

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**INTERAÇÃO DE PLANTAS DE TREVO VERMELHO INOCULADAS COM
RIZÓBIOS COM ÁCAROS E COLÊMBOLOS EDÁFICOS**

Victor Lucas Bassani

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Outubro de 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

**INTERAÇÃO DE PLANTAS DE TREVO VERMELHO INOCULADAS COM
RIZÓBIOS COM ÁCAROS E COLÊMBOLOS EDÁFICOS**

Victor Lucas Bassani

Biólogo – Centro Universitário UNIVATES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (Área de Concentração: Microbiologia Agrícola) como requisito para a obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientador: Enilson Luiz Saccol de Sá

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Outubro de 2015

CIP - Catalogação na Publicação

Bassani, Victor Lucas
Interação de plantas de trevo vermelho inoculadas
com rizóbios com ácaros e colêmbolos edáficos /
Victor Lucas Bassani. -- 2015.
78 f.
Orientador: Enilson Luiz Saccol de Sá.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Rizosfera. 2. Rizóbios. 3. Ácaros. 4.
Colêmbolos. I. Saccol de Sá, Enilson Luiz, orient.
II. Título.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá pelo empenho na orientação, atenção, paciência e sobretudo pela amizade e convívio pessoal.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

À UFRGS e aos professores, coordenação funcionários e colegas do PPGMAA pela disponibilidade, ensinamentos e amizade compartilhados.

Aos amigos e familiares do município de Muçum, que sempre me apoiaram e que sempre estiveram em minhas lembranças.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Microbiologia com quem tive o prazer de conviver: Bruna, Clarissa, Franciane, Franquiéle, Gleidson, Márcia, Márcio, Renata, Silviane, Taís, Vítor e Vanessa. Cada um foi fundamental na realização deste trabalho, quer pelos ensinamentos e conhecimento compartilhado, quer pela amizade, convívio pessoal, um convite, um sorriso, uma cerveja, uma palavra amiga, uma carona, e um pouco de paciência comigo.

Ao apoio de minha mãe Nair, mulher forte e batalhadora, que nunca mediu esforços para que eu continuasse seguindo em frente. Apesar da ausência, devo-lhe minha gratidão todos os dias pelos seus ensinamentos, e a tenho com afeto único em meu coração. Sempre te amarei.

Aos amigos que passaram por minha vida, entre chegadas e partidas, ao longo destes dois anos. Foram essenciais para a formação de meu caráter e me ajudaram a se tornar uma pessoa mais confiante, forte e melhor para com seu semelhante.

A todos estes, os tive até então, e sempre os terei em meus pensamentos, para a eternidade.

INTERAÇÃO DE PLANTAS DE TREVO VERMELHO INOCULADAS COM RIZÓBIOS COM ÁCAROS E COLÊMBOLOS EDÁFICOS ¹

Autor: Victor Lucas Bassani

Orientador: Enilson Luiz Saccol de Sá

RESUMO

A mesofauna edáfica, compreendendo ácaros e colêmbolos, é sensível a alterações no solo, sendo considerada um indicador de qualidade, uma vez que realiza a fragmentação de matéria orgânica, controle populacional de determinados grupos da biota do solo e ingestão de microrganismos. A colonização de plantas por micro-organismos, como a de leguminosas por rizóbios, pode levar a mudanças na rizosfera vegetal e influenciar a mesofauna. Este estudo teve por objetivo avaliar o efeito da inoculação de plantas de trevo vermelho com rizóbios sobre os ácaros e colêmbolos edáficos e avaliar se colêmbolos alimentados com rizóbios poderiam inocular plantas hospedeiras. Para isso, plantas de trevo vermelho, inoculadas com as estirpes SEMIA 2081, SEMIA 2082 e SEMIA 222, e plantas controle sem inoculação foram plantadas em tubos-armadilha e inseridas em campo. A seguir, a mesofauna atraída foi extraída e identificada. Outro experimento em laboratório utilizou plantas de trevo vermelho que foram colocadas em contato com colêmbolos da família Hypogastruridae e dos gêneros *Proisotoma*, *Onychiurus* e *Orthonychiurus*, os quais haviam sido alimentados com um substrato impregnado com o rizóbio da estirpe SEMIA 2081. As plantas inoculadas com as três estirpes de rizóbios atraíram ácaros edáficos mas não colêmbolos, quando comparadas com as plantas que não foram inoculadas nem receberam fonte de nitrogênio. Considerando os números totais de ácaros e colêmbolos, somente as plantas inoculadas com a estirpe SEMIA 222 apresentaram atratividade quando comparadas ao controle sem inoculação e sem fonte de nitrogênio. A atratividade de ácaros e colêmbolos observada no tratamento controle com nitrogênio foi similar aos tratamentos inoculados. No experimento de laboratório, os colêmbolos vivos e o macerado de colêmbolos da família Hypogastruridae, e gêneros *Proisotoma* e *Orthonychiurus* foram capazes de transferir os rizóbios que receberam pela alimentação às plantas, formando nódulos radiculares. As plantas que receberam o macerado de colêmbolos da família Hypogastruridae apresentaram maior número de nódulos comparadas às plantas que receberam os mesmos colêmbolos vivos.

¹ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia Agrícola, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (78 p.) Outubro, 2015.

INTERACTION OF RED CLOVER PLANTS INOCULATED WITH RHIZOBIA WITH EDAPHIC MITES AND SPRINGTAILS ²

Author: Victor Lucas Bassani

Advisor: Enilson Luiz Saccol de Sá

ABSTRACT

The soil mesofauna comprising mites and springtails, is sensitive to changes in soil, and it is considered a quality indicator since it performs fragmentation of organic matter, population control of certain soil biota groups and ingestion of microorganisms. The plants colonized by microorganisms, such as legumes by rhizobia can lead to changes in plant rhizosphere and influence mesofauna. This study aimed to evaluate the effect of inoculation of red clover plants with rhizobia on edaphic mites and springtails and assess if springtails fed with rhizobia could inoculate host plants. For this, red clover plants inoculated with strains SEMIA 2081, SEMIA 2082 and SEMIA 222, and control plants without inoculation were planted in trap-tubes and inserted on field. Then, the attracted mesofauna was submitted to extraction and identification. Another laboratory experiment used red clover plants put in contact with springtails. These springtails of Hypogastruridae family and *Proisotoma*, *Onychiurus* and *Orthonychiurus* genera, had been fed with a substrate impregnated with rhizobia strain SEMIA 2081. Plants inoculated with three Rhizobia strains attracted edaphic mites, but not Collembola, when compared to uninoculated plants with no nitrogen source. Considering the total numbers of mites and springtails, only plants inoculated with SEMIA 222 strain showed attractiveness when compared to the control without inoculation and no nitrogen source. The attractiveness of mites and springtails observed in the control treatment with nitrogen was similar to the inoculated treatments. In the laboratory experiment, the living springtails and the macerate of springtails of Hypogastruridae family, and *Proisotoma* and *Orthonychiurus* genera were able to transfer the rhizobia that they received by feeding to the plants, forming root nodules. The plants that received the macerate of springtails of the Hypogastruridae family had a higher number of nodules compared to the plants that received the same living springtails.

²Master of Science dissertation in Agricultural and Environmental – Agricultural Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (78 p.) October, 2015.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. A fauna edáfica	3
2.1.1. Ácaros edáficos.....	5
2.1.2. Colêmbolos edáficos.....	7
2.2. A interação entre planta e rizóbios.....	9
2.3. O efeito do ambiente rizosférico sobre os microrganismos e a mesofauna edáfica	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Obtenção dos colêmbolos e criação em laboratório	15
3.2. Sincronização da idade dos colêmbolos	17
3.3. Preparo do inóculo bacteriano	17
3.4. Desinfestação e pré germinação das sementes de trevo vermelho.....	18
3.5. Descrição da área de instalação do experimento de atratividade de ácaros e colêmbolos edáficos por plantas inoculadas com rizóbios.....	19
3.6. Experimento 1 - Atratividade de ácaros e colêmbolos edáficos por plantas de trevo vermelho inoculadas com diferentes estirpes de rizóbios	20
3.6.1. Preparo dos tubos SR50, cultivo das plantas e inoculação.....	20
3.6.2. Inserção das unidades amostrais na área experimental	23
3.6.3. Extração e identificação dos ácaros e colêmbolos.....	24
3.6.4. Análise estatística e dados ecológicos.....	24
3.7. Experimento 2 - Escolha de substrato para a sobrevivência de colêmbolos e cultivo de plantas de trevo vermelho em laboratório	26
3.7.1. Determinação do pH	27
3.7.2. Determinação da capacidade de retenção de água.....	27
3.7.3. Desenvolvimento de plantas de trevo vermelho.....	28
3.7.4. Sobrevivência dos colêmbolos.....	29
3.8. Experimento 3 - Colonização de plantas de trevo vermelho intermediada por colêmbolos alimentados com rizóbios	30
3.8.1. Preparo dos vasos com as plantas de trevo vermelho.....	31
3.8.2. Criação dos colêmbolos	31
3.8.3. Preparo da alimentação dos colêmbolos	31
3.8.4. Adição dos colêmbolos vivos e da suspensão de colêmbolos macerados nos frascos com plantas de trevo vermelho	33
3.8.5. Análise estatística	34

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1. Identificação dos colêmbolos e criação em laboratório	35
4.2. Atratividade de colêmbolos e ácaros edáficos por plantas de trevo vermelho inoculadas com diferentes estirpes de rizóbios	37
4.3. Avaliação do substrato para a sobrevivência de colêmbolos e cultivo de plantas de trevo vermelho	46
4.3.1. Capacidade de retenção de água e pH dos substratos	46
4.3.2. Sobrevivência de colêmbolos nos substratos	47
4.3.3. Desenvolvimento das plantas nos substratos	49
4.4. Colonização de plantas de trevo vermelho intermediada por colêmbolos alimentados com rizóbios.....	51
5. CONCLUSÕES	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
7. APÊNDICES	65
APÊNDICE 1. Levedura Manitol (LM) (Vincent, 1970).....	66
APÊNDICE 2. Meio de Hoyer (Moraes & Flechtmann, 2008)	67
APÊNDICE 3. Solução Nutritiva (Sarruge, 1975).....	68

LISTA DE TABELAS

	Pág.
TABELA 1. Números totais de indivíduos de ácaros e colêmbolos presentes nos tubos com plantas de trevo vermelho (<i>Trifolium pratense</i>) inoculadas com rizóbios das estirpes SEMIA 2081, SEMIA 2082, SEMIA 222 e tratamento controle T + N (100 Kg ha ⁻¹ de N), controle T - N; e controle contendo somente substrato (sem planta), após 10 dias em campo.....	38
TABELA 2. Valores de média e desvio padrão da riqueza, dominância, índice de Shannon e equitabilidade das famílias de ácaros extraídas de tubos com plantas de trevo vermelho sob o efeito de tratamentos inoculados com rizóbios (SEMIA 2081, SEMIA 2082, SEMIA 222); tratamento controle T + N (planta + N 100 kg ha ⁻¹); e tratamento controle T - N (planta sem adição de N), que foram inseridas em campo.....	45
TABELA 3. Valores de média e desvio padrão da riqueza, dominância, índice de Shannon e equitabilidade das ordens e famílias de colêmbolos extraídas de tubos com plantas de trevo vermelho sob o efeito de tratamentos inoculados com rizóbios (SEMIA 2081, SEMIA 2082, SEMIA 222); tratamento controle T + N (planta + N 100 kg ha ⁻¹); e tratamento controle T - N (planta sem adição de N), que foram inseridas em campo.....	46
TABELA 4. Valores de capacidade de retenção de água e pH das formulações de substrato testadas.....	47
TABELA 5. Número médio de colêmbolos jovens e adultos recuperados após o teste de sobrevivência em formulações de substrato.....	48
TABELA 6. Valores médios de comprimento (cm) e massa seca (mg) de plantas de trevo vermelho cultivadas em diferentes formulações de substrato.....	50
TABELA 7. Número médio de nódulos em plantas de trevo vermelho submetidas a diferentes grupos de colêmbolos que foram alimentados com rizóbios.....	52

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1. Visão geral do corpo de um ácaro.....	5
FIGURA 2. Visão geral do corpo de um colêmbolo.....	7
FIGURA 3. Esquema das armadilhas com tubos SR50 com plantas de trevo vermelho.....	21
FIGURA 4. Esquema mostrando o distanciamento dos pontos de inserção dos tubos em relação à borda da área e em relação aos outros pontos.....	23
FIGURA 5. Colêmbolos da família Hypogastruridae (a), do gênero <i>Orthonychiurus</i> (b), gênero <i>Onychiurus</i> (c) e gênero <i>Proisotoma</i> (d) criados em substrato no laboratório.....	36
FIGURA 6. Médias do número de ácaros, de colêmbolos e totais presentes nos tubos com plantas de trevo vermelho (<i>Trifolium pratense</i>) no tratamento controle T + N (com planta + 100 kg ha ⁻¹ de N); tratamento controle T - N (com planta e sem a aplicação de N); e tratamento controle contendo somente substrato (sem planta).....	41
FIGURA 7. Média do número de ácaros, colêmbolos e totais presentes nos tubos com plantas de trevo vermelho (<i>Trifolium pratense</i>) inoculados com rizóbios SEMIA 2081, SEMIA 2082, SEMIA 222 e tratamento controle T - N.....	42
FIGURA 8. Números médios de ácaros, colêmbolos e totais presentes nos tubos com plantas de trevo vermelho (<i>Trifolium pratense</i>) inoculados com rizóbios SEMIA 2081, SEMIA 2082, SEMIA 222 e tratamento controle T + N.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – Grau Celsius

Cfa – Clima temperado úmido com verão quente

cm – Centímetro

dm – Decímetro

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FBN – Fixação Biológica de Nitrogênio

FEPAGRO – Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária

g – Grama

ha – Hectare

KCl – Cloreto de Potássio

Kg – Quilograma

KNO₃ – Nitrato de Potássio

KOH – Hidróxido de Potássio

L – Litro

LM – Levedura Manitol

MAPA – Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento

mg – Miligrama

mm – Milímetro

mL – Mililitro

N – Nitrogênio

NaCl – Cloreto de Sódio

NH₄ – Amônia

pH – Potencial hidrogeniônico

rpm – Rotações por minuto

SEMIA – Seção Microbiológica Agrícola

ufc – Unidade formadora de colônia

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

1. INTRODUÇÃO

A fauna edáfica tem importância fundamental na manutenção do ecossistema do solo, sendo um elemento ativo na estruturação física e na degradação da matéria orgânica, disponibilizando os nutrientes aos vegetais. Além disso, a fauna edáfica é considerada um indicador de qualidade do solo. A biota do solo é classificada de acordo com seu tamanho corporal, em microfauna, mesofauna e macrofauna. Cada grupo destes organismos exerce uma função na manutenção da estabilidade e da fertilidade do ambiente edáfico.

A mesofauna do edáfica é representada pelos grupos Protura, Diplura, Enchytraeidae, Symphyla, alguns insetos, mas principalmente por ácaros e colêmbolos. Estes artrópodes são os principais responsáveis pela particulação de resíduos vegetais, predação de outros grupos da fauna, consumo de fungos e bactérias, e formação de galerias que permeiam desde a serapilheira superficial até os centímetros iniciais da camada de solo.

O uso de rizóbios para a inoculação de plantas leguminosas tem sido amplamente abordado, tendo por base estudos que demonstram sua aplicabilidade na agricultura. A fixação biológica de nitrogênio (FBN) ocorre a partir de uma associação simbiótica que beneficia tanto a planta hospedeira, que

recebe o nitrogênio atmosférico (N_2) sob a forma disponível de amônia (NH_4), quanto a bactéria (denominada rizóbio) que recebe os compostos fotoassimilados para seu metabolismo.

O ambiente rizosférico é considerado uma interface diferenciada do solo adjacente, sendo bastante afetado pela exudação radicular, o que gera uma intensa atividade e abundante diversidade microbiana, pois é influenciado por substâncias provenientes do metabolismo vegetal.

