DIVERSIDADE E EFICIÊNCIA DE BACTÉRIAS QUE NODULAM FEIJOEIRO DE DIFERENTES SISTEMAS DE USO DA TERRA NA AMAZÔNIA OCIDENTAL

ALEXANDRE BARBERI

2007

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

ALEXANDRE BARBERI

DIVERSIDADE E EFICIÊNCIA DE BACTÉRIAS QUE NODULAM FEIJOEIRO DE DIFERENTES SISTEMAS DE USO DA TERRA NA AMAZÔNIA OCIDENTAL

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Solos e Nutrição de Plantas, para a obtenção do título de "Doutor".

Orientadora

Profa. Dra. Fátima Maria de Souza Moreira

LAVRAS

MINAS GERAIS – BRASIL

2007

Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da

Biblioteca Central da UFLA

Barberi, Alexandre
Diversidade e eficiência de bactérias que nodulam feijoeiro de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental / Alexandre Barberi. -- Lavras : UFLA, 2007.
121 p. : il.

Orientadora: Fátima Maria de Souza Moreira.
Dissertação (Mestrado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Feijão. 2. Nodulação. 3. Uso da terra. 4. Sistema de cultivo. 5. Inoculação. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-635.652

ALEXANDRE BARBERI

DIVERSIDADE E EFICIÊNCIA DE BACTÉRIAS QUE NODULAM FEIJOEIRO DE DIFERENTES SISTEMAS DE USO DA TERRA NA AMAZÔNIA OCIDENTAL

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agronomia, área de concentração em Solos e Nutrição de Plantas, para a obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 7 de março de 2007.

Prof. Dr. Daniel Furtado Ferreira UFLA

Prof. Dr. Mário Andrade Lira Júnior UFRPE

Prof. Dr. Messias José Bastos de Andrade UFLA

Pesq. Dra. Siu Mui Tsai CENA

Profa. Dra. Fátima Maria de Souza Moreira
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

Ao meus queridos pai e mãe, **Renato Barberi Filho e Amália Aparecida Donega**, por todo o apoio, ensinamentos, conselhos, esperanças, incentivos, compreensão e fé a mim dedicados

Ofereço

A **Deus**,

Por iluminar meus caminhos, abençoando minha vida.

A minha esposa, **Ludmila Massimo Leite Barberi,** minha grande incentivadora, companheira, por todo amor, respeito, compreensão e carinho

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas, pela oportunidade de realização do doutorado.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Fátima Maria de Souza Moreira, por tudo que fez por mim em todos estes anos.

Ao projeto TSBF-CIAT/GEF-UNEP, "*Conservation and Sustainable Management of Below Ground Biodiversity*", pelo financiamento para a execução deste trabalho,

A todos os professores do Departamento de Ciência do Solo, em especial aos professores José Oswaldo Siqueira, Luiz Roberto Guimarães Guilherme, Moacir de Souza Dias Junior, Mozart Martins Ferreira, Nilton Curi, Antônio Eduardo Furtini Neto, Vicente Gualberto e Janice Guedes Carvalho, por seus ensinamentos, amizade, auxílios, apoio e disponibilidade para discussões e esclarecimentos de dúvidas.

A todos os funcionários Departamento de Ciência do Solo, pelo auxílio, apoio, disponibilidade e ajudas prestadas.

Aos funcionários Marlene Aparecida de Souza e Manuel Aparecido da Silva, pela valiosa contribuição na execução das análises.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Daniel Furtado, Mário Andrade Lira Júnior, Messias José Bastos de Andrade e Siu Mui Tsai, pela disponibilidade, participação, colaboração e sugestões apresentadas.

Aos preciosos amigos Adriana, Juliano, Márcio, Fabio Aurélio Felipe e José Geraldo, pela incondicional presença e apoio.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia do Solo que, de alguma forma, sempre tiveram dispostos a discutir dúvidas e pontos de vista, além das

grandes ajudas e auxílios nos momentos mais difíceis: Rafaela, Alice, Amanda, André, Cláudio, Éderson, Gláucia, João Paulo, Krisle, Ligiane, Manoel, Márcia, Meire, Michele Aparecida, Michele Rocha, Paulo, Pedro, Plínio e Silvana.

