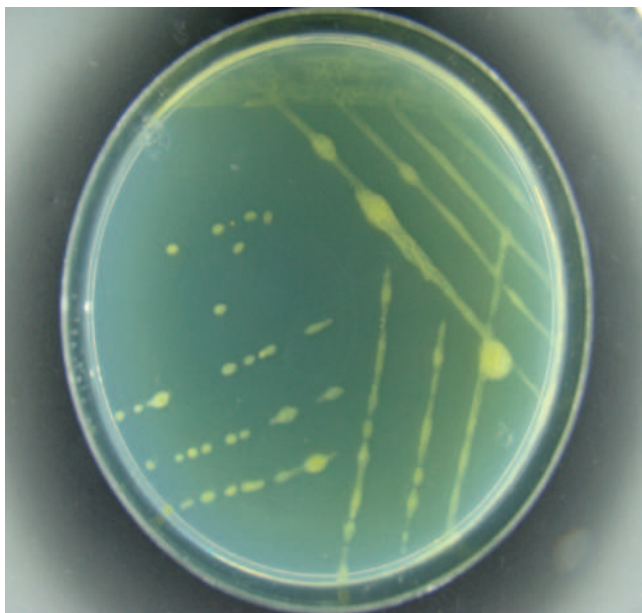


Foto: Paulo Ivan Fernandes Júnior.



## Duplex PCR para a Amplificação Simultânea de Fragmentos dos Genes *nifH* e *nodC* em Bactérias Isoladas de Nódulos de Leguminosas

Paulo Ivan Fernandes Júnior<sup>1</sup>

Carolina Vianna Morgante<sup>2</sup>

Carlos Alberto Tuão Gava<sup>3</sup>

Carlos Antonio Fernandes Santos<sup>4</sup>

Jussara Barboza Alencar Cunha<sup>5</sup>

Lindete Míria Vieira Martins<sup>6</sup>

### Introdução

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é um processo natural realizado por um conjunto de bactérias denominadas bactérias diazotróficas. Diversas dessas bactérias podem se associar a plantas e fornecer parcial ou totalmente o nitrogênio (N) demandado pelo hospedeiro. Dentre as associações entre bactérias diazotróficas e espécies vegetais, a melhor estudada e caracterizada é a simbiose rizóbio-leguminosa, onde há a formação de nódulos radiculares e/ou caulinares como estruturas anatômica e fisiologicamente especializadas para maximizar a FBN (FERNANDES JÚNIOR; REIS, 2008).

Diversas leguminosas de importância econômica podem estabelecer simbiose com isolados de rizóbio capazes de fixar elevadas quantidades de N.

Para maximizar a FBN nos agroecossistemas, a inoculação de bactérias selecionadas tem sido uma prática recorrente. Para tanto, é necessário um constante trabalho de seleção de rizóbios cada vez mais eficientes e competitivos, o que tem resultado na estruturação de coleções de culturas de rizóbio para diversas leguminosas ao redor do mundo. Para a obtenção dessas bactérias, é necessário isolá-las de nódulos de plantas coletadas no campo ou cultivadas em vasos.

No processo de isolamento de bactérias nodulantes, os nódulos são lavados e desinfestados superficialmente com o objetivo de eliminar os micro-organismos não rizobianos (contaminantes) presentes em sua superfície. A desinfestação superficial pode ser realizada com uma série de agentes sanitizantes como hipoclorito de sódio, peróxido de hidrogênio ou bicloreto de mercúrio

<sup>1</sup>Biólogo, D.Sc. em Ciência do Solo, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, paulo.ivan@embrapa.br.

<sup>2</sup>Bióloga, D.Sc. em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisadora da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, carolina.morgante@embrapa.br.

<sup>3</sup>Engenheiro-agrônomo, D.Sc. em Proteção de Plantas, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, carlos.gava@embrapa.br.

<sup>4</sup>Engenheiro-agrônomo, Ph.D. em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisador da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, carlos-fernandes.santos@embrapa.br.

<sup>5</sup>Engenheira-agrônoma, Mestranda em Horticultura Irrigada, Universidade do Estado da Bahia, Juazeiro, BA, jussara\_bac@yahoo.com.br.