O constante contato que ocorre entre a planta, a mesofauna e a microbiota no ambiente rizosférico propicia a ocorrência de determinadas relações ecológicas. Nessas relações, ocorre principalmente a alimentação e a disseminação de microrganismos (fungos e bactérias) pela mesofauna edáfica. Além disso, algumas substâncias excretadas pelas plantas ou microrganismos podem exercer o efeito de atração ou repulsão que sobre a mesofauna edáfica. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito de atratividade que plantas de trevo vermelho inoculadas com rizóbios específicos, exercem sobre colêmbolos e ácaros edáficos em campo. Também foi objetivo, verificar em laboratório, o processo de colonização de plantas de trevo vermelho por rizóbios que foram introduzidos no meio através de colêmbolos mantidos em contato com essas bactérias.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A fauna edáfica

O solo está longe de parecer um ambiente estável e imutável que apenas serve de suporte físico para os organismos em sua superfície e base para o crescimento do vegetal. Ele agrega no seu interior uma complexa comunidade de organismos, os quais realizam diversas funções ecológicas (Anderson, 1988; Giller, 1996). O conceito de fauna edáfica aplica-se a toda a comunidade de invertebrados que vive permanentemente, ou a maior parte do seu ciclo de vida no interior do solo (Assad, 1997).

A fauna edáfica é capaz de se distribuir pelo perfil de solo (Baretta, 2007). Sobretudo, é na camada logo abaixo da serapilheira, que estes organismos são mais abundantes, especialmente em áreas de mata (Adis, 1988). No entanto, a fauna edáfica é muito sensível a mudanças de fatores abióticos como temperatura, umidade, pH, estruturação do solo, e disponibilidade de matéria orgânica, sendo estes, fatores determinantes que influenciam a distribuição e abundância da fauna no perfil do solo (Casarino & Nunes, 2008). Considerando que a fauna edáfica apresenta uma estreita relação com as variáveis químicas e microbiológicas do solo, ela se constitui num importante bioindicador para a avaliação e monitoramento da qualidade ambiental (Baretta, 2007).

Do mesmo modo que responde às modificações ambientais, a fauna edáfica tem a capacidade de afetar o solo pelos fatores químicos, físicos e biológicos gerados por sua interação com outros grupos de organismos (Steffen et al., 2007).

Os organismos que compõe a fauna edáfica possuem modificações corporais ou hábitos alimentares e de locomoção sob as formas mais variadas (Anderson, 1988). Existem diferentes formas de classificação da biota do solo, de acordo com sua mobilidade, hábitos alimentares, tamanho e função ecológica que o organismo desempenha no ambiente (Lavelle, 1994). Swift et al. (1979) propuseram um sistema de classificação, o qual considera o tamanho corporal dos indivíduos, sendo a microfauna (<0,2 mm), mesofauna (0,2-2,0 mm) e macrofauna (>2,0 mm).

Entre as principais funções da mesofauna no solo, estão a predação de outros indivíduos da mesofauna e a fragmentação de material vegetal em processo de decomposição (Baretta, 2007). Os organismos da mesofauna são capazes de formar pequenas galerias no solo, tendo acesso desde a serapilheira até o interior do solo (Moço et al., 2005). Nesse trânsito, depositam pellets fecais, e promovem a dispersão de conteúdo bacteriano no solo (Correia & Oliveira, 2000). Portanto, a fauna edáfica de modo geral é um elemento relevante à manutenção da fertilidade do solo para que este permita o suporte à vegetação ali estabelecida (Correia, 2002).

Apesar da ampla atividade que exerce no solo, a mesofauna é muito sensível a alterações ambientais, tanto em sistemas naturais ou de cultivo (Van Straalen, 1998). Giracca et al. (2003) destacaram a importância da mesofauna,

em relação aos demais grupos da biota edáfica, no conhecimento da população e da diversidade para a avaliação da qualidade do solo.

2.1.1. Ácaros edáficos

Os ácaros são organismos de vida livre ou parasita (Ducatti, 2002) que apresentam uma grande variabilidade de tamanho, formas, habitat e comportamento de acordo com as diferentes superordens (Vieira et al., 2002). Estes organismos caracterizam-se por não apresentar cabeça verdadeira, antenas, mandíbulas, maxilas, e na fase adulta apresentar quatro pares de pernas. Seu corpo se divide entre gnathossoma (região anterior) e idiossoma (região posterior) (Schultz, 1990; Zang, 2003), conforme a Figura 1.

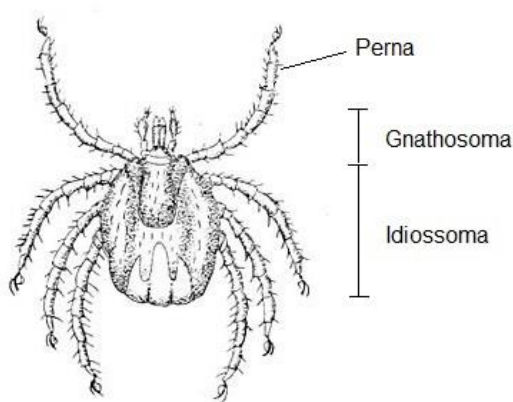


Figura 1. Visão geral do corpo de um ácaro.

Fonte: Modificado de Zang (2003).

Os ácaros pertencem ao filo Arthropoda, subfilo Chelicerata, classe Arachnida e subclasse Acari. Eles agrupam duas superordens onde estão inseridas as ordens de ácaros mais frequentes no solo: Ixodida, Mesostigmata, Prostigmata, Astigmata e Cryptostigmata. Ao todo, o grupo é composto por aproximadamente 400 famílias (Krantz, 1970; Moraes & Flechtmann, 2008).

Os ácaros podem ser encontrados nos mais variados ambientes, desde as regiões polares até no interior de zonas desérticas (Galvão & Guitton, 1989; Walter et al., 1996). Decorrente dessa ocupação, seu comportamento alimentar é bastante diversificado e especializado, existindo espécies predadoras, fitófagas, fungívoras, detritívoras e parasitos de vertebrados ou outros invertebrados (Krantz, 1978).

No solo, os ácaros se encontram amplamente distribuídos, compondo cerca de 80% da mesofauna edáfica. A distribuição destes organismos no solo varia em função da quantidade de alimento disponível e da sazonalidade, mas principalmente em função da umidade e disponibilidade de água (Coleman & Crossley Jr., 1995), o que pode ter influência indireta sobre seu comportamento ou fonte de alimentação.

O comportamento e os hábitos destes ácaros no solo têm consequências indiretas na ciclagem dos nutrientes. Alguns ácaros, como os da ordem Oribatida, participam na fragmentação de resíduos orgânicos provocando um aumento na área superficial desses resíduos, facilitando a ação de microrganismos decompositores (Oliveira, 1999). Já outros grupos, atuam na remoção seletiva de microrganismos, o que resulta no aumento da decomposição da matéria orgânica (Visser, 1985). Com isso, pode haver diminuição do tempo necessário para a degradação de resíduos vegetais em até seis vezes (Behan et al., 1978). Outros grupos de ácaros, como os da ordem Mesostigmata, compreende as principais famílias de ácaros predadores de nematoides e outros invertebrados, exercendo o controle de outros indivíduos da mesofauna (Krantz & Ainscough, 1990).

2.1.2. Colêmbolos edáficos

Os colêmbolos são microartrópodes pertencentes ao filo Arthropoda, subfilo Hexapoda, com tamanho corporal entre 0,2 a 3,0 mm, ápteros, que apresentam antenas e uma estrutura abdominal destinada a adesão, denominada colóforo (Pinho et al., 2007). A maioria das espécies pode apresentar fúrcula, uma estrutura abdominal utilizada para saltar (Bellinger et al., 2015) (Figura 2). São organismos muito abundantes no solo e juntamente com os ácaros, representam até 98% da mesofauna da camada superficial do solo e da serapilheira, sendo de vital importância para a formação e conservação dos solos (Rusek, 1998; Bellini & Zeppelini, 2004; Sousa et al., 2006).

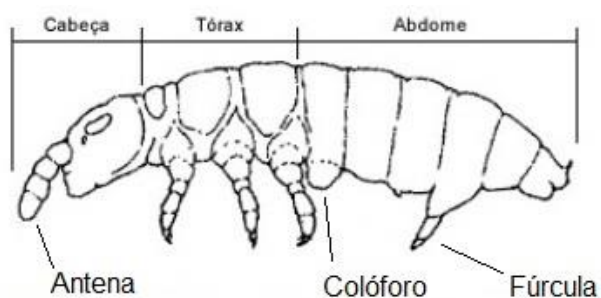


Figura 2. Visão geral do corpo de um colêmbolo.

Fonte: Modificado de Bellinger et al. (2015).

A classificação dos colêmbolos é baseada em características morfológicas externas (Deharveng, 2004). São separados em quatro grandes grupos: Poduromorpha e Entomobryomorpha, ambos com o corpo alongado; Symphypleona e Neelipleona, ambos com o corpo globoso com fusão de segmentos (Christiansen & Bellinger, 1998; Pinho, 2007). Até o momento, foram descritas cerca de 8300 espécies, incluídas em 600 gêneros e 30 famílias (Bellinger et al., 2015). Destas, existem registros de 287 espécies encontradas em solo brasileiro (Culik & Zeppelini, 2003; Zeppelini & Bellini, 2004).

O local que os colêmbolos habitam no perfil do solo e serapilheira pode definir uma série de caracteres morfológicos. Estas características tendem a reduzir ou se tornarem ausentes em colêmbolos que vivem no interior do solo, como é o caso dos espécimes sem pigmentação, sem fúrcula e sem ocelos que vivem no interior do solo. Já os grupos epiedáficos (que vivem sobre o solo) possuem antenas maiores, pigmentação, maior tamanho corporal e maior número de ocelos (Gisin, 1943; Hopkin, 1997).

Os colêmbolos são encontrados nos mais variados ecossistemas terrestres, como em ambientes secos, glaciares, cavernas, árvores, e no litoral, no entanto a maioria das espécies encontra-se em ambientes de clima temperado (Bellinger et al., 2015).

Os colêmbolos participam na ciclagem de nutrientes devido aos seus hábitos alimentares, uma vez que realizam a decomposição de matéria orgânica e fragmentação de resíduos, além da alimentação diretamente a partir de hifas fúngicas e de bactérias (Chamberlain, 2006; Bellini & Zeppelini, 2009). A preferência alimentar ocasiona na dispersão de esporos fúngicos e de bactérias, o que leva ao estímulo da população microbiana, exercendo influência na fertilidade do solo e inibe o desenvolvimento de fungos e bactérias causadores de doenças em plantas (Sautter & Santos, 1991).

2.2. A interação entre planta e rizóbios

Entre as bactérias que se localizam no entorno da rizosfera (rizobactérias) capazes de estabelecer associações simbióticas com plantas hospedeiras, destaca-se um amplo grupo de bactérias denominado rizóbios (Somasegaram & Hoben, 1994; Ampomah et al., 2008). Essas bactérias caracterizam-se por serem bastonetes Gram-negativos, não formadoras de endósporos (Willems, 2006). Quando em associação simbiótica com plantas leguminosas, os rizóbios produzem estruturas radiculares denominadas nódulos, que são capazes de fixar nitrogênio atmosférico (Moreira & Siqueira, 2006).

Os rizóbios possuem a capacidade de promover o crescimento vegetal de forma direta, por meio da solubilização de fosfatos minerais do solo, produção ou estímulo na produção de hormônios como as auxinas, citocinas e giberelinas ou pela fixação de nitrogênio (Rodrigues & Fraga, 1999). Indiretamente, esses microrganismos promovem o controle de fitopatógenos na planta ou no ambiente rizosférico através da produção de antibióticos e sideróforos (moléculas quelantes de íons de ferro) (Benite et al., 2002).

De acordo com Moreira & Siqueira (2006), a maioria das bactérias diazotróficas conhecidas pertencem às famílias Rhizobiaceae (gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Allorhizobium*); Bradyrhizobiaceae (gêneros *Bradyrhizobium* e *Blastobacter*); Xanthobacteraceae (gênero *Azorhizobium*); Hyphomicrobiaceae (gênero *Devosia*); Phyllobacteriaceae (gênero *Mesorhizobium*); Methylobacteriaceae (gênero *Methylobacterium*) e Brucellaceae (gênero *Ochrobactrum*). Essas bactérias formam associações simbióticas com plantas hospedeiras, evidenciadas pela formação de nódulos, e

fixação biológica de nitrogênio (FBN) em plantas da família Fabaceae (Crews, 1999; Galloway et al., 2004).

No solo, sob a forma de vida livre, os rizóbios são incapazes de fixar o nitrogênio atmosférico (N_2) (Melo & Azevedo, 1998). Em simbiose, as bactérias assumem a forma de bacteróides, aumentando o tamanho celular e passando a viver em condições microaerofílicas nas raízes da planta hospedeira (Cardoso, 1992). Após o estabelecimento da associação mutualística, a bactéria recebe da planta hospedeira fotossintatos assimiláveis em troca do nitrogênio fixado na forma de amônia (NH_4) (Canigia, 2003).

Para que ocorra o processo de colonização da planta pela bactéria, uma comunicação química específica ocorre entre a planta hospedeira e a bactéria simbiote, permitindo o processo infeccioso (Jones et al., 2007). Essa comunicação química se dá por moléculas sinalizadoras, as quais são formadas principalmente por compostos fenólicos (flavonoides). Os exsudatos radiculares contendo flavonoides fazem com que as bactérias sejam atraídas até as raízes pelo efeito de quimiotaxia (Drozdowicz, 1991; Vargas & Hungria, 1997). Os flavonoides também induzem nas bactérias a expressão de genes de nodulação (genes *nod*), que produzem fatores de nodulação (Fatores Nod) responsáveis pela sinalização e estabelecimento da simbiose (Viprey et al., 1998). Já na superfície radicular, as bactérias aderem-se aos pelos radiculares em sítios específicos, aumentando sua concentração celular no entorno dos mesmos (Hungria et al., 1997). O aumento da concentração de células bacterianas promove o encurvamento do pelo radicular pela ação dos fatores Nod. A partir deste momento, os rizóbios penetram no local de encurvamento do pelo, através

da invaginação da membrana plasmática, onde a planta forma uma estrutura chamada de cordão de infecção. No mesmo momento, as células do córtex vegetal se multiplicam, formando primórdios nodulares. Os cordões de infecção penetram nas células desses primórdios nodulares liberando as bactérias, que são prontamente envolvidas por uma membrana. Deste momento em diante, o primórdio nodular dá origem ao nódulo propriamente dito e a bactéria assume a forma de bacteroide, durante o restante do ciclo da leguminosa (Straliozzo & Teixeira, 2000; Jones et al., 2007).

Uma vez que o nódulo está formado, os bacteróides presentes nos nódulos sintetizam a nitrogenase, enzima que quebra a ligação tripla da molécula de nitrogênio atmosférico. Também é sintetizada a leghemoglobina, uma proteína necessária para regulação da concentração de oxigênio nos nódulos, requisito para que ocorra o início da fixação biológica de nitrogênio (FBN) (Vargas & Hungria, 1997).

2.3. O efeito do ambiente rizosférico sobre os microrganismos e a mesofauna edáfica

A rizosfera compreende uma camada restrita de solo imediatamente em torno do sistema radicular, sendo a interface na qual as raízes estão em contato com o solo e os microrganismos. Essa interface a torna um ambiente dinâmico e diferenciado do restante do solo, pois sua extensão é influenciada pelo alcance de substâncias liberadas pelas raízes (Finger, 2002). Essas substâncias, liberadas pelas raízes, são conhecidas genericamente como exsudados e são compostos principalmente por carboidratos, ácidos orgânicos

e aminoácidos liberados ativa ou passivamente e que seguem um gradiente de concentração (Grayston et al., 1998). A planta disponibiliza estes exsudatos em todas as fases de desenvolvimento, em quantidades que variam conforme sua idade, espécie (Strobel et al., 1999) e natureza do estresse ao qual está sendo submetida (Jones, 1998), podendo exercer um efeito de atração ou de repelência sobre os organismos do solo (Bais et al., 2006).