A todos os amigos do Departamento de Ciência do Solo e de Biologia, incluindo alunos de graduação e pós-graduação, professores e funcionários, pela agradável convivência durante todos estes anos.

A todos os amigos adquiridos em Lavras.

Aos meus sogros, Maria Josina Massimo Pereira Leite e Ivan Pereira Leite, e meus sobrinhos, Caroline e Luan, pelo apoio e convívio.

A todos, Muito Obrigado!!!

SUMÁRIO

Página
RESUMO GERAL..... i
GENERAL ABSTRACT..... ii
CAPÍTULO 1 1
1.1 INTRODUÇÃO GERAL.....2
1.2 REFERENCIAL TEÓRICO 3
1.2.1 Características do Bioma Amazônia.....3
1.2.2 Diversidade de Organismos do Solo.....4
1.2.3 Diversidade de Bactérias que Nodulam Leguminosas (BNL). 7
1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 18
CAPÍTULO 2 28
OCORRÊNCIA E EFICIÊNCIA DE POPULAÇÕES DE BACTÉRIAS QUE NODULAM FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.) EM SOLOS SOB DIFERENTES SISTEMAS DE USO DA TERRA NA AMAZÔNIA OCIDENTAL 28
RESUMO 29
ABSTRACT 30
2.1 INTRODUÇÃO 31
2.2 MATERIAL E MÉTODOS 32
2.2.1 Análise dos Dados 39
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 40
2.3.1 Comparação dos SUT de coleta nas diversas variáveis avaliados para amostras coletadas na Amazônia Ocidental. 40
2.3.2 Porcentagem de Vasos de Leonard nodulados para cada SUT 41
2.3.3 Análise Multivariada dos Dados 43
2.3.4 Correlação canônica entre atributos edáficos e variáveis relacionadas ao crescimento e nodulação das plantas. 49
2.4 CONCLUSÕES 53
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 54
CAPÍTULO 3 60
DIVERSIDADE FENOTÍPICA DE BACTÉRIAS QUE NODULAM FEIJÃO (Phaseolus vulgaris L.) EM SOLOS SUBMETIDOS A DIFERENTES SISTEMAS DE USO DA TERRA NA AMAZÔNIA OCIDENTAL. 60
RESUMO 61
ABSTRACT 62
3.1 INTRODUÇÃO 63
3.2 MATERIAL E MÉTODOS 66
3.2.1 Amostragem do solo, captura e isolamento de bactérias que nodulam leguminosas através de planta isca. 66
3.2.2. Análise dos dados 69

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 71
3.3.1 Isolamento e caracterização cultural de Bactérias que Nodulam Leguminosas..... 71
3.3.2 Agrupamento e diversidade dos isolados de BNL..... 74
3.4 CONCLUSÕES 81
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 82
CAPÍTULO 4 87
EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE BACTÉRIAS QUE NODULAM O FEIJOEIRO EM SOLOS SOB DIFERENTES SISTEMAS DE USO DA TERRA NA AMAZÔNIA OCIDENTAL..... 87
RESUMO 88
ABSTRACT 89
4.1 INTRODUÇÃO 90
4.2 MATERIAL E MÉTODOS 92
4.2.1 Amostragem, captura através de planta isca e isolamento de Bactérias que Nodulam Leguminosas (BNL) 92
4.2.2 Autenticação e eficiência de isolados de BNL por meio da inoculação no hospedeiro de origem 93
4.2.3 Análise dos Dados 95
4.2.4. Amplificação e seqüenciamento do gene 16S do RNA ribossomal..... 95
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 97
4.3.1 Autenticação e eficiência simbiótica de isolados de BNL por meio da inoculação no hospedeiro de origem..... 97
4.3.1.1 Primeiro experimento. 97
4.3.1.2 Segundo experimento. 102
4.3.2. Amplificação e seqüenciamento do gene 16S do DNA ribossomal. 108
4.4 CONCLUSÕES 112
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 113
ANEXOS..... 119

RESUMO GERAL

BARBERI, Alexandre. **Diversidade e eficiência de bactérias que nodulam feijoeiro de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental.** 2007. 121 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG[1].