<sup>6</sup>Engenheira-agrônoma, D.Sc. em Ciência do Solo, professora adjunta da Universidade do Estado da Bahia, Juazeiro, BA, mirialind@yahoo.com.br.

(SOMASEGARAN; HOBEN, 1994). Em seguida, o conteúdo dos nódulos é inoculado em placas de Petri contendo meio de cultura YMA sólido (VINCENT, 1970).

Nesse procedimento, o isolamento de micro-organismos não nodulantes tem sido relatado na literatura científica. As principais causas da presença de bactérias não nodulantes obtidas no isolamento podem ser: o isolamento de contaminantes remanescentes na superfície dos nódulos que apresentam características culturais similares a certos grupos de rizóbio (LIMA et al., 2012); a coexistência de bactérias não nodulantes com os rizóbios dentro dos nódulos (MURESU et al., 2008); a perda de plasmídeos que carregam os genes relacionados à simbiose por alguns rizóbios ao longo de sucessivos subcultivos no processo de isolamento, purificação e estocagem das bactérias (GARCIA DE LOS SANTOS et al., 1996).

Para evitar gastos de recursos e de tempo com a caracterização e avaliação de bactérias que não apresentam a capacidade de nodular, é recomendada a utilização do postulado de Koch adaptado à rizobiologia em que a confirmação da nodulação é realizada em experimentos com substrato estéril no qual a bactéria isolada é reinoculada na planta hospedeira original. Esse processo, conhecido como “autenticação”, geralmente é realizado em condições de casa de vegetação, utilizando-se, por exemplo, vasos de Leonard modificados com areia e vermiculita como substrato (VINCENT, 1970). As plantas inoculadas com os isolados sob avaliação devem apresentar a formação dos nódulos para que as bactérias sejam consideradas como rizóbios e possam ser selecionadas para estudos subsequentes.

Os experimentos em casa de vegetação para a autenticação ocupam grande espaço e correm o risco de serem perdidos caso o tratamento controle não inoculado apresente nódulos originados de contaminação no decorrer da condução do experimento. Nestes ensaios, a obtenção do resultado depende do desenvolvimento vegetativo da espécie avaliada, podendo levar muito tempo para algumas culturas. Dessa forma, novas abordagens metodológicas que reduzam a quantidade de isolados a serem avaliados nos ensaios de autenticação ou suprimam sua necessidade têm sido demandadas.

Neste contexto, o desenvolvimento ou adequação de métodos em biologia molecular que sejam rápidos, de fácil execução e de custo relativamente baixo pode auxiliar na determinação da capacidade nodulífera de bactérias isoladas de nódulos de leguminosas. A utilização de reação em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação de genes que ocorrem de forma mais abundante (ou até mesmo exclusiva) em rizóbios do que em outras bactérias pode ser uma estratégia interessante. Alguns dos genes dos rizóbios não são constitutivos e estão envolvidos exclusivamente na simbiose. Dessa forma, apesar de haver mecanismos de transferência horizontal de genes entre micro-organismos do solo, a confirmação da presença destes genes aumenta a probabilidade de que a bactéria isolada dos nódulos seja uma bactéria simbiote e apresente a capacidade de nodular a planta hospedeira.

A detecção destes genes como o gene *nodC* (envolvido na síntese de enzimas envolvidas na biossíntese dos lipopolissacarídeos denominados fatores *nod*) e o gene *nifH* (que codifica a subunidade nitrogenase redutase do complexo enzimático nitrogenase) são descritas na literatura e iniciadores já foram desenvolvidos para sua amplificação por PCR (LAGUERRE et al., 2001; POLY et al., 2001). Recentemente, a amplificação individual dos genes *nifH* e *nodC* foi proposta como avaliação prévia da capacidade diazotrófica e nodulífera de bactérias isoladas de nódulos de leguminosas (MOTHAPO et al., 2013). Entretanto, há escassez de trabalhos com o objetivo de avaliar esses iniciadores para uso em conjunto, com o intuito de realizar a amplificação dos dois genes ao mesmo tempo.