Conforme Nardi et al. (2000), entre os principais efeitos dos exsudatos na rizosfera, estão a regulação da comunidade microbiana, a resistência à herbivoria, a comunicação e formação de simbioses, a mudança das propriedades químicas e físicas do solo, e o antagonismo frente a espécies vegetais concorrentes.

As modificações das propriedades químicas e físicas tem alto impacto na comunidade de organismos da rizosfera. Os compostos orgânicos, quando liberados na rizosfera, são responsáveis por alterações de pH que afetam diretamente a disponibilidade dos nutrientes, e dos elementos responsáveis pela toxidez de solos (Meurer, 2007). Outro efeito do pH dos exsudatos diz respeito a sua ação sobre a biota do solo, uma vez que a composição deste grupo de organismos é afetada pelo gradiente de pH (Loranger et al., 2001).

Dentre os processos de comunicação planta-microrganismo intermediado por exsudatos, o mais conhecido é o das plantas leguminosas. Elas exsudam flavonoides e isoflavonoides específicos que promovem a movimentação de rizóbios da rizosfera em direção às raízes dessas plantas (quimiotaxia). Estes rizóbios ativam na planta genes responsáveis pela nodulação, gerando uma relação simbiótica, em que as plantas se beneficiam da

fixação biológica do nitrogênio (FBN) (Bais et al., 2006). Enquanto isso, em gramíneas, os carboidratos e aminoácidos exsudados na rizosfera, garantem a nutrição de bactérias promotoras do crescimento vegetal presentes no ambiente rizosférico (Gray & Smith, 2005).

Os exsudatos, ainda que de forma indireta, podem provocar alterações na quantidade e diversidade da biota do solo, ou mais especificamente a mesofauna edáfica. Lavelle (1992) afirma que a liberação de exsudatos na rizosfera estimula uma intensa atividade microbiana, exercendo um efeito indireto sobre a mesofauna, que utiliza estes microrganismos como fonte energética.

Bradford et al. (2002) afirmam que em seu trânsito na rizosfera vegetal, a mesofauna edáfica é capaz de se alimentar das partículas de material orgânico e preda outros indivíduos da biota. Também podem se alimentar diretamente por hifas fúngicas, e indiretamente por bactérias, promovendo a dispersão destes microrganismos. Nesse momento, as bactérias ficam propensas a ocuparem novos nichos no solo, chegando ao ponto de colonizarem plantas hospedeiras, como indicou Lussenhop (1993), onde colêmbolos podem aumentar significativamente o número de nódulos nas raízes de plantas de soja (*Glycine max*). Ainda segundo Lussenhop (1993), a colonização decorreria da mistura física causada pela atividade dos colêmbolos, aumentando o crescimento da população bacteriana e assim aumentar a densidade de *Rhizobium* spp no entorno das raízes. Outra forma de estímulo, segundo cita, os colêmbolos podem transportar ativamente células bacterianas de *Bradyrhizobium* até as raízes.

Sabendo que o solo é um ambiente altamente dinâmico, onde a mesofauna edáfica, ao mesmo tempo em que é influenciada pelo ambiente rizosférico, também promove mudanças, como o transporte e estímulo da população microbiana, este trabalho visa compreender a relação existente entre rizóbios em associação com suas respectivas plantas hospedeiras, e ácaros e colêmbolos componentes da mesofauna edáfica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos que necessitaram o uso de ambiente com condições assépticas e utilização de equipamentos para os procedimentos foram realizados nas dependências do laboratório de Microbiologia do Solo do Departamento de Solos da UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.1. Obtenção dos colêmbolos e criação em laboratório

Os colêmbolos utilizados nos bioensaios foram coletados de amostras de solo, sob a camada superficial de serapilheira no período de fevereiro de 2014. O local da coleta foi uma área de mata localizada na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, localizada no município de Porto Alegre nas coordenadas geográficas 30°04'20" Sul e 51°08'17" Oeste. O solo foi levado ao Laboratório de Microbiologia do Solo e quatro diferentes grupos de colêmbolos foram extraídos com o auxílio de um aspirador entomológico, pincel e água destilada, e visualizados em microscópio estereoscópio Quimis modelo Q-106S, com aumento de 40X. Para o preparo das lâminas para identificação, os espécimes foram previamente clarificados com um banho de solução de KOH (5%), seguidos de uma lavagem com água destilada,

de um banho em ácido lático, com leve aquecimento, por cerca de cinco segundos. Adicionou-se uma gota de solução de Hoyer (Moraes & Flechtmann, 2008) (Apêndice 2) sobre a qual cada espécime foi posicionado com o auxílio de um pincel, e posterior colocação da lamínula. Após, as lâminas foram colocadas para secar em estufa a 40 °C até o momento em que a lamínula ficou firmemente aderida e o excesso de solução de Hoyer das laterais estivesse seco. A seguir, as laterais da lamínula foram seladas com esmalte incolor. Os espécimes foram identificados de acordo com Bellinger et al. (2015) e Jordana & Arbea (1989).

Cerca de 30 indivíduos de cada grupo distinto de colêmbolos foram transferidos para potes plásticos, com 90 mm de diâmetro por 15 cm de altura, com tampa rosqueável de polipropileno. Em cada pote, adicionou-se uma camada de três centímetros de uma mistura homogênea de gesso e carvão ativado (na proporção de 9:1 p/p) (Goto, 1961). Após, os potes foram mantidos em estufa BOD (demanda biológica de oxigênio) sob temperatura constante de 23 ± 1 °C, com fotoperíodo de 16 horas de luz por 8 horas de escuro. Para se evitar a proliferação de fungos e permitir a oviposição dos colêmbolos, sempre que necessário, os indivíduos eram transferidos para potes com um novo substrato. Os colêmbolos foram alimentados com fermento biológico, colocado em um único ponto da superfície do substrato, e a umidade do substrato foi mantida adicionando-se água destilada quando necessário, sempre evitando-se a saturação. Com este procedimento, os colêmbolos se reproduziram, gerando entre 100 e 1000 indivíduos para a realização dos testes.

3.2. Sincronização da idade dos colêmbolos

De forma a permitir que todos os colêmbolos usados no experimento de alimentação de colêmbolos (Item 3.8) apresentassem as mesmas características de desenvolvimento corporal, os mesmos tiveram sua idade sincronizada, conforme o protocolo da Norma ISO/DIS 17512 - 2 (ISO, 2007). Ovos de colêmbolos, caracterizados por esferas esbranquiçadas e aglomeradas (Fountain & Hopkin, 2005) foram retirados dos frascos usando-se um pincel e água destilada, e transferidos para a superfície de um fragmento de 1 cm² de substrato o qual foi inserido em outro pote contendo novo substrato umedecido. Diariamente, os potes eram observados para se monitorar a eclosão dos ovos. Após a eclosão dos primeiros ovos, o bloco foi mantido no pote por mais dois dias visando-se possibilitar a eclosão dos demais. Após este período, o fragmento com os ovos não eclodidos foi removido do pote, restando apenas os indivíduos jovens com idade variando de poucas horas a dois dias de vida.

3.3. Preparo do inóculo bacteriano

As estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* - SEMIA 2081, SEMIA 2082, e SEMIA 222, estudadas neste trabalho e liberadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para a produção de inoculantes para trevo vermelho, foram adquiridas da Coleção de Culturas de Rizóbios da Fundação de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul (FEPAGRO).

A pureza das estirpes estudadas foi avaliada analisando-se características como tempo de crescimento, cor, diâmetro, elevação,

consistência e densidade óptica da colônia, em placas com ágar Levedura Manitol (LM) (Vincent, 1970) (Apêndice 1).

Para o preparo do inóculo bacteriano utilizado nos experimentos, colônias dos rizóbios de cada tratamento foram adicionados em erlenmeyers de 50 mL contendo 10 mL de meio LM. Os frascos foram incubados a 28 °C sob agitação de 120 rpm por cinco dias. Após o crescimento, células bacterianas foram lavadas para a retirada de açúcares e de outras substâncias que pudessem interferir na atração de ácaros e colêmbolos edáficos. Para isto, alíquotas de 1,5 mL do caldo de cada cultura foram transferidas para tubos de microcentrífuga estéreis de 2 mL e centrifugadas a 9000 rpm por 10 minutos. Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 1,5 mL de solução salina (NaCl 0,85%) estéril, homogeneizando-se cuidadosamente o conteúdo. Após a lavagem das células, o número de células de cada uma das estirpes estudadas foi avaliado por contagem em câmara de Neubauer, sob microscópio óptico, apresentando valor em torno de $1,0 \times 10^7$ ufc mL⁻¹.

3.4. Desinfestação e pré germinação das sementes de trevo vermelho

As sementes de trevo vermelho foram previamente escarificadas com lixa nº 120 por 20 segundos. Após, as sementes foram desinfestadas por imersão em álcool (70%) por 30 segundos, seguida de uma lavagem com hipoclorito de sódio (2%) por 30 segundos e cinco lavagens consecutivas com água destilada esterilizada (autoclavada por 20 minutos a 121 °C). A seguir, as sementes foram dispostas entre duas folhas de papel toalha (esterilizadas em

autoclave a 121 °C por 30 minutos) embebidas em água destilada esterilizada, e enroladas em papel alumínio e incubadas a 25 °C por três dias.

3.5. Descrição da área de instalação do experimento de atratividade de ácaros e colêmbolos edáficos por plantas inoculadas com rizóbios

O experimento foi instalado em uma área de cultivo da Estação Experimental Agronômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, localizada no município de Eldorado do Sul, nas coordenadas geográficas 30°05'50" Sul e 51°40'51" Oeste. O clima se enquadra na classificação de Köppen, sendo subtropical úmido com verão quente, do tipo fundamental Cfa (Forsthofer et al., 2006). O solo onde foi implantado o experimento é classificado como Argissolo Vermelho Distrófico típico (EMBRAPA, 2006), e apresenta pH 5,6, teor de argila de 280 g kg⁻¹, matéria orgânica (MO) 24 g kg⁻¹, com um teor de nutriente de 12,5 mg dm⁻³ de P, 76 mg dm⁻³ de K, 2,6 cmol_c dm⁻³ de Ca, 1,1 cmol_c dm⁻³ de Mg, e com 0,5 cmol_c dm⁻³ de Al (Hahn, 2013).

No período anterior à implantação do experimento, a área recebeu outros dois experimentos, um deles, em 2010, com o cultivo de trevo branco (*Trifolium repens*) e azevém (*Lolium multiflorum*), inoculados com as bactérias *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii* (estirpe SEMIA 222), *Burkholderia* sp. (estirpe VP16) e *Azospirillum brasiliense* (estirpes UFRGS EI-S, UFRGS Lg1-R e UFRGS M-S), conforme descrito em Hahn (2013); e outro em 2014, com milho (*Panicum glaucum*) inoculado com as estirpes SEMIA 222, VP16 e de *Azospirillum brasiliense* (estirpes Abv5 e Abv6) (Machado, 2015). No momento

da implantação do experimento, a área estava há um ano em pousio. O experimento foi implantado no mês de abril de 2015 e as armadilhas foram mantidas na área por 10 dias. A precipitação acumulada para o mês de abril, na região, atingiu um volume de 80 mm a 100 mm. Conforme os dados obtidos das estações do Instituto Nacional de Meteorologia / 8º Distrito de Meteorologia (INMET/8º DISME, 2015), a temperatura mínima média variou entre 16 °C e 17 °C, atingindo temperatura máximas médias que variaram entre 26 °C e 27 °C.

3.6. Experimento 1 - Atratividade de ácaros e colêmbolos edáficos por plantas de trevo vermelho inoculadas com diferentes estirpes de rizóbios

Visando-se avaliar a atratividade de colêmbolos e ácaros edáficos em campo nativo, foram utilizadas armadilhas constituídas de tubos de 50 mL contendo plantas de trevo vermelho (*Trifolium pratense*), variedade Quiñequeli.

3.6.1. Preparo dos tubos SR50, cultivo das plantas e inoculação

As unidades experimentais foram construídas utilizando-se tubos armadilha denominados SR50 (artigo no prelo). Estes tubos foram confeccionados com tubos de centrífuga de polipropileno com 116 mm de altura, 30 mm de diâmetro e capacidade volumétrica de 50 mL. Os tubos receberam seis furos de 5 mm de diâmetro, dispostos de forma helicoidal em relação ao eixo do comprimento (Figura 3). Essa distribuição visou permitir que a armadilha atingisse uma profundidade de até 5 cm quando inserida e nivelada com a superfície do solo.

Os tubos foram preenchidos com mistura de vermiculita e areia, na proporção de 2:1 (v/v) e envolvidos em papel alumínio, para se evitar a perda de substrato pelos furos laterais. Após, os tubos foram esterilizados em autoclave por 30 minutos a 121 °C. Cada tubo foi mantido dentro de um frasco de vidro esterilizado, de 10 cm de altura, 4 cm de diâmetro e com capacidade de 125 mL, onde foram colocados 30 mL de solução nutritiva de Sarruge (1975), sem fonte de nitrogênio, diluída a 50% e esterilizada em autoclave por 20 minutos a 121 °C (Apêndice 3).

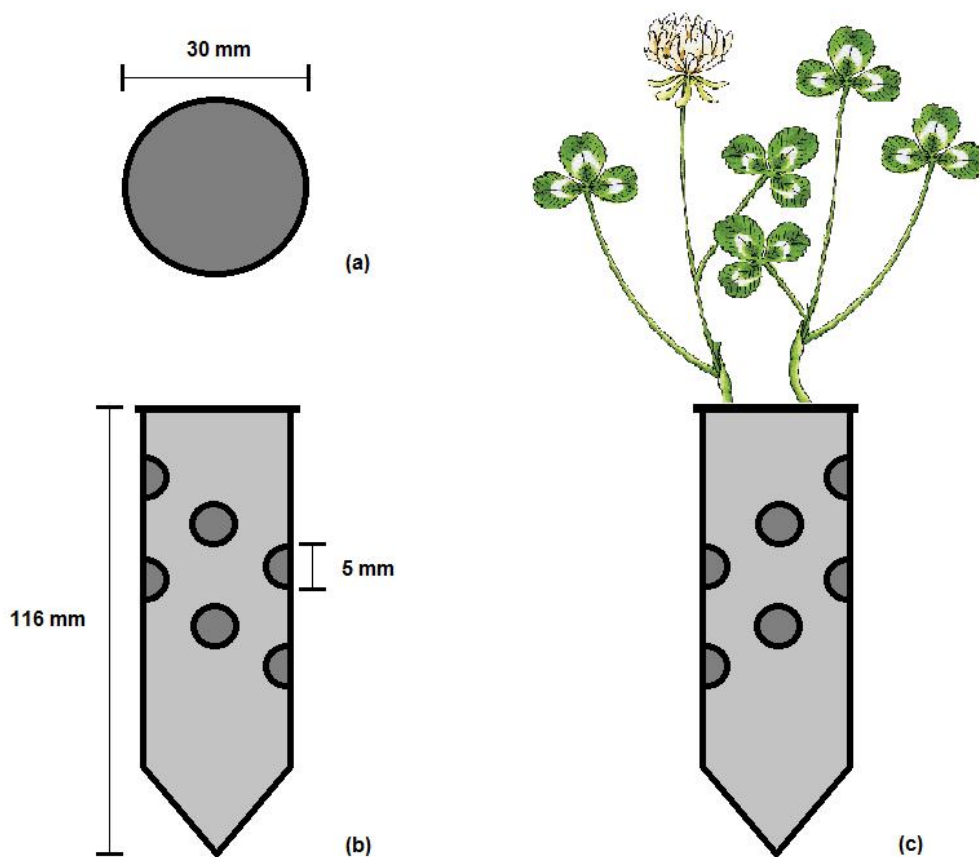


FIGURA 3. Esquema das armadilhas com tubos SR50 com plantas de trevo vermelho.

Cada tubo recebeu oito sementes pré-germinadas (conforme o item 3.4) transferidas com pinças estéreis. Os tubos com as plantas (Figura 3) foram mantidos em lampadário sob iluminação de duas lâmpadas fluorescentes de luz branca de 20 Watts de potência e uma lâmpada Grolux de 15 Watts, com fotoperíodo de 14/10 horas (luz/escuro), em temperatura ambiente, que variou de 20 a 28 °C.