Entre as espécies de leguminosas, o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é, reconhecidamente, a de maior importância social, já que, em muitos lares, é o alimento que representa a maior fonte de proteína. O presente estudo teve como objetivo analisar a diversidade e a eficiência de um grupo funcional chave de organismo do solo, as bactérias que nodulam leguminosas (BNL), em diferentes sistemas de uso da terra (SUT), na região Amazônia Ocidental, usando como planta isca o feijoeiro. Coletaram-se amostras de solo de 98 pontos, na camada de 0-20 cm, utilizando-se trado de rosca, utilizados como repetições para os diversos SUTs, distribuídos da seguinte forma: 30 pontos amostrados no SUT capoeira nova (CN), 10 na capoeira velha (CV), 17 na floresta primária (FP), 13 em pastagem (P), 18 na agricultura (AG) e 10 em agrofloresta (AF). O feijoeiro capturou BNL em 58% das unidades amostrais (UA), tendo as menores % de UA noduladas sido encontradas nos SUTs FP, CN e AG e as maiores nos SUTs AF, P e CV. As populações nativas de BNL, inoculadas com suspensões de solo, apresentaram se ineficientes em estimular o crescimento das plantas. As populações de BNL do SUT P foi a que possibilitou maior acúmulo de nitrogênio em associação com o feijoeiro. O único SUT que se diferenciou dos demais em relação às variáveis biológicas estudadas foi a P, provavelmente, devido à diferença entre atributos edáficos do mesmo. No total, encontraram-se 930 isolados, que foram agrupados em 40 grupos culturais diferenciados por suas características fenotípicas. Houve diferença entre os SUTs quanto à distribuição dos grupos fenotípicos dos isolados capturados. Ocorreu predominância de isolados de crescimento rápido e que acidificam o meio em todos os SUTs. O SUT AF foi o que apresentou maior número de grupos culturais. A maior diversidade, indicada pelo índice de Shannon e o maior índice de riqueza de Chao2 foi encontrada no SUT CN e a menor diversidade foi encontrada na FP. No total, foram autenticados 260 isolados, sendo que, 80% apresentaram nodulação. Ocorreu diferença entre a eficiência relativa dos isolados, independentemente dos SUTs. As eficiências relativas dos isolados autenticados quando agrupados pelos SUTs de origem foram iguais entre si e superiores à testemunha absoluta, sendo portanto consideradas eficientes nestas condições de pureza. Ocorreu predominância de isolados com alta similaridade genética (seqüências de 16S rDNA) com espécies dos gêneros *Burkholderia, Pseudomonas* e *Paenibacillus*

[1]Orientadora: Fátima Maria de Souza Moreira – UFLA.

GENERAL ABSTRACT

BARBERI, Alexandre. **Diversity and Efficiency of Bacteria Nodulating Common Beans from Different Land Use Systems in the Western Amazon region.** 2007. 121 p. Thesis (Doctorate in Soils e Plants Nutrition) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.[1]

Among the legume species, the common bean (*Phaseolus vulgaris L.*) is the one of greatest social importance, since in many homes, it is the major protein source. The present study aimed to analyze the diversity and efficiency of a key functional group of soil organism, the Leguminosae nodulating bacteria (BNL), in different land use systems (LUS), in the western Amazon region by using as trap species the common bean. Soil samples were collected at 0-20 cm depth in 98 points distributed in the diverse LUSs, as following:: 30 in the young secondary forest LUS (CN), 10 in the old secondary forest (CV), 17 in the pristine forest (FP), 13 in pasture (p), 18 in agriculture (AG) and 10 in agroforestry (AF). The common bean captured BNL in 58% of the units samples, being occurrence of BNL less frequent in the LUSs FP, CN and AG and more frequent in LUSs AF, P and CV. The native populations of BNL, inoculated by means of soil suspensions were considered inefficient. The BNL population of LUS P was the one with highest shoot N content. The only LUS differentiated from the others was the P, probably due to difference among soil attributes. In the total 930 isolates were gotten and they were grouped in 40 phenotypic clusters. LUSs were different regarding the distribution of the phenotypic groups of the trapped isolates. Predominance of fast growing isolates that acidify culture medium occurred in all the LUSs. The highest number of phenotypic clusters occurred in agroforestry. The biggest diversity, indicated by Shannon and the Chao2 indexes were found in the LUS CN and FP presented the lowest diversity. Isolates presented Eighty percent of 260 isolates were authenticated, i.e., they induced nodulation in the original host-siratro. Difference in the relative efficiency occurred among the isolates, with no relationship with the LUSs. The relative efficiencies of the authenticated isolates when grouped by LUSs of origin were similar and superior to the control without inoculation, therefore being considered efficient. 16 S rDNA sequences were predominatly similar to species of genera *Burkholderia, Pseudomonas and Paenibacillus*