A adaptação de um protocolo de PCR que possibilite a amplificação simultânea desses genes, em um sistema duplex, pode contribuir para a redução do trabalho e do tempo gasto com a autenticação das bactérias isoladas de nódulos das coleções de culturas. Além disso, apresenta vantagem sobre a detecção de um único *amplicon*, pois reduz o custo das reações e maximiza a utilização dos equipamentos possibilitando o teste de um maior número de isolados ao mesmo tempo. A utilização dos métodos de PCR em multiplex (ou simplesmente multiplex PCR) é muito difundida na microbiologia médica, veterinária (CORDEIRO et al., 2008) e

fitopatologia (RESTREPO et al., 2008) para a detecção de diversos patógenos. Poucas aplicações com esta abordagem têm sido desenvolvidas na microbiologia do solo ou ambiental, especialmente na rizobiologia.

Neste trabalho são apresentados os resultados de um método de PCR duplex para a amplificação simultânea de fragmentos dos genes *nifH* e *nodC* em rizóbios.

### Adaptação das condições de reação para a amplificação simultânea de fragmentos dos dois genes

Foram utilizadas as estirpes de rizóbio BR 322 (CIAT 899<sup>T</sup>) de *Rhizobium tropici* (estirpe atualmente autorizada para a produção de inoculantes para a cultura do feijoeiro, comum no Brasil), BR 4007 de *Ensifer* sp. (estirpe atualmente autorizada para a produção de inoculantes para a algaroba no Brasil), BR 3267 de *Bradyrhizobium* sp. e BR 3262 de *B. japonicum* (duas das estirpes atualmente recomendadas para a produção de inoculantes para o feijão-caupi no Brasil). Também foram utilizadas as estirpes BR 11001 (Sp7<sup>T</sup>) de *Azospirillum brasilense* (estirpe tipo da espécie) e BR 11417 (Z94) de *Herbaspirillum seropedicae* (estirpe com eficiência agrônômica comprovada para a cultura do milho).

As estirpes BR 322 e BR 4007 foram crescidas em meio YM (manitol-extrato de levedura) por 3 dias,

enquanto a BR 3267 e BR 3262 foram crescidas no mesmo meio por 6 dias. As estirpes BR 11001 e BR 11417 foram cultivadas em meio NFb (DÖBEREINER et al., 1995) líquido por 5 dias. Todas as bactérias foram crescidas em agitador orbital sob agitação constante de 100 rpm à temperatura ambiente.

Para a adaptação dos métodos e desenvolvimento das reações foram utilizadas amostras de DNA extraído utilizando-se o *kit* comerciais, de acordo com as instruções do fabricante. O DNA extraído foi armazenado a -20 °C. Nas PCRs foram utilizados os iniciadores PoIF (TGCGAYCCSAARGCBGACTC) e PoIR (ATSGCCATCATYTCRCCGGA) para a amplificação de um fragmento de aproximadamente 360 pb correspondente à parte do gene *nifH* no operon *nifHKD* (POLY et al., 2001) e NodCF (AYGTHGTYGAYGACGGTTC) e NodCR(I) (CGYGACAGCCANTCKCTATTG) para a amplificação de um fragmento interno ao gene *nodC* com aproximadamente 980 pb (LAGUERRE et al., 2001).

As reações foram dimensionadas para um volume final de 10 µL e o *mix* para a reação no sistema duplex foi adaptado, de maneira que a concentração final do par de iniciadores PoIF/PoIR foi mantida e a dos iniciadores NodCF/NodCR(I) foi reduzida, em relação às utilizadas no sistema simples (com apenas um dos pares de iniciadores). O programa da PCR também foi adaptado para a amplificação no sistema duplex, e as alterações realizadas nas etapas de anelamento e extensão (Tabela 1).

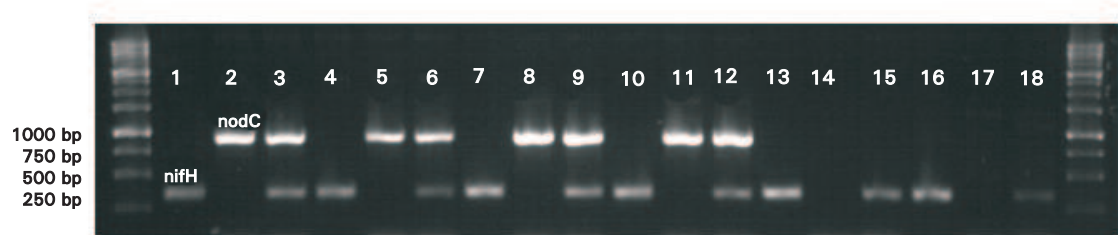
**Tabela 1.** Composição do *mix* de reação e programação da PCR para a amplificação de segmentos dos genes *nifH* e *nodC* nos sistemas uniplex e duplex.