A inoculação foi realizada quando as plantas completaram 10 dias, momento em que também foi realizado o desbaste, mantendo-se quatro plantas por tubo. O experimento se consistiu dos tratamentos: a) com inoculação das estirpes SEMIA 2081, SEMIA 2082 e SEMIA 222; b) controle (sem inoculação e com adição de nitrogênio - 100 Kg ha⁻¹ de N, na forma de três aplicações de 1 mL da solução de KNO₃ na concentração de 6 g L⁻¹); c) controle com plantas não inoculadas e sem adição de nitrogênio; e d) controle sem plantas contendo apenas o substrato esterilizado que recebeu apenas adição de caldo LM estéril.

A formação de nódulos com coloração avermelhada nas raízes das plantas de trevo vermelho indicava a fixação de N. Para isso, plantas de trevo vermelho foram cultivadas em tubos de ensaio de 250 mm de comprimento e 24 mm de diâmetro. Cada tubo continha solução nutritiva de Sarruge, com adição de ágar (7 g L⁻¹), sem fonte de nitrogênio, diluída a 50%, e era mantido as mesmas condições de luminosidade e temperatura das plantas nos tubos SR50. No 20º dia as plantas dos tubos de ensaio apresentavam nódulos com coloração avermelhada, e ao 21º dia os tubos SR50 com as plantas foram levados para a instalação em campo.

3.6.2. Inserção das unidades amostrais na área experimental

O delineamento experimental utilizado para a distribuição dos tratamentos foi o casualizado em blocos, com seis repetições por tratamento. Os pontos de inserção se localizavam a 5 metros da borda correspondente ao comprimento da área e 10 metros da borda correspondente à largura da área. As armadilhas foram inseridas de forma equidistante de 8 metros por 3 metros entre si (Figura 4).

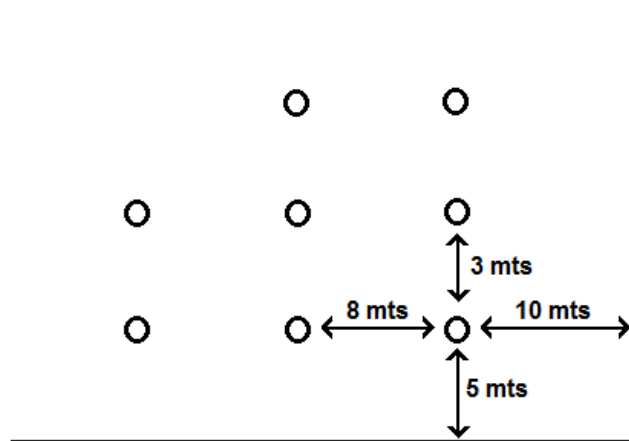


FIGURA 4. Esquema mostrando o distanciamento dos pontos de inserção dos tubos em relação à borda da área e em relação aos outros pontos.

As armadilhas foram inseridas no solo utilizando-se um trado de rosca para a abertura de orifícios com 12 centímetros de profundidade onde foi inserido cada tubo. Antes da inserção o papel alumínio que envolvia cada tubo foi retirado e os tubos colocados no solo procurando-se nivelar com a superfície. Os tubos permaneceram em campo durante 10 dias.

Após esse período, cada tubo foi retirado do solo cuidadosamente e colocado no interior de um saco plástico para transporte ao laboratório.

3.6.3. Extração e identificação dos ácaros e colêmbolos

No laboratório, o substrato no interior dos sacos plásticos e dos tubos foi removido e depositado em cilindros de PVC de 88 mm de diâmetro por 7,5 cm de altura, com uma tela com malha de 2,0 mm na extremidade inferior, sendo submetidos a uma fonte de calor e luz de 60 Watts, durante sete dias, para extração da mesofauna, de acordo com o método de Berlese-Tüllgren modificado (Oliveira, 1999). O método Berlese-Tüllgren modificado consiste na aplicação de uma fonte de luz e calor com uma lâmpada de 25 Watts sobre um cilindro com a extremidade superior aberta e a extremidade inferior com uma tela de malha de 2 mm, onde foi colocada a amostra. Este cilindro foi colocado sobre um funil. A luz e o calor forçaram o deslocamento dos organismos para baixo, caindo pelo funil até o frasco coletor com 20 mL de solução conservante etanol 70%. Os espécimes foram contados e classificados usando-se um microscópio estereoscópico (Quimis, modelo Q-106S), com aumento de 40X.

Para a identificação dos colêmbolos, foram utilizadas chaves de identificação de Azpiazu et al. (2004), Hopkin (1997, 2007), e Bellinger et al. (2015). Para a identificação dos ácaros, foram utilizadas as chaves de identificação de Mineiro & Moraes (2001) e Moraes & Flechtmann (2008).

3.6.4. Análise estatística e dados ecológicos

A quantidade de ácaros e colêmbolos foi verificada quanto a sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados não normais foram transformados para $\sqrt{x+1}$ e foi aplicado o teste de análise de variância

(ANOVA). A comparação das médias entre os tratamentos realizada com o teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o *software* Statistica 8.0.

Os índices ecológicos também foram abordados com o uso do programa estatístico PAST (Hammer et al., 2001). Foram calculados os índices de riqueza dos grupos taxonômicos (r), índice de Shannon-Wiener (H') (Pielou, 1975) e índice de equitabilidade (J') (Pielou, 1975).

O cálculo da riqueza foi obtido pelos números médios de grupos taxonômicos encontrados nas amostras de cada tratamento.

O índice de diversidade de Shannon (H') foi obtido pela relação:

$$H' = - \sum \frac{ni}{N} * \log \frac{ni}{N}$$

, onde:

ni representa a densidade de cada grupo e N refere-se à soma da densidade de todos os grupos.

O cálculo da equitabilidade foi obtido pelo Índice de Pielou (J'):

$$J' = \frac{H'(\text{observado})}{H'(\text{máximo})}$$

, onde:

H' (*observado*) refere-se ao valor do índice de Shannon observado, e H' (*máximo*) é a diversidade máxima possível de ser observada se todas as espécies apresentarem igual abundância.

Os dados ecológicos foram verificados quanto sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e, uma vez que foram não normais, foi realizado o teste de análise de variância (ANOVA). A comparação das médias entre os tratamentos

realizada com o teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o *software* Statistica 8.0.

3.7. Experimento 2 - Escolha de substrato para a sobrevivência de colêmbolos e cultivo de plantas de trevo vermelho em laboratório

Para elaboração do substrato foram utilizadas areia, vermiculita expandida e turfa em diferentes proporções. A areia foi lavada com água corrente, secada em estufa a 80 °C e peneirada em um conjunto de peneiras, separando a areia em grânulos de 0,5 a 2,0 mm de diâmetro. A vermiculita utilizada foi composta de uma mistura com diferentes granulometrias. Utilizou-se vermiculita expandida comercial (marca Carolina Soil do Brasil®) do tipo fina, que foi peneirada de forma a compor uma mistura composta de 70% dos grânulos de vermiculita com diâmetro entre 0,5 e 2,0 mm e 30% com diâmetro inferior a 0,5 mm. A turfa foi obtida de um inoculante comercial de rizóbios após processo de esterilização em autoclave por 30 minutos a 121 °C e secagem em estufa.

A turfa, areia e vermiculita foram misturadas de forma a compor os diferentes substratos testados. A composição dos substratos foi a seguinte:

- a) Substrato 1 – 80% de areia, 10% de vermiculita e 10% de turfa;
- b) Substrato 2 – 70% de areia, 20% de vermiculita e 10% de turfa;
- c) Substrato 3 – 60% de areia, 30% de vermiculita e 10% de turfa;
- d) Substrato 4 – 50% de areia, 40% de vermiculita e 10% de turfa;
- e) Substrato 5 – 40% de areia, 50% de vermiculita e 10% de turfa;
- f) Substrato 6 – 30% de areia, 60% de vermiculita e 10% de turfa;

As avaliações realizadas com o substrato consistiram na determinação do pH, da capacidade total de retenção de água, avaliação da sobrevivência dos colêmbolos e do desenvolvimento de plantas de trevo vermelho.

3.7.1. Determinação do pH

A determinação do pH foi feita conforme descrito em EMBRAPA (2011), sendo que foi reservada uma alíquota de 10 mL de cada substrato, adicionando-se em seguida 25 mL de KCl 1N. A seguir, o conteúdo foi agitado e deixado em repouso por uma hora. Após, a leitura do pH foi feita em peagômetro da marca Schott, modelo HandyLab 1.

3.7.2. Determinação da capacidade de retenção de água

Para a determinação da capacidade de retenção de água, foram separadas alíquotas de 30 g de solo, colocadas em um funil vedado com papel filtro na base para se evitar a perda de substrato. A seguir, as amostras foram saturadas com 25 mL de água destilada e deixadas em repouso por uma hora até que o excesso de água fosse drenado. O cálculo da capacidade de retenção de água foi determinado pela equação:

$$CRA = VT - VE$$

, onde:

CRA = capacidade de retenção de água; VT = volume total de água adicionada ao substrato; e VE = volume de água excedido após o período de repouso.

3.7.3. Desenvolvimento de plantas de trevo vermelho

Para se evitar que a composição do substrato pudesse interferir no desenvolvimento das plantas, sobretudo na raiz, plantas de trevo vermelho foram cultivadas nas diferentes formulações de substrato. Para isso, colocou-se 50 mL de substrato de cada formulação em frascos de vidro com 12 cm de altura por 6 cm de diâmetro e cada frasco recebeu 10 sementes pré-germinadas (Item 3.4). As plantas receberam solução nutritiva de Sarruge (1975) estéril numa concentração de 75%, com a adição de fonte de nitrogênio de KNO_3 (6 g L^{-1}). A solução nutritiva foi adicionada com pipeta estéril numa quantidade correspondente a 60% da capacidade de retenção de água de cada formulação. O experimento foi realizado com quatro repetições por tratamento.

Os frascos com as plantas foram colocados em lampadário com fotoperíodo de 14/10 horas (luz/escuro), em temperatura ambiente, variando de 20 a 28 °C. Após 10 dias de crescimento no substrato, foi realizado o desbaste, mantendo-se quatro plantas por frasco e deixando-as crescer até completarem 25 dias, momento em que foram cuidadosamente retiradas dos vasos.

A parte aérea foi separada da raiz e ambas as partes foram medidas. Posteriormente, as partes da planta foram levadas à estufa a 65 °C por 72 horas e pesadas em balança analítica para a verificação da massa seca.

Os dados de comprimento e massa seca das plantas foram analisados quanto a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e realizado o teste de análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias dos tratamentos pelo teste de Tukey. Para dados não normais, os dados foram transformados

para $\sqrt{x+1}$. Ambos os testes foram feitos a 5% de probabilidade de erro, utilizando-se o *software* Statistica 8.0.

3.7.4. Sobrevivência dos colêmbolos

Para avaliação da sobrevivência dos colêmbolos nos substratos, foram utilizados indivíduos identificados como pertencentes ao gênero *Onychiurus* sp., com idade sincronizada de 10 a 12 dias, conforme descrito no item 3.2. O teste para avaliação da reprodução dos colêmbolos teve duração de 28 dias.

Para o teste, cada substrato foi colocado até atingir volume correspondente a 30 mL em frascos de vidro com 12 cm de altura por 6 cm de diâmetro, com tampa de rosca. A seguir, a umidade do substrato foi ajustada com água destilada esterilizada correspondendo a 60% da capacidade total de retenção de água.

Quando os colêmbolos alcançaram idade de 10 a 12 dias, 10 indivíduos foram transferidos dos potes de criação para cada frasco contendo as plantas. Como fonte de alimentação para os colêmbolos, foi fornecido 2 mg de fermento biológico por frasco no momento da inserção dos mesmos e aos 14 dias. Os frascos foram fechados, levados à incubadora BOD com temperatura constante de 23 ± 1 °C e com fotoperíodo de 8 horas de luz, e abertos a cada cinco dias para permitir a renovação do ar no interior dos frascos, de acordo com Fountain & Hopkin (2005). O experimento foi realizado com 4 repetições por tratamento e permaneceu por 28 dias na incubadora.

Ao final do experimento, foi adicionada água no interior dos frascos e os mesmos foram agitados, permitindo que os indivíduos flutuassem. O número total de indivíduos de cada frasco foi contado. Os indivíduos foram classificados quanto ao tamanho, sendo que os adultos (inseridos no início do teste) deveriam apresentar entre 1,0 mm e 1,3 mm, e os jovens (resultantes da reprodução no substrato), $\leq 0,9$ mm.

Como critério principal de escolha do substrato, foi considerado adequado o substrato que proporcionou a sobrevivência de 80% a 100% dos indivíduos adultos inseridos no início do experimento, critério definido por Fountain & Hopkin (2005). Como segundo critério de escolha, foi utilizado o maior número total de indivíduos jovens presente no substrato. Os dados foram analisados quanto a normalidade e uma vez que foram normais, foi realizado o teste de análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias dos tratamentos realizada com o teste de Tukey. Para dados não normais, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis. Ambos os testes foram feitos a 10% de probabilidade de erro, utilizando-se o *software* Statistica 8.0.

3.8. Experimento 3 - Colonização de plantas de trevo vermelho intermediada por colêmbolos alimentados com rizóbios

Neste experimento, frascos contendo plantas de trevo vermelho crescidas em substrato estéril receberam colêmbolos vivos, criados em laboratório e que haviam sido alimentados com esferas de fécula de mandioca inoculadas com de *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii*, ou foram inoculadas com uma suspensão formada pelo macerado desses colêmbolos.

3.8.1. Preparo dos vasos com as plantas de trevo vermelho

As plantas foram obtidas a partir de 10 sementes de trevo vermelho (*Trifolium pratense*), da variedade Quiñequeli, conforme o item 3.4. Para o cultivo das plantas, foram utilizados frascos de vidro com 18 cm de altura e 250 mL de capacidade total, contendo a mistura, previamente testada e adequada ao desenvolvimento de plantas e sobrevivência de colêmbolos, correspondente ao Substrato 5 (40% de areia, 50% de vermiculita e 10% de turfa) do item 3.7, até aproximadamente um volume de 100 mL da capacidade do frasco. As plantas receberam solução nutritiva de Sarruge estéril numa concentração de 75%, sem a adição de fonte de nitrogênio. A solução nutritiva foi adicionada com auxílio de pipeta estéril numa quantidade correspondente a 60% da capacidade de retenção de água. Após 10 dias de crescimento foi realizado o desbaste, mantendo-se quatro plantas por frasco.

3.8.2. Criação dos colêmbolos

Foram criados colêmbolos dos gêneros *Onychiurus*, *Orthonychiurus*, *Proisotoma*, e da família Hypogastruridae, sendo que a idade dos colêmbolos foi sincronizada entre 10 a 12 dias conforme o item 3.2. Após a eclosão dos ovos, os indivíduos foram mantidos sem alimentação até o momento da adição da alimentação testada no experimento.

3.8.3. Preparo da alimentação dos colêmbolos

Concomitantemente, foi preparado o inóculo bacteriano (Item 3.3) para ser utilizado na alimentação dos colêmbolos. Após o período de incubação,

1 mL de caldo da cultura crescida foi transferida para tubos de microcentrífuga de 2 mL contendo quatro esferas de fécula de mandioca (popularmente conhecida por sagu) cada, ambos previamente esterilizados em autoclave por 20 minutos a 121 °C. Para que absorvessem o caldo, as esferas permaneceram em repouso no caldo LM com a cultura bacteriana crescida, por três horas. No momento da adição, foi feita a contagem da população microbiana viável inoculada pelo método de diluições seriadas. Uma alíquota de 0,1 mL da cultura bacteriana crescida foi transferida para um tubo de microcentrífuga contendo 0,9 mL de solução salina (NaCl 0,85%) estéril, homogeneizada e diluída até as diluições 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} , em duplicata. A partir de cada diluição, foram inoculados 0,1 mL na superfície de placas de Petri contendo ágar LM e feito o espalhamento do inóculo com alça de Drigalsky. As placas foram incubadas em estufa à 28 °C por cinco dias. O caldo bacteriano onde as esferas foram colocadas possuía uma população de $1,0 \times 10^7$ ufc mL⁻¹.