[1]Adviser:: Fátima Maria de Souza Moreira – UFLA

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

Os organismos edáficos contribuem em inúmeros serviços essenciais às funções de sustentabilidade de todos os ecossistemas: dirigindo os ciclos dos nutrientes, regulando a dinâmica da matéria orgânica do solo, o seqüestro de carbono e a emissão de gases que contribuem com o efeito estufa; modificando a estrutura física do solo e o regime de água; influenciando a saúde das plantas devido às interações com patógenos e pragas, bem como com seus predadores e parasitas naturais e, por fim, aumentando a quantidade e a eficiência da aquisição de nutrientes pela vegetação por meio das associações micorrízicas e bactérias fixadoras de nitrogênio. Estes serviços não são somente essenciais ao funcionamento dos ecossistemas naturais, mas constituem um recurso importante para a gerência da sustentabilidade dos ecossistemas agrícolas.

Atualmente, estão sendo encontrados indícios de ser possível conservar níveis significativos da biodiversidade em ambientes agrícolas (Swift et al., 1996; van Noordwijk et al., 1997). A diversidade biológica total de alguns sistemas mistos pode ser muito elevada (Swift et al., 1996). Teoricamente, o cultivo de diversas espécies vegetais no mesmo ambiente pode levar a um aumento da diversidade da biota, estimulando o aumento da diversidade dos microrganismos. Assim, o estudo da diversidade de bactérias formadoras de nódulos em sistemas diferentes de cultivo, em comparação com as áreas naturais pouco impactadas, pode contribuir para a elucidação de diversas questões.

Este trabalho está inserido num projeto mais amplo de cooperação internacional intitulado "Conservation and Sustainable Management of Below-Ground Biodiversity", implementado pelo "United Nations Environment Programmer (UNEP)" e executado em sete países: Brasil, Costa do Marfim, Índia, Indonésia, Quênia, México e Uganda. No Brasil, a coordenação é de

responsabilidade da Universidade Federal de Lavras. O objetivo principal deste projeto internacional é promover o conhecimento e a compreensão da biodiversidade do solo, importante para a produção agrícola sustentável em áreas tropicais, por meio da demonstração de métodos para a conservação e o manejo sustentável.

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo analisar a diversidade e a eficiência de populações de um grupo funcional chave de organismo do solo, bactérias que nodulam feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), em diferentes sistemas de uso da terra na região amazônica. Além disso, os isolados obtidos constituirão fonte de recursos genéticos para estudos posteriores, como, por exemplo, trabalhos de seleção de estirpes para uso como inoculantes para esta cultura.

1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

1.2.1 Características do bioma Amazônia

Maior reserva de diversidade biológica do mundo, a Amazônia é também o maior bioma brasileiro em extensão e ocupa quase metade do território nacional (49,29%). A bacia amazônica ocupa 2/5 do território da América do Sul e 5% da superfície terrestre. Sua área, de aproximadamente 6,5 milhões de quilômetros quadrados, abriga a maior rede hidrográfica do planeta, que escoa cerca de 1/5 do volume de água doce do mundo. Sessenta por cento da bacia amazônica se encontra em território brasileiro, onde o bioma Amazônia ocupa a totalidade de cinco unidades da federação (Acre, Amapá, Amazonas, Pará e Roraima), grande parte de Rondônia (98,8%), mais da metade de Mato Grosso (54%), além de parte de Maranhão (34%) e Tocantins (9%) (IBGE, 2007).

O bioma Amazônia é constituído de uma enorme diversidade de plantas e animais, possuindo um terço das reservas florestais tropicais contínuas do planeta. Trata-se de uma região com diversas unidades pedogenéticas, com solos eutróficos e distróficos, em sua grande maioria, com distintos tipos climáticos, enorme ocorrência de recursos hídricos e formidável luminosidade natural. A manutenção da biodiversidade é importante para a região e para o planeta.