Iniciadores	PoIF/PoIR	NodCF/NodCR(I)	PoIF/PoIR + NodCF/NodCR(I)
Composição do mix de reação			
Tampão de reação	1X	1X	1X
MgCl <sub>2</sub>	2,3 mM	2,7 mM	2,5 mM
dNTP	0,25 mM	0,8 mM	1,2 mM
Taq DNA polimerase	0,2 U	0,2 U	0,25 U
Iniciador (Forward/Reverse)	1,0 µM (cada)	0,75 µM (cada)	1,0 µM ( <i>nifH</i> ) + 0,6 µM ( <i>nodC</i> )
DNA	1 µL*	1 µL	1 µL
Programa da PCR			
Desnaturação inicial	94 °C por 5 min	94 °C por 5 min	94 °C por 5 min
Desnaturação	94 °C por 45 s	94 °C por 1 min	94 °C por 1 min
Anelamento	57 °C por 30 s	55 °C por 1 min	55 °C por 45 s
Extensão	72 °C por 30 s	72 °C por 1 min	72 °C por 1 min
Extensão final	72 °C por 1 min	72 °C por 1 min	72 °C por 1 min

\*Aproximadamente 20 ng.µL<sup>-1</sup>

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% (p/v) a 100 V por 120 minutos. O gel foi corado com brometo de etídeo (8 pM) adicionado ao gel após a fusão e resfriamento da agarose. A visualização do gel foi realizada em um transluminador sob luz UV.

Os resultados obtidos para o método demonstram que a amplificação foi bem sucedida tanto para os pares de iniciadores em separado como na reação em duplex (Figura 1).



**Figura 1.** Amplificação do gene *nifH* e/ou do gene *nodC* em estirpes de bactérias diazotróficas – 1 a 3=BR 322; 4 a 6=BR 3262; 7 a 9= BR 3267; 10 a 12= BR 4007; 13 a 15= BR 11001; 16 a 18=BR 11417. Canaletas 1; 4; 7; 10; 13 e 16= amplificação de um segmento do gene *nifH*. Canaletas 2; 5; 8; 11; 14; e 17= amplificação de um segmento do gene *nodC*. Canaletas 3; 6; 9; 12; 15 e 18= amplificação dos segmentos dos genes *nifH* e *nodC* simultaneamente, no sistema duplex. Nas laterais do gel= marcador de peso molecular 1kb DNA Leader (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).

Também foi possível observar que nas canaletas entre 13, 14, 17 e 18, onde foram aplicadas as reações feitas com o DNA molde das bactérias associativas BR 11001 e BR 11417, não houve amplificação do gene *nodC*, conforme esperado para bactérias não nodulantes. Nas reações realizadas no sistema duplex, canaletas 15 e 18, observou-se apenas a amplificação de *nifH*, demonstrando não haver interferência dos iniciadores NodCF e NodCR(II) na amplificação de *nifH*, mesmo nas reações em que não estão sendo consumidos e estão abundantes ao longo dos ciclos da PCR.