A alimentação dos colêmbolos foi feita quando os indivíduos estavam com 10 a 12 dias, sendo adicionada em duas etapas. Cada frasco recebeu quatro esferas impregnadas com caldo de rizóbios no primeiro dia de alimentação. Cinco dias após, as esferas inseridas no primeiro dia foram retiradas e substituídas por novas esferas embebidas com novo caldo do mesmo rizóbio. As esferas de fécula contendo a população bacteriana foram ofertadas aos colêmbolos por 10 dias e mantidas até a inoculação das plantas com os colêmbolos.

Os tratamentos foram compostos de frascos com plantas que receberam os colêmbolos sob a forma de espécimes vivos de:

1) Hypogastruridae; 2) *Onychiurus*; 3) *Proisotoma*; 4) *Orthonychiurus*; e espécimes macerados de: 5) Hypogastruridae; 6) *Onychiurus*; 7) *Proisotoma*; 8) *Orthonychiurus*. Além destes tratamentos, o experimento também constou dos seguintes controles: C1) Tratamento controle com plantas não inoculadas que receberam a adição de nitrogênio (equivalente a 100 Kg ha⁻¹ de N) na forma de três aplicações de 1ml da solução de KNO₃ (6 g L⁻¹); C2) Tratamento controle com plantas sem adição de nitrogênio; C3) Tratamento controle com plantas inoculadas com 2 mL da estirpe bacteriana. O experimento foi realizado com quatro repetições por tratamento.

3.8.4. Adição dos colêmbolos vivos e da suspensão de colêmbolos macerados nos frascos com plantas de trevo vermelho

Em um pré-teste, foi realizada a desinfestação externa do corpo dos colêmbolos alimentados com a estirpe de rizóbio. Essa desinfestação tinha por objetivo eliminar a população bacteriana externa, mantendo somente a população de rizóbio que havia sido ingerida pelos colêmbolos. A desinfestação dos colêmbolos foi feita com os mesmos procedimentos utilizados para a desinfestação de sementes. No entanto, o tempo de exposição que os colêmbolos ficaram expostos a estes agentes foi reduzido, tendo sido submetidos por 5, 10 e 15 segundos ao álcool 70%, hipoclorito de sódio 2% e lavagem com água destilada estéril, os colêmbolos foram macerados e inoculados em superfície na diluição 10⁰ e 10⁻¹, em placas de ágar LM, que foram incubadas por 72 horas a 28 °C.

A adição dos indivíduos vivos foi feita transferindo-se 10 espécimes de cada grupo para o interior dos frascos referentes a cada tratamento. Os colêmbolos adicionados vivos não receberam desinfestação externa.

O preparo dos tratamentos com os indivíduos macerados ocorreu transferindo-se 10 indivíduos de cada grupo para o interior de microtubos de centrífuga. Os colêmbolos que sofreram o processo de maceração não receberam desinfestação externa. Após, adicionou-se 0,1 mL de solução salina (NaCl 0,85%) no interior do microtubo e foi feita a maceração, com um bastão de vidro previamente desinfestado com etanol 70% e flambado. Após, o volume do macerado foi completado para 1 mL com solução salina (NaCl 0,85%) estéril e inoculado nas plantas.

Os frascos com as plantas permaneceram em lampadário durante 30 dias nas condições descritas no item 3.6.1. Ao final do experimento, as plantas foram retiradas, sendo as raízes separadas e lavadas para a contagem e avaliação do número de nódulos formados.

3.8.5. Análise estatística

Os dados foram transformados pela equação $\sqrt{x} + \sqrt{x+1}$. Foi realizado o teste de análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias dos tratamentos realizada com o teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Para a verificação da diferença entre a forma de adição em cada espécie, os dados transformados foram comparados pelo teste t de Student. Ambos os testes foram feitos utilizando-se o *software* Statistica 8.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação dos colêmbolos e criação em laboratório

Entre os colêmbolos coletados e criados em condições de laboratório, sobreviveram apenas os espécimes das famílias Hypogastruridae, Onychiuridae e Isotomidae. O sucesso na manutenção e reprodução destes indivíduos se deve ao fato de que os mesmos conseguiram se alimentar e se reproduzir nas condições de laboratório, também como a manutenção adequada dos potes de criação.

Os colêmbolos da família Onychiuridae foram identificados como sendo pertencentes aos gêneros *Onychiurus* e *Orthonychiurus*, enquanto que os da família Isotomidae como pertencentes ao gênero *Proisotoma* (Figura 3). Estas famílias são nativas de solos do Rio Grande do Sul, como Rieff (2010, 2014) evidenciou em estudos que verificaram flutuações populacionais em solos com diferentes sistemas de manejo.

A reprodução dos colêmbolos nos potes de cultivo foi favorável, obtendo-se uma quantidade que variou entre 100 e 1000 indivíduos por espécie. Os colêmbolos do gênero *Proisotoma* e da família Hypogastruridae foram os que se reproduziram em maior número, gerando uma alta densidade populacional, quando comparados à densidade ideal de 1,2 cm² por indivíduo, estabelecida para *Folsomia candida* (Green, 1964). A possível limitação na densidade popul-

acional de colêmbolos seria decorrente da competição por alimento, canibalismo ou pelo acúmulo de resíduos excretados que podem exercer efeito tóxico (Park, 2007). Além disso, a mudança nas condições ideais de temperatura e umidade estabelecidos também influenciam no desenvolvimento da criação (Fountain & Hopkin, 2005; ISO, 2007). Estes efeitos não foram constatados nas criações, uma vez que o alimento foi fornecido em quantidade suficiente e os colêmbolos foram realocados periodicamente em novos substratos.

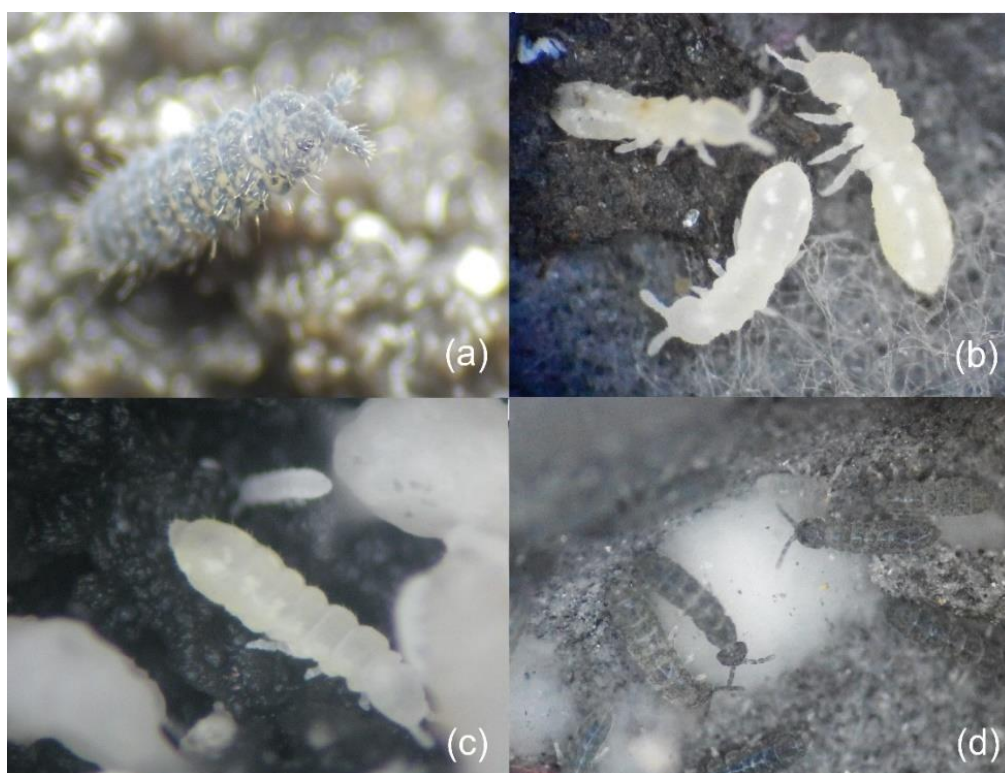


FIGURA 5. Colêmbolos da família Hypogastruridae (a), do gênero *Orthonychiurus* (b), gênero *Onychiurus* (c) e gênero *Proisotoma* (d) criados em substrato no laboratório (fonte: Victor Lucas Bassani, 2015).

4.2. Atratividade de colêmbolos e ácaros edáficos por plantas de trevo vermelho inoculadas com diferentes estirpes de rizóbios

Neste experimento foram coletados um total de 428 espécimes, sendo 225 ácaros, classificados como pertencentes a sete famílias, e 203 colêmbolos, pertencentes a cinco famílias (Tabela 1).

Os tubos contendo os tratamentos com plantas inoculadas com as estirpes SEMIA 2081, SEMIA 2082 e SEMIA 222 apresentaram maior número de ácaros em comparação aos controles não inoculados, não diferindo entre si. Entre os controles, o que recebeu adição de nitrogênio (T + N) foi superior ao que não recebeu adição de nitrogênio (T - N) e ao controle não inoculado contendo apenas substrato, os quais apresentaram semelhança no número de indivíduos.

Quanto ao número total de colêmbolos, os tratamentos com plantas inoculadas com as estirpes SEMIA 2081, SEMIA 2082 e SEMIA 222 atraíram maior número de espécimes do que os controles não inoculados. O controle T + N apresentou maior número de espécimes que o controle T - N e o controle que continha somente o substrato. Os controles T - N e substrato apresentaram número semelhante de indivíduos.

Conforme a Tabela 1, observa-se que os ácaros da família Ologamasidae estiveram em maior número nas armadilhas contendo plantas inoculadas com a estirpe SEMIA 2082, seguido do tratamento inoculado com a SEMIA 222. Nos outros tratamentos, incluídos os controles, percebe-se um número próximo de indivíduos dessa família que foram capturados.

TABELA 1. Números totais de indivíduos de ácaros e colêmbolos presentes nos tubos com plantas de trevo vermelho (*Trifolium pratense*) inoculadas com rizóbios das estirpes SEMIA 2081, SEMIA 2082, SEMIA 222 e tratamento controle T + N (100 Kg ha⁻¹ de N), controle T - N; e controle contendo somente substrato (sem planta), após 10 dias em campo.

Grupo de Indivíduos	Tratamentos					
	SEMIA 2081	SEMIA 2082	SEMIA 222	T + N	T - N	Substrato
Ácaros						
Cunaxidae	1	0	0	0	0	0
Eupodidae	0	0	1	0	0	0
Ologamasidae	11	39	29	14	13	16
Oribatidae	3	8	13	14	2	1
Rhagidiidae	0	0	3	0	0	0
Rhodocaridae	0	3	0	0	0	0
Uropodidae	40	4	7	3	0	0
Total de ácaros	55	54	53	31	15	17
CV	0,63	1,01	1,1	1,08	0,98	1,32
Colêmbolos						
Entomobryidae	2	4	0	0	1	1
Isotomidae	18	35	13	21	13	13
Poduromorpha	15	7	37	7	8	2
Onychiuridae	0	1	0	0	0	0
Symphyleona	0	2	1	0	0	2
Total de colêmbolos	35	49	51	28	22	18
CV	0,79	2,22	0,95	0,96	0,85	0,92
Total de indivíduos	90	103	104	59	37	35
CV	0,69	1,59	1,03	1,02	0,90	1,11

Obs.: Ácaros identificados a nível de família, e colêmbolos a nível de ordem e família.

No tratamento contendo plantas com a estirpe SEMIA 2082, também houve grande número de colêmbolos da família Isotomidae. Ao mesmo tempo, no tratamento contendo plantas com a estirpe SEMIA 222, houve grande número de colêmbolos da ordem Poduromorpha. De acordo com Castilho et al. (2010), a família Ologamasidae está entre as famílias de ácaros predadores capazes de predarem nematoides, pequenos insetos, outros ácaros e colêmbolos. Este comportamento de predação explicaria a presença de indivíduos da família Ologamasidae em maior número nestes dois tratamentos.

Outra família de ácaros presente em todos os tratamentos foi a família Oribatidae, onde houve um maior número de indivíduos capturados no tratamento T + N e no tratamento com plantas inoculadas com a estirpe SEMIA 222. Os outros tratamentos com plantas que receberam inoculação, e os controles, apresentaram menor número de indivíduos de ácaros dessa família.

Os ácaros da família Oribatidae possuem hábitos alimentares generalistas (Behan-Pelletier & Eamer, 2007; Maraun et al., 2007), podendo alimentar-se desde matéria orgânica em decomposição (Behan-Pelletier, 1999), micorrizas e fungos diversos (Schneider et al., 2005) e predação de nematoides (Heidemann et al., 2014). Possivelmente, a presença de ácaros Oribatidae nos tratamentos foi possível devido ao estabelecimento e crescimento de hifas fúngicas, tanto quanto a presença de nematoides provindos da área de campo.

O tratamento com as plantas inoculadas com a estirpe SEMIA 2081 merece destaque pela atração de ácaros da família Uropodidae, que não foram capturados nas armadilhas do controle não inoculado e sem nitrogênio (T - N) e apresentaram números de cinco a dez vezes superiores aos demais tratamentos

que apresentaram ácaros dessa família. Ácaros desta família podem se alimentar de matéria orgânica em decomposição, hifas fúngicas, nematoides e outros ácaros (Gerson et al., 2003; Lindquist et al., 2009; El-Banhawy et al., 1997). Considerando o possível efeito de alguma condição ambiental, é possível ainda que estes ácaros possam ter sido atraídos por efeito de predação por determinados ácaros das famílias Ologamasidae e Oribatidae, presentes neste tratamento.

Os ácaros das famílias Cunaxidae, Eupodidae, Rhagidiidae e Rhodocaridae foram capturados em números muito baixos, não apresentando relação com o efeito testado nos tratamentos. A distribuição dos ácaros no solo pode ocorrer devido a fatores como umidade, sazonalidade ou quantidade de alimento, conforme destacam os trabalhos de Holt (1981) e de Coleman & Crossley Jr. (1995). Possivelmente um destes fatores esteve presente, levando os indivíduos destas famílias a se deslocarem até os tubos armadilha.

Entre o grupo dos colêmbolos, observou-se que os espécimes da família Isotomidae e da ordem Poduromorpha foram capturados em todos os tratamentos. Os espécimes da família Isotomidae apresentaram maior número de indivíduos no tratamento com plantas inoculadas com a estirpe SEMIA 2082. Já os colêmbolos da ordem Poduromorpha foram capturados em maior número no tratamento com plantas inoculadas com a estirpe SEMIA 222.

Conforme a Tabela 1, colêmbolos da família Onychiuridae e Entomobryidae, e da ordem Symphypleona foram capturados em baixo número nos seus respectivos tratamentos. Esse número não expressivo de indivíduos nos tubos pode refletir uma casualidade, visto que os colêmbolos podem se

distribuir no solo devido a interferência de outro fator que não o proporcionado pelos tratamentos, tal qual a umidade ou presença de alimento (Ponge, 2000; Van Straalen & Løkke, 1997).

Para se avaliar a possibilidade de que a planta ou o caldo LM pudessem exercer algum efeito atrativo sobre a mesofauna edáfica, as médias do número de ácaros e colêmbolos encontrados nos tubos dos controles T + N, T - N (controles com planta) e Substrato (controle sem planta e somente com o caldo LM) foram comparados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Não se observa diferença quanto ao número médio de ácaros, colêmbolos e somatório do número de ácaros e colêmbolos entre os controles (Figura 6).