Levando em consideração as suas características intrínsecas, na Amazônia pratica-se uma agricultura geralmente itinerante, pecuária extensiva e extrativismo com o aproveitamento das riquezas das suas florestas, tendo em vista o agronegócio e a sobrevivência das cerca de 20 milhões de pessoas que habitam a Amazônia Legal. Atualmente, algo em torno de 58,3 milhões de hectares estão alterados, necessitando de soluções alternativas de utilização sustentável, considerando códigos e leis de cunho ambiental e florestal, tendo em vista a necessidade de conciliar o desenvolvimento econômico e social com a preservação do meio ambiente. Estima-se que, na Amazônia, o estado do Amapá possua cerca de 1,5% da sua área já desmatada; o Amazonas, 2%; Acre, 10%; Pará e Mato Grosso, 15%; Rondônia, 22% e Maranhão, 40%. Além da necessidade de adoção de políticas públicas, está aberta uma grande oportunidade para a pesquisa agropecuária mitigar o processo desordenado de desmatamento e queimadas na região, por meio da geração e difusão de tecnologias alternativas apropriadas, especialmente para a agricultura familiar (Valois, 2003).

1.2.2 Diversidade de organismos do solo

Os microrganismos foram os primeiros seres vivos a colonizar a Terra. Estima-se que os primeiros apareceram há mais de 3,5 milhões de anos (Atlas &

Bartha, 1998). Graças a esta colonização, a atmosfera foi alterada, se transformando na que conhecemos hoje.

A existência e a diversidade de seres vivos no planeta estão intimamente ligadas à diversidade e à atividade metabólica de microrganismos na natureza (Lovelock, 1988; Stolz et al., 1989; Trüper, 1992). O papel destes microrganismos na manutenção dos processos biológicos ainda é pouco conhecido. Sabe-se, contudo, que eles participam de processos ecológicos bastante importantes, tais como fotossíntese oxigênica, ciclagem de matéria orgânica, ciclos biogeoquímicos e manutenção da fertilidade e estrutura de solos (Hawksworth, 1991a,b; Stolz et al., 1989; Trüper, 1992).

O bioma Amazônia é considerado uma reserva da biodiversidade mundial, devido grande número de espécies vegetais e animais lá encontrados, diversidade que também pode ser encontrada sob a superfície.

As comunidades de organismos do solo, incluindo as bactérias, os fungos, os protozoários e os animais invertebrados, são extremamente diversas. A diversidade microbiana pode ser maior do que aquelas dos invertebrados e, por isso, justificam-se os estudos filogenéticos e ecológicos usando-se métodos moleculares (Torsvik et al., 1996). O número de espécies de bactérias dos solos descritas na literatura vem crescendo nos últimos anos, em virtude do desenvolvimento de ferramentas de biologia molecular, que possibilitam a análise de seqüências de DNA a partir de material genômico extraído diretamente do solo. As novas técnicas evidenciaram a enorme diversidade genética de bactérias presentes em apenas 1 grama de solo.

Estima-se que em 1 g de solo ocorram entre 20 e 40 mil espécies bacterianas. Atualmente, estão descritas, no *National Center for Biotechnology Information*, 11.990 espécies de bactérias (NCBI, 2007). A diversidade biológica da comunidade dos organismos subsuperficiais, principalmente

microrganismos, geralmente é ignorada nos exames de biodiversidade de ecossistemas, podendo provocar resultados errôneos.

Alguns fatores têm contribuído para a falta de conhecimento sobre a diversidade microbiana em amostras ambientais. Eles são, em grande parte, relacionados às limitações dos métodos tradicionalmente utilizados para o isolamento e o cultivo de microrganismos em laboratório (Palleroni, 1996). Dados derivados de estudos comparativos apontam para o fato de que apenas uma pequena fração dos microrganismos na natureza, entre 0,1% a 1%, dependendo do local onde habitam, seja cultivado pelo emprego de métodos microbiológicos convencionais (Amann et al., 1995).