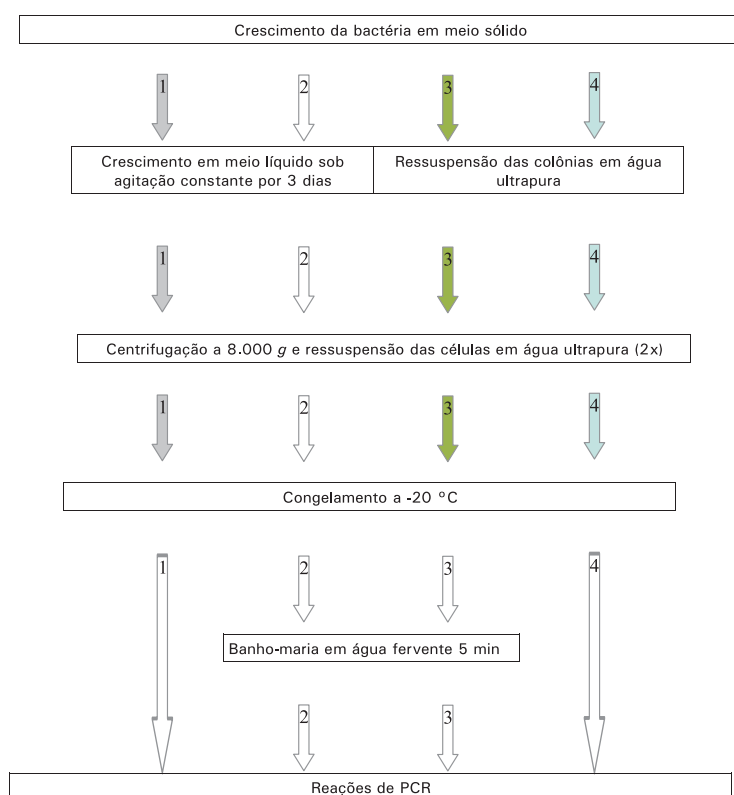
Na reação duplex, o *mix* adaptado apresentou adequação à amplificação dos dois genes. Vale ressaltar que cada par de iniciador tem características específicas por causa da sua sequência, grau de degeneração, sequência alvo, entre outras. Dessa forma, a adaptação deste método para a utilização de outros iniciadores poderá não apresentar os mesmos resultados com o *mix* de reação adaptado para esta reação em duplex, necessitando assim de alterações no *mix* de reação e possivelmente na programação da PCR.

Para a segunda avaliação, utilizando diferentes métodos alternativos para a extração do DNA

## Avaliação do método utilizando DNA obtido a partir de métodos alternativos de extração

bacteriano, foi utilizada apenas a estirpe BR 322. A bactéria foi crescida em meio YM, conforme descrito acima, e as reações de PCR foram feitas no sistema simples e duplex. Para essa avaliação, foram utilizadas cinco formas alternativas para a obtenção do DNA, com o objetivo de reduzir o custo e o tempo gasto para a realização da PCR. Os métodos

alternativos para a extração de DNA estão esquematizados na Figura 2 e se baseiam na centrifugação e realização ou não do choque térmico em caldos de cultivo.

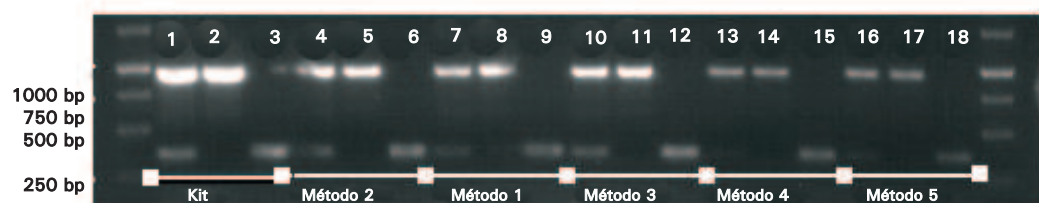


**Figura 2.** Esquematização dos métodos de extração de DNA utilizados com a estirpe BR 322 para a avaliação da eficiência do método de duplex PCR. Método 1) crescimento em meio líquido → centrifugação → congelamento; Método 2) crescimento em meio líquido → centrifugação → congelamento → fervura; Método 3) ressusensão das colônias de placa de Petri em água ultrapura → centrifugação → congelamento → fervura; Método 4) ressusensão das colônias de placa de Petri em água ultrapura → centrifugação → congelamento; Método 5) ressusensão de colônia em placa de Petri diretamente no mix de reação.



Essa avaliação foi realizada três vezes para assegurar o desempenho dos métodos. O preparo dos géis, as condições eletroforéticas e a visualização do gel foram realizadas conforme descrito anteriormente.

Avaliando-se os métodos alternativos de extração de DNA, foi possível observar que houve diferenças na eficiência da PCR na reação duplex (Figura 3). Comparado à reação realizada com o DNA extraído com o *kit* comercial, é possível observar maior nitidez para a amplificação simultânea dos dois *amplicons* alvos nos métodos de extração 1 e 3, nos quais houve o choque térmico das células obtidas do caldo de cultivo ou diretamente do meio da placa de Petri, respectivamente.