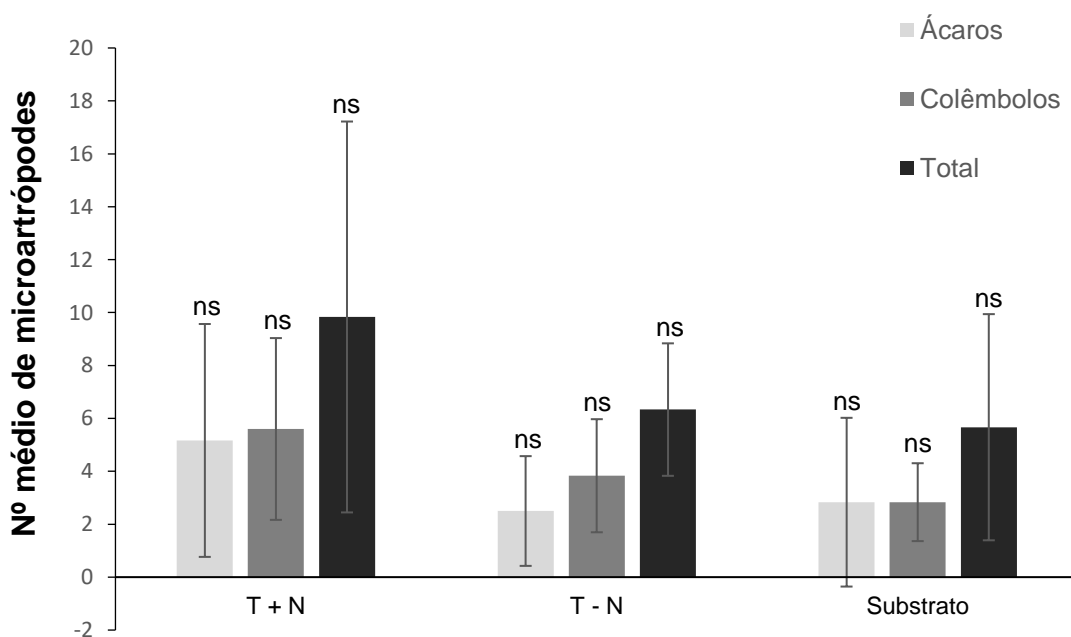


FIGURA 6. Médias do número de ácaros, de colêmbolos e totais presentes nos tubos com plantas de trevo vermelho (*Trifolium pratense*) no tratamento controle T + N (com planta + 100 kg ha⁻¹ de N); tratamento controle T - N (com planta e sem a aplicação de N); e tratamento controle contendo somente substrato (sem planta). Legenda: ns – Não significativo pelo teste de Tukey a 5%.

A Figura 7 mostra os números médios de espécimes de ácaros, colêmbolos e número total, presentes nos tubos com plantas de trevo vermelho inoculados com rizóbios SEMIA 2081, SEMIA 2082, SEMIA 222 e no tratamento controle sem inoculação e sem nitrogênio (T - N). Observa-se que os tratamentos inoculados com as estirpes de rizóbios SEMIA 2081, SEMIA 2082 e SEMIA 222 diferiram do tratamento controle T - N apenas quanto ao número de ácaros, não se observando diferenças quanto ao número de médio de colêmbolos.

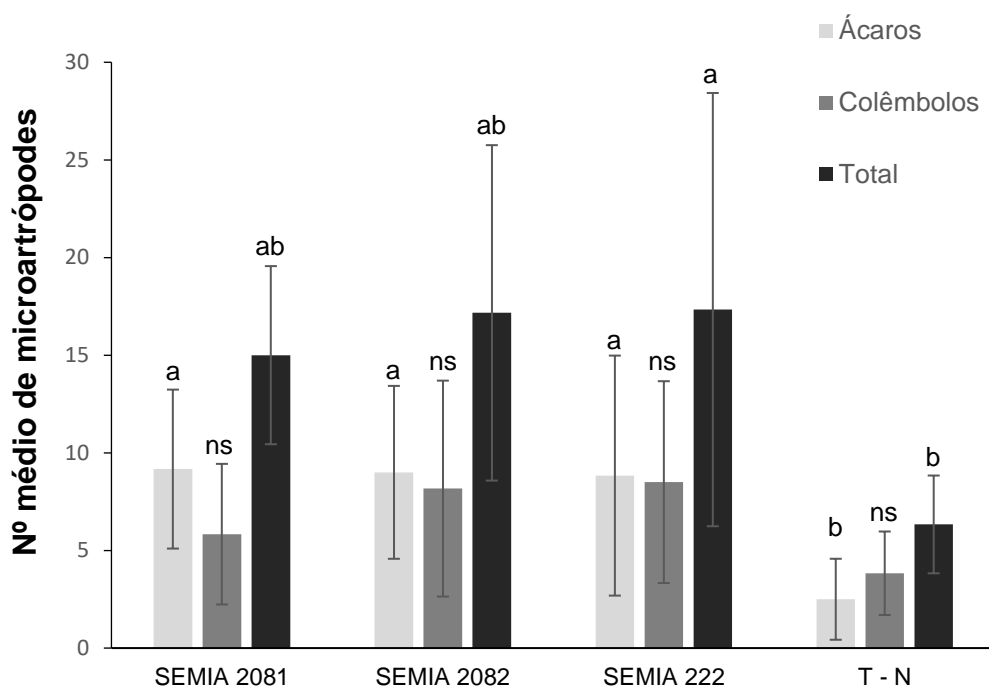


FIGURA 7. Média do número de ácaros, colêmbolos e totais presentes nos tubos com plantas de trevo vermelho (*Trifolium pratense*) inoculados com rizóbios SEMIA 2081, SEMIA 2082, SEMIA 222 e tratamento controle T - N. Legenda: ns – Não significativo pelo teste de Tukey a 5%.

Embora o número total de organismos (ácaros + colêmbolos) dos tratamentos inoculados tenha sido maior que o dobro do observado no tratamento controle sem inoculação T - N, observou-se que apenas o tratamento com as plantas inoculadas com a estirpe SEMIA 222 foi superior ao observado

para o tratamento controle, mas não diferiu dos demais tratamentos inoculados. Este resultado pode ter ocorrido devido à grande variabilidade dos números obtidos no experimento conduzido à campo, onde existem outros fatores que influenciam na distribuição da mesofauna edáfica, mas que, no entanto, não foram avaliados neste trabalho.

Na Figura 8 observa-se que os tratamentos inoculados com as estirpes de rizóbios SEMIA 2081, SEMIA 2082 e SEMIA 222 não diferiram do tratamento controle T + N quanto ao número de ácaros, colêmbolos e número total de ácaros e colêmbolos.

Talvez o fato que melhor explique as diferenças na atratividade provocadas entre os tratamentos inoculados com as estirpes e o controle T - N, e a equivalência dos efeitos de atratividade entre os tratamentos inoculados com as estirpes e o controle T + N seja o estado nutricional das plantas de trevo, principalmente sobre a população da mesofauna herbívora. Kempel et al. (2009), relatam que houve um incremento no número de microartrópodes herbívoros, especialmente afídeos, em armadilhas com plantas que receberam nitrogênio via inoculação com rizóbios ou fonte artificial. Sabendo que grupos de microartrópodes, como os herbívoros, podem ser atraídos, é esperado grupos predadores de herbívoros também sejam atraídos.

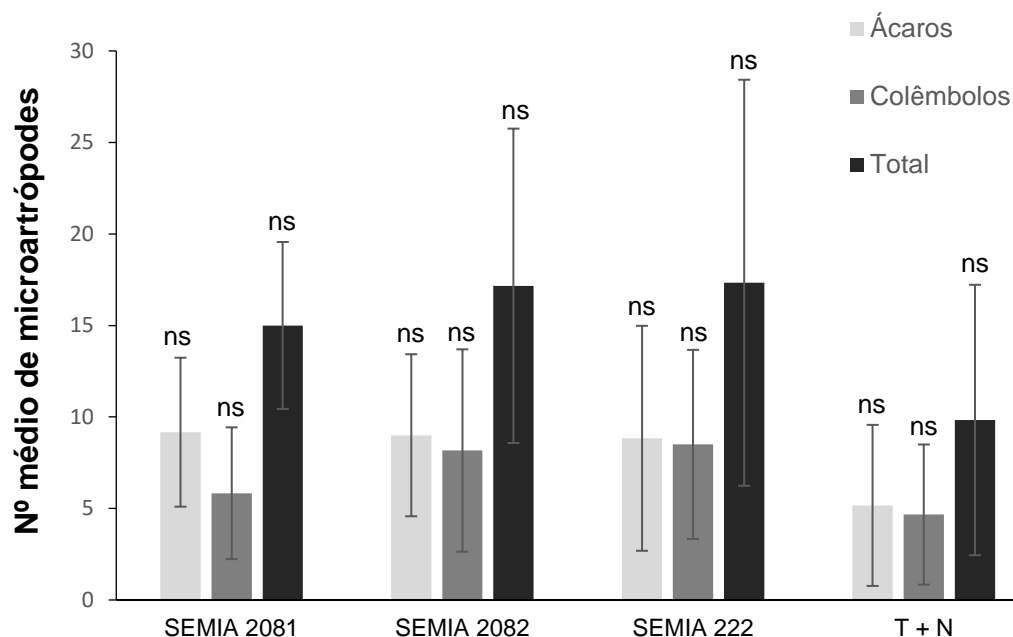


FIGURA 8. Números médios de ácaros, colêmbolos e totais presentes nos tubos com plantas de trevo vermelho (*Trifolium pratense*) inoculados com rizóbios SEMIA 2081, SEMIA 2082, SEMIA 222 e tratamento controle T + N. Legenda: ns – Não significativo pelo teste de Tukey a 5%.

Para ácaros, os índices de riqueza, dominância e diversidade de Shannon não foram significativos entre os tratamentos avaliados (Tabela 2). Os valores de equitabilidade, diferiram entre os tratamentos, sendo que o maior o tratamento T + N apresentou maior equitabilidade, uma vez que a distribuição da abundância total entre as três famílias de ácaros encontradas no tratamento é mais uniforme, quando comparada aos demais tratamentos. O menor valor do índice de equitabilidade foi obtido no tratamento com plantas inoculadas com a estirpe SEMIA 2082, este valor deve-se a distribuição não uniforme da abundância total de ácaros entre as famílias.

TABELA 2. Valores de média e desvio padrão da riqueza, dominância, índice de Shannon e equitabilidade das famílias de ácaros extraídas de tubos com plantas de trevo vermelho sob o efeito de tratamentos inoculados com rizóbios (SEMIA 2081, SEMIA 2082, SEMIA 222); tratamento controle T + N (planta + N 100 kg ha⁻¹); e tratamento controle T - N (planta sem adição de N), que foram inseridas em campo.

Tratamento	Índices ecológicos			
	Riqueza	Dominância	Shannon	Equitabilidade
SEMIA 2081	2,17 ± 0,75 ^{ns}	0,64 ± 0,22 ^{ns}	0,57 ± 0,36 ^{ns}	0,66 ± 0,35 ^{bc}
SEMIA 2082	2,17 ± 0,98 ^{ns}	0,65 ± 0,31 ^{ns}	0,58 ± 0,51 ^{ns}	0,56 ± 0,46 ^c
SEMIA 222	2,33 ± 0,52 ^{ns}	0,52 ± 0,12 ^{ns}	0,58 ± 0,22 ^{ns}	0,88 ± 0,11 ^{bc}
T + N	2,17 ± 0,41 ^{ns}	0,49 ± 0,06 ^{ns}	0,58 ± 0,15 ^{ns}	0,97 ± 0,03 ^a
T - N	1,4 ± 0,55 ^{ns}	0,84 ± 0,23 ^{ns}	0,58 ± 0,33 ^{ns}	0,34 ± 0,48 ^{cd}
H	5,5665	5,7045	5,7045	11,9937
<i>p</i>	0,2340	0,2223	0,2223	0,0174

Médias seguidas pela mesma letra em cada coluna não diferem significativamente pelo teste de Kruskal-Wallis a 10%. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Legenda: ns – Não significativo.

Quanto a riqueza, dominância, índice de Shannon e equitabilidade de colêmbolos, não foi observada uma diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 3). Esta falta de diferenças entre os tratamentos e os controles pode ser explicada devido ao nível de identificação dos indivíduos. Uma identificação mais aprofundada, a nível de gênero poderia fornecer mudanças nos índices ecológicos entre os tratamentos.

TABELA 3. Valores de média e desvio padrão da riqueza, dominância, índice de Shannon e equitabilidade das ordens e famílias de colêmbolos extraídas de tubos com plantas de trevo vermelho sob o efeito de tratamentos inoculados com rizóbios (SEMIA 2081, SEMIA 2082, SEMIA 222); tratamento controle T + N (planta + N 100 kg ha⁻¹); e tratamento controle T - N (planta sem adição de N), que foram inseridas em campo.

Tratamento	Riqueza	Dominância	Shannon	Equitabilidade
SEMIA 2081	2,0 ± 0,63 ^{ns *1}	0,58 ± 0,23 ^{ns}	0,62 ± 0,35 ^{ns}	0,8 ± 0,4 ^{ns}
SEMIA 2082	1,83 ± 0,75 ^{ns}	0,73 ± 0,25 ^{ns}	0,42 ± 0,38 ^{ns}	0,53 ± 0,46 ^{ns}
SEMIA 222	1,67 ± 0,52 ^{ns}	0,76 ± 0,2 ^{ns}	0,36 ± 0,29 ^{ns}	0,52 ± 0,42 ^{ns}
T + N	1,6 ± 0,54 ^{ns}	0,77 ± 0,24 ^{ns}	0,34 ± 0,34 ^{ns}	0,49 ± 0,49 ^{ns}
T - N	1,67 ± 0,82 ^{ns}	0,76 ± 0,28 ^{ns}	0,37 ± 0,45 ^{ns}	0,44 ± 0,5 ^{ns}
H	1,4837	3,4758	3,3312	4,4714
<i>p</i>	0,8295	0,4816	0,5040	0,3459

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Kruskal-Wallis a 10%. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Legenda: ns - Não significativo.

4.3. Avaliação do substrato para a sobrevivência de colêmbolos e cultivo de plantas de trevo vermelho

4.3.1. Capacidade de retenção de água e pH dos substratos

Na Tabela 4 são mostrados os valores de capacidade de retenção de água e pH das diferentes formulações de substratos testadas. O valor de capacidade de retenção de água foi utilizado para que se adicionasse solução nutritiva numa quantidade corresponde de 60% da capacidade de retenção. Quanto aos valores de pH observados nos substratos, não houveram grandes variações, sendo que os mesmos ficaram numa faixa que variou entre 5,19 até 5,26 unidades.

TABELA 4. Valores de capacidade de retenção de água e pH das formulações de substrato testadas.

	Capacidade de Retenção de Água (mL)*	pH
Substrato 1	14	5,25
Substrato 2	14,5	5,23
Substrato 3	16,75	5,20
Substrato 4	16,75	5,26
Substrato 5	17,5	5,19
Substrato 6	18	5,23

* O volume de água adicionado para a verificação foi de 25 mL.

Assim como outros artrópodes da fauna edáfica, os colêmbolos optam por diferentes gradientes de pH de acordo com o local que habitam, podendo se distribuir em faixas de pH que variam de 2,9 a até 7,3 unidades (Van Straalen, 1998; Rusek & Marshall, 2000). No entanto, cada espécie apresenta uma preferência distinta pelas faixas de pH no solo, conforme evidenciado por Loranger et al. (2001). Sendo que o pH dos substratos testados não apresentou grandes variações entre as formulações, permanecendo numa faixa próxima do neutro, o pH não implicou no critério de escolha do substrato.

4.3.2. Sobrevivência de colêmbolos nos substratos

A Tabela 5 mostra os valores do número médio de colêmbolos jovens e adultos recuperados após o teste de sobrevivência em diferentes formulações de substrato testadas.

TABELA 5. Número médio de colêmbolos jovens e adultos recuperados após o teste de sobrevivência em formulações de substrato.

Substrato	Número de colêmbolos	
	Jovens	Adultos
Substrato 1	76 ± 1,6 ^{ab}	8,6
Substrato 2	70,4 ± 15,1 ^{ab}	7
Substrato 3	54,8 ± 20,4 ^b	5,2
Substrato 4	51,6 ± 10,7 ^b	8
Substrato 5	94 ± 12 ^a	10
Substrato 6	77,8 ± 13,6 ^{ab}	10
F tabelado	6,0714	-
<i>p-valor</i>	0,0009	-

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não se diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% para dados com distribuição normal. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk.