Acredita-se que quando os ambientes são impactados, as mudanças na biodiversidade da subsuperfície seriam iguais àquelas ocorridas com as plantas, embora haja evidências de que a comunidade do solo pode ser mais resistente, funcionalmente, do que a da biota superficial (Giller et al., 1997). Quando ocorre a conversão de um ambiente para uma agricultura intensiva, a biodiversidade da superfície está sendo reduzida, com a intenção de aumentar a eficiência econômica do sistema (até ao extremo das monoculturas). Isso impacta a biodiversidade dos ecossistemas, assim diminuindo a capacidade biológica de auto-regulação dos mesmos, conduzindo à necessidade da substituição de funções biológicas por processos artificiais, com o uso de agroquímicos e de energia de fontes não renováveis. Efeitos equivalentes foram observados em pastagens intensivas (Lavelle et al., 1997). A sustentabilidade destes sistemas dependerá mais de fatores externos do que dos recursos biológicos internos.

Freqüentemente são feitas suposições quanto às conseqüências que a redução na diversidade da comunidade do solo, incluindo casos da extinção de espécies, poderia causar. A ocorrência de uma perda catastrófica nas funções do ecossistema, reduzindo a habilidade do mesmo em resistir aos “stress”, poderia conduzir a efeitos ambientais indesejáveis. Os cientistas começaram a

quantificar as relações e causas entre (i) a composição, a diversidade e abundância de organismos do solo; (ii) a fertilidade de solo sustentada e a produção de colheita associada e (iii) os efeitos ambientais, incluindo a erosão do solo, as emissões de gases relacionados ao efeito estufa e ao seqüestro de carbono pelo solo (Giller et al., 1997; Lavelle et al., 1997; Swift et al., 1996). Conseqüentemente, as ações que enfocam diretamente a conservação da diversidade biológica, tanto abaixo quanto acima da superfície, trarão benefícios ambientais para o ecossistema e a paisagem, e em escalas globais.

O conceito de qualidade do solo surgiu no final da década de 1970 e, durante os 10 anos seguintes, esteve muito associado ao conceito de fertilidade (Karlen et al., 2003). Acreditava-se, por exemplo, que um solo quimicamente rico era um solo com alta qualidade, isto porque tinha a capacidade de prover a produção agrícola. Entretanto, a percepção de qualidade do solo evoluiu, principalmente nos últimos 10 anos, e, num entendimento mais amplo, percebe-se que não basta apenas que o solo apresente alta fertilidade, mas também que possua boa estruturação e abrigue alta diversidade de organismos (Zilli et al., 2003).

1.2.3 Diversidade de bactérias que nodulam leguminosas (BNL)

Organismos fixadores de nitrogênio, ou diazotróficos, podem ser encontrados entre os aeróbios, anaeróbios e anaeróbios facultativos e na maioria dos grupos filogenéticos representativos de bactéria e de Archaea. Apesar de representarem parcela relativamente pequena dos procariotos, esses organismos apresentam alta diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética. Entre as proteobactérias encontram-se, por exemplo, *Rhizobium, Sinorhizobium, Azorhizobium, Azospirillum* spp., *Beijerinckia* spp., *Acetobacter diazotrophicus, Derxia* e *Azotobacter*. Entre as Archaea, fixadores estão presentes entre halófilos e metanogênicos. Também se encontram fixadores de N_2 entre os

metilotróficos, celulolíticos e bactérias envolvidas no ciclo do enxofre, e até entre denitrificadores, que mediam justamente o processo inverso. A alta diversidade destes organismos garante não só a resiliência do importante processo que mediam em um determinado ecossistema, como também a sua ocorrência nos mais diferentes tipos de hábitats terrestres (Moreira & Siqueira, 2002).

Várias espécies novas de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium, Mesorhizobium, Azorhizobium* e *Sinorhizobium*, vêm sendo descritas nos últimos anos, além da descoberta de outros gêneros de bactérias que anteriormente não eram citados como BNL (ex: *Methylobacterium*, por Sy et al., 2001; *Burkholderia*, por Moulin et al., 2001; *Ralstonia*, por Chen et al., 2001; *Blastobacter*, por van Berkun & Eardly, 2002; *Devosia*, por Rivas et al., 2002 e *Ochrobactrum*, por Trujillo et al., 2005). Isso reflete o número crescente de grupos de pesquisa envolvidos em estudos da diversidade de BNL e também o avanço tecnológico que permite a detecção de características discriminantes entre as espécies e, mais importante, a grande diversidade destes microrganismos. Considerando-se os sistemas de agricultura sustentável como pré-requisito para a melhoria de qualidade de vida a curto, médio e longo prazos nos países tropicais, e a importância da fixação biológica de nitrogênio para a sustentabilidade dos agroecossistemas, percebe-se a grande relevância e o potencial benefício do entendimento e da exploração racional da diversidade de BNL.