**Figura 3.** Avaliação do método de extração de DNA da estirpe BR 322 na eficácia da reação de PCR em duplex para a detecção dos genes *nifH* e *nodC*. Canaletas 1, 4, 7, 10, 13 e 16 = amplificação dos genes *nifH* e *nodC* no sistema duplex; Canaletas 2, 5, 8, 11, 14 e 17 = amplificação do gene *nodC* no sistema simples; Canaletas 3, 6, 9, 12, 15 e 18 = amplificação do gene *nifH* no sistema simples. Nas laterais do gel = marcador de peso molecular 1kb DNA Leader (Bioron, Ludwigshafen, Alemanha).

Para a reação realizada com o DNA extraído a partir da suspensão das células sem a aplicação do choque térmico, método 4 e da amplificação direta da colônia na placa de Petri sem qualquer tratamento, método 5, não foi possível observar o *amplicon* de 360 pb quando a amplificação foi realizada no sistema duplex. Isso poderia implicar na ocorrência de falsos negativos quando da utilização destes métodos de extração para bactérias isoladas de nódulos. Dessa forma, indica-se a utilização de um dos métodos (1 ou 3) em que há a aplicação do choque térmico para a obtenção do DNA bacteriano.

Apesar da eficiência do método de extração na reação de PCR, falhas na amplificação de um dos fragmentos podem ocorrer, uma vez que o isolamento de bactérias de nódulos de leguminosas tropicais pode revelar bactérias com perfis genéticos distintos daqueles observados pelos isolados de bactérias já bem estudadas e caracterizadas. Neste caso, é aconselhada a realização da reação de PCR

simples para o fragmento que não foi amplificado para assegurar a presença do fragmento no material genético do isolado bacteriano em avaliação.

No caso da ausência da amplificação de um fragmento correspondente ao gene *nodC*, se o sucesso na amplificação não for alcançado mesmo após a realização da reação simples, a bactéria em avaliação pode ser um dos rizóbios que não apresentam genes *nod*, como descrito por Giraud et al. (2007). Neste caso, a decisão de dar continuidade ou não as avaliações com as bactérias que apresentem essas características deve ficar a critério do pesquisador. No Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Semiárido, a equipe entende que a ocorrência destas bactérias na região semiárida é possível e bactérias nas quais

apenas o gene *nifH* é amplificado (mesmo após a tentativa da amplificação do gene *nodC* por PCR em sistema simples) foram selecionadas para as avaliações posteriores.

## Considerações finais

Apesar de haver poucos relatos de aplicação dos métodos de PCR em multiplex à microbiologia do solo ou ambiental, a adaptação deste método para a detecção simultânea de fragmentos dos genes *nodC* e *nifH* em bactérias isoladas de nódulos de leguminosas pode ser importante para a redução do tempo e do volume de trabalho nos ensaios de autenticação dos isolados obtidos na estruturação de coleções de culturas.

Além disso, foi demonstrado que para a realização deste método, não é necessária a aplicação de *kits* de extração de DNA ou de procedimentos mais laboriosos que geram maior quantidade de resíduo (como o método fenol:clorofórmio:álcool isoamílico). A extração simples, submetendo as células ao choque térmico, gera resultados com boa resolução na reação em duplex, permitindo a detecção da presença dos *amplicons* dos genes *nodC* e *nifH*.

Esta metodologia está sendo utilizada no Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Semiárido para a autenticação de coleções de bactérias isoladas de amendoim, feijão-caupi, guandu, dentre outras leguminosas e pode ser adaptada para uso em outros laboratórios do País. Também está sendo realizada a adequação desse método para a utilização de outros iniciadores (como aqueles para os  $\beta$ -rizóbios, por exemplo).