Como critério primário na escolha do substrato adequado, considerou-se a formulação que permitiu a sobrevivência de no mínimo 80% dos indivíduos adicionados no início do experimento, de acordo com Fountain & Hopkin (2005), sendo considerados apenas os colêmbolos adultos. Os substratos nos quais foram recuperados o maior número de indivíduos adultos vivos foram os substratos 1, 4, 5 e 6, com número médio de colêmbolos adultos variando entre 8 e 10 indivíduos.

O critério secundário foi baseado no maior número de indivíduos jovens presentes nos substratos, resultantes da reprodução dos espécimes adicionados no início do experimento, presentes nos substratos. Os tratamentos avaliados apresentaram números médios que variaram entre 51,6 indivíduos a 94 indivíduos. O substrato 5 apresentou maior número de indivíduos, diferindo-

se dos substratos 3 e 4. Os tratamentos 1, 2 e 6 apresentaram número intermediário de colêmbolos, porém não se diferiram estatisticamente do número máximo e mínimo encontrado.

Entre os fatores limitantes para a geração de indivíduos jovens está a superpopulação de indivíduos em um ambiente ou substrato. Conforme evidenciado por Green (1964) e Usher et al. (1971), o decréscimo no número de indivíduos está relacionado com uma alta densidade de colêmbolos (populações de mais de um adulto a cada 0,1 e 0,05 cm² respectivamente). Essa densidade leva ao canibalismo dos ovos pelos indivíduos adultos. No experimento, todos os frascos apresentavam um número adequado de colêmbolos e não foi possível relacionar o menor número de indivíduos juvenis em determinado tratamento, com a formulação do substrato.

Sendo que o substrato 5 apresentou maior número de colêmbolos sobreviventes, tanto adultos quanto jovens, este substrato foi escolhido para a realização do Experimento 3 (Item 3.8).

4.3.3. Desenvolvimento das plantas nos substratos

Quanto ao desenvolvimento das plantas de trevo vermelho nos substratos testados (Tabela 6), foi observado que em relação ao comprimento e massa seca de raízes, não houveram diferenças entre os tratamentos.

Para o comprimento de parte aérea, observou-se que os maiores valores de comprimento da parte aérea variaram entre 4,3 cm e 6,6 cm. Os substratos 1 e 3 apresentaram o comprimento superior apenas ao substrato 6.

TABELA 6. Valores médios de comprimento (cm) e massa seca (mg) de plantas de trevo vermelho cultivadas em diferentes formulações de substrato.

Tratamento	Parte aérea		Raiz	
	Comprimento	Massa Seca	Comprimento	Massa Seca*
Substrato 1	6,5 ± 1,0 ^a	8,4 ± 1 ^{ab}	4,0 ± 1,6 ^{ns}	4 ± 1 ^{ns}
Substrato 2	5,6 ± 1,1 ^{ab}	8,5 ± 2 ^{ab}	3,4 ± 1,6 ^{ns}	2 ± 0,3 ^{ns}
Substrato 3	6,6 ± 0,6 ^a	9,7 ± 0,7 ^a	3,9 ± 1,2 ^{ns}	3 ± 0,8 ^{ns}
Substrato 4	5,6 ± 0,5 ^{ab}	8,9 ± 0,6 ^{ab}	3,4 ± 1,0 ^{ns}	4 ± 3 ^{ns}
Substrato 5	5,5 ± 1,2 ^{ab}	7,5 ± 0,8 ^{ab}	3,2 ± 0,9 ^{ns}	4 ± 2 ^{ns}
Substrato 6	4,3 ± 0,5 ^b	6,5 ± 0,5 ^b	3,7 ± 0,9 ^{ns}	1 ± 0,9 ^{ns}
Significância	F = 4,512	F = 0,701	F = 4,412	H = 6,969
<i>p</i>	0,008	0,629	0,008477	0,2230

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não se diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% para dados com distribuição normal, e pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% para dados com distribuição não-normal. A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk.* Distribuição não-normal.

Para os valores médios de massa seca da parte aérea, apenas o substrato 3 se diferiu do substrato 6, com massa média de 9,7 mg e 6,5 mg, respectivamente.

Sendo que os substratos com os maiores valores de comprimento e massa seca da parte aérea não apresentaram diferença estatística quando comparados ao substrato 5, optou-se por utilizá-lo no Experimento 3, já que o mesmo substrato apresentou melhor resultado na sobrevivência dos colêmbolos.

4.4. Colonização de plantas de trevo vermelho intermediada por colêmbolos alimentados com rizóbios

O resultado do pré-teste de desinfestação da superfície externa dos colêmbolos evidenciou que nenhuma colônia bacteriana cultivável cresceu na superfície das placas após o período de incubação. Sugere-se que o álcool e o hipoclorito de sódio atingiram a população bacteriana externa e interna nos colêmbolos. Sendo que não houve a desinfestação externa dos colêmbolos no momento de adição nos tratamentos, é possível que as bactérias tenham sido transportadas via superfície externa do corpo ou disseminação pelos pellets fecais gerados após a alimentação.

Na Tabela 7 são apresentados os números médios de nódulos em plantas de trevo vermelho, após receberem diferentes grupos de colêmbolos vivos ou macerados, mediante alimentação com rizóbios. Ao final do experimento, foi verificado que todas as plantas de trevo vermelho dos tratamentos que receberam indivíduos vivos e macerados dos grupos Hypogastruridae, *Proisotoma* e *Orthonychiurus*, apresentaram nódulos nas raízes, conforme apresentado na Tabela 7.

As plantas do tratamento que recebeu os indivíduos do gênero *Onychiurus* vivos apresentaram 13, 7, 6 e 1 nódulos em cada replicata, respectivamente (média= 6,75). No entanto, no tratamento com as plantas que receberam o inóculo com o macerado dos indivíduos desse gênero, somente uma repetição apresentou 3 nódulos, as 3 replicatas restantes possuíam plantas que não apresentaram nódulos nas raízes. Possivelmente, a falta de nódulos nas plantas ocorreu devido à perda das bactérias do macerado. Essa perda pode

ter ocorrido devido a um erro procedimental. Assim, optou-se por retirar os dados dos tratamentos com colêmbolos do gênero *Onychiurus* vivos e macerados das comparações das médias do número de nódulos.

TABELA 7. Número médio de nódulos em plantas de trevo vermelho submetidas a diferentes grupos de colêmbolos que foram alimentados com rizóbios.

Tratamentos	Número de nódulos	
	Vivos	Macerado
Hypogastruridae	4,5 ^{bB}	12,5 ^{aA}
<i>Orthonychiurus</i>	4,75 ^{bB}	8,5 ^{bB}
<i>Proisotoma</i>	9,5 ^{aB}	8,5 ^{bB}
Inoculado	11	
T + N	0	
T - N	0	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula (na coluna) e maiúscula (na linha) não se diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% para dados com distribuição normal.

Quando verificada a diferença entre o número de nódulos nas raízes das plantas dos tratamentos que receberam os três grupos de colêmbolos vivos, foi encontrada diferença estatística ($F= 6,7693$; $p= 0,016066$). As plantas do tratamento que recebeu indivíduos do gênero *Proisotoma* apresentaram maior número de nódulos que as plantas que receberam colêmbolos *Orthonychiurus* e Hypogastruridae. Conforme observado nos cultivos de laboratório os colêmbolos do gênero *Proisotoma* apresentam uma grande mobilidade nos potes de criação. Sendo que os colêmbolos carregaram os rizóbios internamente ou externamente, é sugerido que o maior número de nódulos formados esteja

relacionado a essa movimentação pelo substrato e maior capacidade de dispersão dos rizóbios na rizosfera vegetal.

Da mesma forma, foram comparados os tratamentos que receberam os colêmbolos macerados, sendo que houve diferença ($F= 9,7863$; $p= 0,00525$) entre os tratamentos testados. Porém, diferindo-se de quando analisados os colêmbolos vivos, o maior número de nódulos foi observado nas plantas que receberam o macerado de colêmbolos da família Hypogastruridae. Os tratamentos com colêmbolos dos gêneros *Proisotoma* e *Orthonychiurus* apresentaram valores inferiores que não diferiram entre si.

Ao avaliar cada grupo de colêmbolo individualmente, verificando a diferença no número de nódulos entre o tratamento com os indivíduos vivos e os indivíduos macerados, foi observada diferença em pelo menos um tratamento. As plantas que receberam o conteúdo macerado de colêmbolos Hypogastruridae apresentaram número superior de nódulos quando comparadas às plantas que receberam os colêmbolos da mesma espécie vivos ($p= 0,002059$). Quanto as plantas dos tratamentos que receberam os colêmbolos de *Proisotoma* e *Orthonychiurus*, não houve diferença nas médias dos números de nódulos nas raízes entre as plantas que receberam os colêmbolos vivos e as plantas que receberam o macerado de colêmbolos.

Thimm et al. (1998), mostraram que pode haver variação na sobrevivência de diferentes espécies de bactérias quando no interior dos colêmbolos. Ao alimentar colêmbolos da espécie *Folsomia candida* com um isolado de *Escherichia coli*, foi constatado que essas bactérias puderam sobreviver por apenas um dia após serem fornecidas como fonte de alimentação,

enquanto que isolados bacterianos de *Stenotrophomonas maltophilia* e *Sinorhizobium meliloti* foram detectados entre 8 e 11 dias após serem fornecidos como fonte de alimento. Conforme observa Thimm (1998), a localização das bactérias no epitélio intestinal, e a muda periódica que o colêmbolos realiza, inclusive do epitélio interno são outros fatores determinantes na variação da população bacteriana.

A variação no número de nódulos entre os tratamentos “vivo” e “macerado” pode variar em função da sobrevivência da bactéria no trato gastrointestinal do colêmbolo. O menor número de nódulos nas plantas que receberam os colêmbolos Hypogastruridae vivos pode ter ocorrido devido a população bacteriana ingerida ter sofrido um decréscimo após a passagem pelo trato gastrointestinal, uma vez que as bactérias podem não estar adaptadas ao ambiente interno. Já as plantas inoculadas com o macerado destes colêmbolos apresentaram o número de nódulos superior, pois a população bacteriana inoculada não sofreu um decréscimo populacional.

Sendo que não houve mudança no número de nódulos entre os tratamentos “vivo” e “macerado” de *Proisotoma* e *Orthonychiurus*, supõe-se que a população bacteriana permaneceu constante quando em contato com estes organismos, até o momento em que entraram em contato com as raízes das plantas. Isto indica que o interior desses gêneros de colêmbolos proporcionou um ambiente favorável para o estabelecimento dos rizóbios fornecidos pela alimentação.

5. CONCLUSÕES

Plantas de trevo vermelho, quando inoculadas com rizóbios das estirpes SEMIA 2081, SEMIA 2082 e SEMIA 222, promovem efeito de atratividade sobre diferentes grupos de ácaros edáficos em campo. No entanto, as mesmas estirpes não exercem efeito de atratividade sobre colêmbolos edáficos em campo.

Plantas de trevo vermelho não inoculadas com estirpes bacterianas, mas que recebem nitrogênio na forma artificial exercem o mesmo efeito de atratividade das plantas inoculadas com as estirpes de rizóbios sobre ácaros edáficos em campo.

Colêmbolos da família Hypogastruridae e gêneros *Orthonychiurus* e *Proisotoma*, quando submetidos a uma fonte de alimento contendo rizóbios da estirpe SEMIA 2081 são capazes de transferir essas bactérias para plantas de trevo vermelho, gerando nódulos em suas raízes.

Ácaros pertencentes à família Uropodidae são atraídos por plantas de trevo vermelho inoculadas com a estirpe de rizóbio SEMIA 2081.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIS, J. On the abundance and density of terrestrial arthropods in Central Amazonian dryland forests. **Journal of tropical ecology**, Cambridge, v. 4, p. 19-24, 1988.

ASSAD, M. L. L. Fauna do solo. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M., (Ed.) **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, p. 363-443, 1997.

AMPOMAH, O. Y. et al. Host range, symbiotic effectiveness and nodulation competitiveness of some indigenous cowpea 56 bradyrhizobia isolates from the transitional savanna zone of Ghana. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 988-996, 2008.

ANDERSON, J. M. Invertebrate-mediated transport process in soils. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 25, p. 5-14, 1988.

AZPIAZU, M. D. et al. Clave dicotómica para la determinación de los colémbolos de Cuba (Hexapoda: Collembola). **Boln. Sociedad Entomologica Aragonesa - SEA**, n. 34, p. 73-83, 2004.

BAIS, H. P. et al. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 233-266, 2006.

BARETTA, D. **Fauna do solo e outros atributos edáficos como indicadores da qualidade ambiental em áreas com *Araucaria angustifolia* no Estado de São Paulo**. Piracicaba. 2007. 158p. Tese (Doutorado) – Pós-Graduação em Agronomia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (Esalq), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, SP, 2007.

BEHAN, V. A.; STUART, B. B.; MCKEVAN, D. K. Effects of nitrogen fertilizers, as urea, on Acarina and other arthropods in Quebec black spruce húmus. **Pedobiologia**, Jena, v. 18, p. 249-263, 1978.

BEHAN-PELLETIER, V. Oribatid mites biodiversity in agroecosystems: role for bioindication. **Agric. Ecosyst. Environ.** v. 74, p. 411–423, 1999.

BEHAN-PELLETIER, V.; EAMER, B. Aquatic Oribatida: adaptations, constraints, distribution and ecology. **Acarology**, v. 11, p. 71–82, 2007.

BELLINGER, P. F.; CHRISTIANSEN, K. A.; JANSSENS, F. **Checklist of the Collembola of the world**. Disponível em: <<http://www.collembola.org>>. Acesso em: 20 mar. 2015.

BENGTSSON, G. Dispersal, heterogeneity and resistance: challenging soil quality assessment. In: VAN STRAALLEN, N. M.; LOKKE, H. (Eds.) **Ecological Principles for Risk Assessment of Contaminants in Soil**. Chapman & Hall, London & New York, 1997, p. 73-83.

BENITE, A. M. C.; MACHADO, S. P.; MACHADO, B. C. Sideróforos: Uma resposta dos microrganismos. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, p. 1155-1164, 2002.

BRADFORD, M. A. Microbiota, fauna, mesh size interaction in litter decomposition. **Oikos**, Buenos Aires, v. 99, n. 2, p. 317-323, 2002.

BOLETIM CLIMÁTICO [do] INMET, Pelotas Ufpel, ano 13, n. 5, 6 p., 2015.

CANIGIA, M. V. F., **Manual de nodulacion**. 2003. Disponível em: <<http://www.nitragin.com.ar/Manual%20de%20nodulacion-Sept03.pdf>>. Acesso: 15 jul. 2015.

CARDOSO, E. J.; TSAI, S. M. NEVES, M. C. Microbiologia do solo. In: **Bioquímica e fisiologia da fixação biológica de nitrogênio**. Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, Campinas, p. 141-155, 1992.

CASARINO, J. P.; NUNES, S. P. **Impactos dos agrotóxicos na biologia do solo**, 2008. Disponível em: <<http://www.ecovida.org.br/sistema/arquivos/ART000191.pdf>> Acesso: 10 mai. 2015.

CASTILHO, R. C.; MORAES, G. J.; NARITA, J. P. Z. A new species of *Gamasiphis* (Acari: Ologamasidae) from Brazil, with a key to species from the Neotropical Region. **Zootaxa**, Auckland, v. 2452, p. 31–43, 2010.

CHAMBERLAIN, P. M. et al. Translocation of surface litter carbon into soil by Collembola. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, p. 2655-2664, 2006.

CHRISTIANSEN, K.; BELLINGER, P. **The Collembola of North America. North of Rio Grande**. Grinnell College, Grinnell, Iowa. 1322 p., 1998.

COLEMAN, D. C.; CROSSLEY, D. A. Jr. **Fundamentals of soil ecology**. San Diego: Elsevier Academic, 1995. 205 p.

CORREIA, M. E. F. **Potencial de utilização dos atributos das comunidades de fauna do solo e de grupos de invertebrados como bioindicadores do manejo de ecossistemas**. Seropédica: EMBRAPA Agrobiologia, 2002. 23 p. (Documentos, 157).

CORREIA, M. E. F.; OLIVEIRA, L. C. M. **Fauna do solo: aspectos gerais e metodológicos**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. 46 p. (Documentos, 112).

