABCDEF	
Mean 11 = 0.1246	CDEFGHIJK		Mean 3 = 0.1778	ABCDEFG	

Mean 12 = 0.1262	BCDEFGHIJK	Mean 7 = 0.1644	ABCDEFGH
Mean 13 = 0.1338	BCDEFGHIJ	Mean 27 = 0.1526	ABCDEFGHI
Mean 14 = 0.02240	K	Mean 22 = 0.1492	ABCDEFGHI
Mean 15 = 0.02940	JK	Mean 13 = 0.1338	BCDEFGHIJ
Mean 16 = 0.1122	EFGHIJK	Mean 20 = 0.1300	BCDEFGHIJK
Mean 17 = 0.1042	FGHIJK	Mean 12 = 0.126	BCDEFGHIJK
Mean 18 = 0.2430	A	Mean 11 = 0.1246	CDEFGHIJK
Mean 19 = 0.07820	GHIJK	Mean 34 = 0.1146	DEFGHIJK
Mean 20 = 0.1300	BCDEFGHIJK	Mean 16 = 0.1122	EFGHIJK
Mean 21 = 0.2062	ABCDE	Mean 36 = 0.1064	FGHIJK
Mean 22 = 0.1492	ABCDEFGHI	Mean 30 = 0.1052	FGHIJK
Mean 23 = 0.05760	IJK	Mean 17 = 0.1042	FGHIJK
Mean 24 = 0.04680	IJK	Mean 10 = 0.1000	FGHIJK
Mean 25 = 0.2236	AB	Mean 6 = 0.08020	GHIJK
Mean 26 = 0.2396	A	Mean 19 = 0.07820	GHIJK
Mean 27 = 0.1526	ABCDEFGHI	Mean 40 = 0.06640	HIJK
Mean 28 = 0.04000	JK	Mean 35 = 0.06640	HIJK
Mean 29 = 0.1888	ABCDEF	Mean 5 = 0.06260	HIJK
Mean 30 = 0.1052	FGHIJK	Mean 4 = 0.05960	IJK
Mean 31 = 0.2110	ABCD	Mean 39 = 0.05820	IJK
Mean 32 = 0.05540	IJK	Mean 23 = 0.05760	IJK
Mean 33 = 0.2154	ABC	Mean 32 = 0.05540	IJK
Mean 34 = 0.1146	DEFGHIJK	Mean 42 = 0.05060	IJK
Mean 35 = 0.06640	HIJK	Mean 38 = 0.04780	IJK
Mean 36 = 0.1064	FGHIJK	Mean 24 = 0.04680	IJK
Mean 37 = 0.2084	ABCDE	Mean 41 = 0.04000	JK
Mean 38 = 0.04780	IJK	Mean 28 = 0.04000	JK
Mean 39 = 0.05820	IJK	Mean 15 = 0.02940	JK
Mean 40 = 0.06640	HIJK	Mean 9 = 0.02640	JK
Mean 41 = 0.04000	JK	Mean 8 = 0.02440	K
Mean 42 = 0.05060	IJK	Mean 14 = 0.02240	K

A N A L Y S I S O F V A R I A N C E T A B L E

K	graus de	Soma	Média	F	
Valor	Variável	liberdade	Quadrados	Valor	Prob
2	Dias	9	9.996	1.111	734.3800
4	Estirpes	41	3.280	0.080	52.8930
6	Dias*Estirpe	369	3.580	0.010	6.4152
-7	Erro	1680	2.541	0.002	
Total		2099	19.397		

Coefficient of Variation: 34.74%

$s_{\bar{y}}$ for means group 2: 0.0027 Number of Observations: 210

$s_{\bar{y}}$ for means group 4: 0.0055 Number of Observations: 50

$s_{\bar{y}}$ for means group 6: 0.0174 Number of Observations: 5