## Referências

- CORDEIRO, F.; PEREIRA, D. S. G.; ROCHA, M.; ASENSI, M. D.; ELIAS, W. P.; CAMPOS, L. C. Evaluation of a Multiplex PCR for identification of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, D.C., v. 46, p. 828-829, 2008.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI; Itaguaí: EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60 p.
- FERNANDES JÚNIOR, P. I.; REIS, V. M. **Algumas limitações à fixação biológica de nitrogênio em leguminosas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. 33 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 252).
- GARCÍA DE LOS SANTOS, A.; BROM, S.; ROMERO, D. *Rhizobium* plasmids in bacteria-legume interactions. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Heidelberg, 12, n. 2, p. 119-125, 1996.
- GIRAUD, E.; MOULIN, L.; VALLENET, D.; BARBE, V.; CYTRYN, E.; AVARRE, J. C.; JAUBERT, M.; SIMON, D.; CARTIEAUX, F.; PRIN, Y.; BENA, G.; HANNIBAL, L.; FARDOUX, J.; KOJADINOVIC, M.; VUILLET, L.; LAJUS, A.; CRUVEILLER, S.; ROUY, Z.; MANGENOT, S.; SEGURENS, B.; DOSSAT, C.; FRANCK, W. L.; CHANG, W. S.; SAUNDERS, E.; BRUCE, D.; RICHARDSON, P.; NORMAND, P.; DREYFUS, B.; PIGNOL, D.; STACEY, G.; EMERICH, D.; VERMÉGLIO, A.; MÉDIGUE, C.; SADOWSKY, M. Legumes symbioses: absence of nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. **Science**, Washington, D.C., v. 316, n. 2.829, p. 1.307-1.312, 2007.
- LAGUERRE, G.; NOUR, S. M.; MACHERET, V.; SANJUAN, J.; DROUIN, P.; AMARGER, N. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. **Microbiology**, [London], v. 147, n. 4, p. 981-993, 2001.
- LIMA, A. A.; FERNANDES JÚNIOR, P. I.; PASSOS, S. R.; PAULO, F. S.; NOSOLINE, S. M.; FARIA, S. M.; GUERRA J. G. M.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Diversidade e capacidade simbiótica de rizóbios isolados de nódulos de mucuna-cinza e mucuna-anã. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 36, n. 2, p. 337-348, 2012.
- MOTHAPO, N.; GROSSMAN, J. M.; MAUL, J. Genetic diversity of resident soil rhizobia isolated from nodules of distinct hairy vetch genotypes, **Applied Soil Ecology**, [Amsterdam], v. 64, p. 201-213, 2013.
- MURESU, R.; POLONE, E.; SULAS, L.; BALDAN, B.; TONDELLO, A.; DELOGU, G.; CAPPUCINELLI, P.; ALBERGHINI, S.; BENHIZIA, Y.; BENHIZIA, H.; BENGUEDOUAR, A.; MORI, B.; CALAMASSI, R.; DAZZO, F. B.; SQUARTINI, A. Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. **FEMS Microbiology Ecology**, Hoboken, v. 63, n. 3, p. 383-400, 2008.
- POLY, F.; MONROZIER, L.J.; BALLY, R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. **Research in Microbiology**, [Amsterdam], v. 152, n. 3, p. 95-103, 2001.
- RESTREPO, J. A. A.; GAVIRIA, P. A. R.; MONTOYA, M. M. Detección molecular de *Ralstonia solanacearum* en agroecosistemas bananeros de Colombia. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, DF, v. 33, n. 3, p. 197-203, 2008.
- SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H.J. **Handbook of rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology**. New York: Springer-Verlag, 1994. 450 p.
- VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. 164 p. (IBP Handbook, 15).

### Comunicado Técnico, 158

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na: **Embrapa Semiárido**  
**Endereço:** BR 428, km 152, Zona Rural, Cx. Postal 23, 56302-970 Petrolina, PE  
**Fone:** (87) 3866-3600  
**Fax:** (87) 3866-3815  
**E-mail:** cpatsa.sac@embrapa.br

1ª edição (2013): Formato digital

Ministério da Agricultura,  
Pecuária e Abastecimento



### Comitê de publicações

**Presidente:** Maria Auxiliadora Coêlho de Lima.  
**Secretário-Executivo:** Sidinei Anuniação Silva.  
**Membros:** Ana Valéria Vieira de Souza, Aline Camarão Telles Biasoto, Ana Cecília Poloni Rybka, Anderson Ramos de Oliveira, Fernanda Muniz Bez Birolo, Flávio de França Souza, Gislene Feitosa Brito Gama, José Mauro da Cunha e Castro, Juliana Martins Ribeiro, Welson Lima Simões.

### Expediente

**Supervisão editorial:** Sidinei Anuniação Silva.  
**Revisão de texto:** Sidinei Anuniação Silva.  
**Tratamento das ilustrações:** Nivaldo Torres dos Santos.  
**Editoração eletrônica:** Nivaldo Torres dos Santos.