CREWS, T. E. The presence of nitrogen fixing legumes in terrestrial communities: Evolutionary vs ecological considerations. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 46, n. 1/3, p. 233-246, 1999.

CULIK, M.; ZEPPELINI, D. Diversity and distribution of Collembola (Arthropoda: Hexapoda) of Brazil. **Biodiversity and Conservation**, v. 12, p. 1119-1143, 2003.

DEHARVENG, L. Real advances in Collembola systematics. **Pedobiologia**. Göttingen, Germany, v. 48, p. 415-433, 2004.

DROZDOWICZ, A. G. Microbiologia ambiental. In: ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L. R.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) **Tratado de microbiologia**. Rio de Janeiro: Manole, v. 2, 1991. p. 1-102.

DUCATTI, F. **Fauna edáfica em fragmentos florestais e em áreas reflorestadas com espécies da Mata Atlântica**. 2002. 70p. Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2002.

EL-BANHAWY, E. M.; EL-BOROLOSSY, M. A.; EL-SAWAF, B.M.; AFIA, S.I. Biological aspects and feeding-behavior of the predacious soil mite *Nenteria hypotrichus* (Uropodina: Uropodidae). **Acarologia**, v. 38(4), 1997, p. 357-360, 1997.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisas de Solos. **Manual de métodos de análises de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 230 p.

FINGER, G. P. **Efeito do fósforo sobre a interação das bactérias isoladas da rizosfera de guandu (*Cajanus cajan*)**. 2002. 71p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2002.

FORSTHOFER, E. L. et al. Desempenho agrônomo e econômico do milho em diferentes níveis de manejo e épocas de semeadura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 3, p. 339-407, 2006.

FOUNTAIN, M. T.; HOPKIN, S. P. *Folsomia candida* (Collembola): A “standard” soil arthropod, **Annu. Rev. Entomol.**, v. 50, p. 201-222, 2005.

FRED, E. B.; BALDWIN, I. L. McCOY, E. **Root nodule bacteria and leguminous plants**. Madison: University of Wisconsin, 1932. 132 p. Disponível em: <<http://digital.library.wisc.edu/1711.dl/HistSciTech.RootNodule>>. Acesso: 09 fev. 2015.

GALLOWAY, J. N. et al. Nitrogen cycles: The past, presence and future. **Biogeochemistry**, Dordrecht, v. 70, p. 153-226, 2004.

GERSON, U.; SMILEY, R. L.; OCHOA, R. **Mites for pest control**. Oxford: Blackwell Science, 2003. 539p.

GILLER, P. The diversity of soil communities, the “poor man`s tropical rainforest”. **Biodiversity and Conservation**, London, v. 5, p. 135-168, 1996.

GIRACCA, E. M. N. et al. Levantamento da meso e macrofauna do solo na microbacia do Arroio Lino, Agudo/RS. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 9, n. 3, p. 257-261, 2003.

GOTO, H. E. Simple techniques for the rearing of Collembola and a note on the use of a fungistatic substance in the cultures. **The Entomologist’s Monthly Magazine**, v. 96, p. 138-140, 1961.

GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 37, p. 395-412, 2005.

GRAYSTON, S. J. et al. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 30, p. 369-378, 1998.

GREEN, C. D. The effect of crowding upon the fecundity of *Folsomia candida* (William) var. *Distincta* (Bagnall) (Collembola). **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 7, p. 62-70, 1964.

GISIN, H. *Ökologie und Lebensgemeinschaften der Collembolan im schweizerischen Exkursionsgebiet Basels*. **Revue Suisse de Zoologie**, v. 50, p. 131-224, 1943.

HAHN, L. **Promoção de crescimento de plantas pela inoculação de rizóbios simbiotes em leguminosas e bactérias diazotróficas associativas**. 2013. 175p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. **PAST: Paleontological statistics**. Version 1.69. Disponível em: <<http://folk.uio.no/ohammer/past/>>. Acesso: 09 abr. 2015.

HEIDEMANN, K.; RUESS, L.; SCHEU, S; MARAUN, M. Nematode consumption by mite communities varies in different forest microhabitats as indicated by molecular gut content analysis. **Exp. Appl. Acarol.** v. 64(1), p. 49-60, 2014.

HOPKIN, S. P. **Biology of the Springtails** (Insecta: Collembola), 1 ed. Oxford University Press, New York, 1997. 330 p.

HOPKIN, S. P. A Key to the Collembola (Springtails) of Britain and Ireland. – AIDGAP: Shrewsbury, UK, 2007. 245 p.

HOLT, J. A. The vertical distribution of cryptostigmatic mites, soil organic matter and macroporosity in three North Queensland rainforest soils. *Pedobiologia*, v. 22, p. 202–209, 1981.

HUNGRIA, M.; STACEY, G. Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia: basic aspects and potential application in agriculture. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 19, p. 819-830, 1997.

ISO - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Soil quality-Avoidance test for testing the quality of soils and effects of chemicals-Part 2: tests with collembolans (*Folsomia candida*)**. ISO Draft 17512 - 2. Geneva, 2007.

JONES, D. L. Organic acids in the rhizosphere - a critical review. **Plant Soil**, v. 205, p. 25-44, 1998.

JONES, K. M. et al. How rizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 619-633, 2007.

JORDANA, R.; ARBEA, J. I. Clave de identificación de los gêneros de Colémbolos de Espana (Insecta: Collembola). Pamplona, Espanha. **Publicaciones de Biología de la Universidade de Navarra**, Série Zoológica, n. 19, p. 1-16, 1989.

KEMPEL, A.; BRANDL, R.; SCHADLER, M. Symbiotic soil microorganisms as players in aboveground plant–herbivore interactions – the role of rhizobia. **Oikos**, n. 118, p. 634–640, 2009.

KRANTZ, G. W. **A manual of acarology**. 1 ed. Corvallis: Oregon State University, 1970. 335 p.

KRANTZ, G. W.; AINSCOUGH, B. Acarina Mesostigmata (Gamasida). **Soil Biology Guide**, Brisbane, p. 583-665, 1990.

LAVELLE, P. Faunal activities and soil processes: Adaptive strategies that determine ecosystems function. In: **Transactions of the 15 th World Congress of Soil Science**. Inaugural and state of the art conferences. ISSS, Acapulco, México. 1994. p.189-220.

LAVELLE, P. et al. **Impact of soil fauna on the properties of soils in the humid tropics**. Madison: SSSA, n. 29, 1992.

LINDQUIST, E. E.; KRANTZ, G. W.; WALTER, D. E. Classification. In: G.W. KRANTZ, G. W.; WALTER, D. E. (eds.). **A Manual of Acarology**, Third Edition. Texas Tech University Press, Lubbock. Chapter 8, p. 97-103, 2009.

LORANGER, G. et al. Does soil acidity explain altitudinal sequences in Collembolan communities? **Soil Biology & Biochemistry**, v. 33, p. 381-393, 2001.

LUSSENHOP, J. Effects of two collembola species on nodule occupancy by two Bradyrhizobium japonicum strains. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 25, n. 6, p. 775-780, 1993.

MACHADO, R. G. **Seleção de bactérias promotoras de crescimento para plantas forrageiras**. 2015. 123p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

MARAUN, M.; SCHEU, S.; HEINRICH, S. Awesome or ordinary? Global diversity patterns of oribatid mites. **Ecography**. v. 30, p. 209–216, 2007.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Ecologia Microbiana. In: **Microrganismos Endofíticos**. p. 117-139 – Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998, 488 p.

MERCANTE, F. M.; GOI, S. R.; FRANCO, A. A. Importância dos compostos fenólicos nas interações entre espécies leguminosas e rizóbio. **Revista Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v. 22, n. 1, p. 65-81, 2002.

MEURER, E. J. Fatores que influenciam o crescimento e o desenvolvimento das plantas. In: NOVAIS, R. F. et al. (Eds.) **Fertilidade do solo**. SBCS, Viçosa, 2007. p. 65-90.

MINEIRO, J. L. C.; MORAES, G. J. Gamadida (Arachnida: Acari) edáficos de Piracicaba, Estado de São Paulo. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 379-385, 2001.

MOÇO, M. K. S. et al. Caracterização da fauna edáfica em diferentes coberturas vegetais na região norte fluminense. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, p. 555-564, 2005.

- MORAES, G. J.; FLECHTMANN, C. H. W. **Manual de acarologia**: acarologia básica de ácaros de plantas cultivadas no Brasil. Ribeirão Preto: Holos, 2008. v. 1, 288 p.
- MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Editora UFLA, 2 ed., 2006. 729 p.
- NARDI, S. et al. Soil organic matter mobilization by root exudates. **Chemosphere**, v. 41, p. 653-658, 2000.
- OLIVEIRA, A. R. **Efeito do *Baculovirus anticarsia* sobre Oribatida edáficos (Arachnida: Acari) na cultura da soja**. 1999. 69f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.
- PARK, E. K. Effect of laboratory culture conditions on population growth of *Proisotoma minuta* (Tullberg) (Collembola: Isotomidae). **Entomological Science**, v. 10, n. 2, p. 135-140, 2007.
- PIELOU, E. C. **Ecological diversity**. New York: John Wiley & Sons, 1975. 165p.
- PINHO, R. S. et al. Gênero *Hypogastura* (Bourlet, 1939) (Hexapoda, Collembola, Poduridae) no litoral norte da ilha de São Luiz, Maranhão, Brasil - perspectivas de bioindicador. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8., 2007, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: UFMG, 2007.
- PONGE, J. F. Vertical distribution of Collembola (Hexapoda) and their food resources in organic horizons of beech forests. **Biology and Fertility of Soils**, Springer Verlag, v. 32 (6), p. 508-522, 2000.
- RIEFF, G. G. **Monitoramento de ácaros e colêmbolos como potenciais indicadores biológicos de qualidade do solo**. 2010. 59p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2010.
- RIEFF, G. G. **Dinâmica dos ácaros e colêmbolos edáficos e seu potencial como bioindicadores da qualidade do solo em áreas sob diferentes sistemas de manejo**. 2014. 120p. Dissertação (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2014.
- RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v.17, p. 319-339, 1999.
- RUSEK, J. Biodiversity of Collembola and their functional role in the ecosystem. **Biodiversity and Conservation**, v. 7, p. 1207-1219, 1998.

RUSEK, J.; MARSHALL, V. G. Impacts of airborne pollutants on soil fauna. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, v. 31, p. 395–423, 2000.

SARRUGE, J. R. Soluções nutritivas. **Summa Phitopatologica**, Piracicaba, v. 1, n. 3, p. 237-234, 1975.

SAUTTER, K.; SANTOS, H. R. Insetos bioindicadores na recuperação de solos. **Ciência Hoje**, Belo Horizonte, v. 12, n. 72, p. 20-21, 1991.

SCHNEIDER, K.; RENKER, C.; MARAUN, M. Oribatid mite (Acari, Oribatida) feeding on ectomycorrhizal fungi. **Mycorrhiza**, v. 16, p. 67–72, 2005.

SCHULTZ, J. W. Evolutionary morphology and phylogeny of Arachnida. **Cladistics**, v.6, p. 1-38, 1990.

STEFFEN, R. B.; ANTONIOLLI, Z. I.; STEFFEN, G. P. K. Avaliação de substratos para reprodução de colêmbolos nativos em condições de laboratório. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 17, n. 3, p. 265-269, 2007.

STROBEL, B. J.; BERNHOLF, I.; BORGGAARD, O. K. Low molecular- weight aliphatic acids in soil solution under different vegetations determined by apillary zone electrophoresis. **Plant Soil**, v. 212, p. 115-121, 1999.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. **Handbook for Rhizobia: Methods in Legume-Rhizobium technology**. Springer-Verlag, NewYork, 1994. 450 p.

STRALIOTTO, R.; TEIXEIRA, M. G. A variabilidade genética do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.L): aplicações nos estudos das interações simbióticas e patogênicas. **Seropédica: Embrapa Agrobiologia**, 59p. (Embrapa-Agrobiologia. Documentos, 126) 2000.

SWIFT, M. J.; HEAL, O. W.; ANDERSON, J. M. **Decomposition in terrestrial ecosystems**. Berkeley: University of California, 1979. 372 p.

THIMM, T. et al. The gut of the soil microarthropod *Folsomia candida* (Collembola) is a frequently changeable but selective habitat and a vector for microorganisms. **Appl Environ Microbiol**, v. 64, p. 2660–2669, 1998.

USHER, M. B.; LONGSTAFF, B. C.; SOUTHALL, D. R. Studies on populations of *Folsomia candida* (Insecta: Collembola). **Oecologia**, v. 7, 68-79, 1971.

VAN STRAALLEN, N. Evaluation of bioindicator systems devived from soil arthropod communities. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 9, p. 429-437. 1998.

VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1997. 524 p.

VIEIRA, M. H. P. et al. Mesofauna edáfica e populações de Ácari, Collembola e Insecta em ambientes com e sem serapilheira. **Cerrados**: Revista de Ciências Agrárias, v.5, p. 29-32, 2002.

VINCENT, J. M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blacwell Scientific, 1970. 164 p.

VISSER, S. Role of the soil invertebrates in determining the composition of soil microbial communities. In: FITTER, H. A. et al. (Coord.). **Ecologicals interations in soil: plants, microbes and animals**. Oxford: Blackweel Science, 1985. p. 287-317.

VIPREY, V. et al. Symbiotic implication of type III protein secretion machinary in *Rhizobium*. **Molecular Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 1381-1389, 1998.

WALTER, D. E.; KRANTZ, G.; LINDGUIST, E. **Acari – The mites**. 1996. Disponível em: <<http://tolweb.org/Acari/2554>>. Acesso: 26 jun. 2015.

WILLEMS, A. The taxonomy of rhizobia: an overview. **Plant and Soil**, v. 287, p. 3-14, 2006.

ZANG, Z. Q. **Mites of greenhouses: identification, biology and control**. London: CABI Publishing, 2003. 244p.

7. APÉNDICES

APÊNDICE 1. Levedura Manitol (LM) (Vincent, 1970)

Manitol	10 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Extrato de levedura	0,4 g
Água Destilada	1000 mL

O pH deve ser ajustado para 6,8.

Para o preparo em placas, adicionar 15 g L⁻¹ de ágar e 25 mg L⁻¹ de corante Vermelho Congo. Para verificar a reação de pH no meio de cultura, adicionar o ágar e azul de bromotimol 25 mg L⁻¹.

Autoclavar a 121 °C por 20 minutos.

APÊNDICE 2. Meio de Hoyer (Moraes & Flechtmann, 2008)

Hidrato de Cloral	200 g
Goma arábica	30 g
Glicerina	20 g
Água Destilada	40 mL

Aquecer a água entre 50 a 60 °C e adicionar a goma arábica, mantendo a solução sob agitação até homogeneizar.

Após, adicionar o hidrato de cloral e a glicerina lentamente para evitar a formação de grumos.

Após a mistura final estar homogênea, deixar filtrar em papel filtro.

APÊNDICE 3. Solução Nutritiva (Sarruge, 1975)

<u>Componentes</u>	<u>Sol. Estoque (g/L)</u>	<u>Sol. Final (1 litro)</u>
KH ₂ PO ₄	136,1 (1M)	1 mL
MgSO ₄ x 7H ₂ O	246,4 (1M)	2 mL
CaCl ₂	111,1 (1M)	5 mL
KCl	74,6 (1M)	5 mL
Solução de Fe EDTA* ¹		1 mL
Solução de Micronutrientes* ²		1 mL

*¹ Solução de Fe EDTA

Na EDTA (Titriplex III – C₁₀H₁₄N₂Na₂O₈ . 2H₂O) 3,72 g

FeSO₄ . 2H₂O 3,78 g

*² Solução de Micronutrientes

H₃BO₃ 2,86 g

ZnCl₂ 0,1 g

CuSO₄ . 5H₂O 0,04 g

Na₂MoO₄ . 4H₂O 0,02 g

Dissolver as soluções de Fe EDTA e de Micronutrientes em água destilada e completar o volume de cada solução para 1000 mL.

Solução nutritiva correspondente a 100%. Caso haja necessidade de uma concentração menor, diluir com água destilada.

Ajustar o pH aproximadamente 6,0.

Autoclavar a 121 °C por 20 minutos.