Lima et al. (2005) verificaram elevada diversidade entre 46 estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia (monocultura, capoeira, pastagem, floresta e sistema agroflorestal). Por meio do perfil protéico total SDS-PAGE, fomaram-se 11 grupos, com 80% de similaridade. Estes autores observaram que diversos isolados diferiram das

espécies *B. elkanii*, *B. japonicum* e *B. liaoningense*, atualmente descritas e que podem representar espécies ainda não conhecidas.

Jesus et al. (2005) avaliaram o efeito dos sistemas de uso da terra (cultivo de mandioca, pupunheira e floresta de terra firme) da Amazônia Ocidental, sobre a diversidade fenotípica cultural de 257 bactérias que nodulam siratro (*Macroptilium atropurpureum*). Verificaram que o sistema de uso da terra influenciou na composição das bactérias que nodulam siratro e que áreas nas quais foi cultivada mandioca revelaram maior diversidade e riqueza de bactérias.

A diversidade de BNL é ainda limitada devido à falta de conhecimentos sobre os microssimbiontes da grande maioria das espécies leguminosas. A capacidade das espécies leguminosas de formar relações simbióticas efetivas com BNL é desconhecida em cerca de 77% das espécies (11.200 espécies) desta família e, conseqüentemente, as características das espécies de BNL também são pouco conhecidas (Moreira et al., 2000). Entretanto, nas últimas décadas, têm sido extremamente importantes os estudos que revelaram grande diversidade de BNL até então desconhecida em coleções de cultura (Dupuy et al., 1994; Moreira et al., 1993).

Nos últimos anos, técnicas baseadas na análise de genes do 16S rDNA têm sido amplamente usadas na detecção, identificação, classificação e filogenia de bactérias, assim como de outros organismos vivos. A amplificação direta por PCR do 16S rRNA de amostras ambientais tem possibilitado o estudo da diversidade microbiana sem o cultivo dos organismos (Rappé & Giovannoni, 2003). Woese (1987) iniciou o uso de genes ribossomais como "relógios moleculares" ou "cronômetros", revolucionando a taxonomia bacteriana, de modo a baseá-la em características filogenéticas. Um relógio molecular ideal seria aquele que acumula trocas aleatórias de nucleotídeos a uma taxa constante, sendo o número de alterações usado para medir o tempo entre o ancestral

comum mais recente e organismos ou genes. Os genes ribossomais se tornaram bastante populares pelo fato de ocorrerem em todos os organismos e por possuírem a mesma função em todos eles; além disso, têm alto grau de conservação e grande número de cópias. O desenvolvimento da rápida técnica de amplificação do DNA (PCR- reação de polimerização em cadeia) e as técnicas de seqüenciamento têm consolidado o papel dos genes ribossomais na filogenia e, atualmente, milhares de seqüências do 16S rDNA estão disponíveis em bancos de dados. O 16S rDNA se tomou mais usado pelo seu menor tamanho (aproximadamente 1.500 nucleotídeos) (Woese, 1987).

Várias técnicas baseadas na amplificação de partes do DNA, aleatória ou específica, foram desenvolvidas com a descoberta do PCR e permitem uma melhor discriminação de isolados de BNL em diferentes ambientes. Como estas técnicas demandam equipamentos sofisticados e recursos financeiros elevados, são, geralmente, aplicadas a representantes obtidos de agrupamentos iniciais por características fenotípicas (Pereira, 2000).

De modo geral, os estudos relacionados à diversidade de BNL utilizam métodos fenotípicos, genéticos e simbióticos.

1.2.4 Fixação biológica de nitrogênio no feijoeiro

Um dos fatores mais limitantes à produtividade do feijoeiro é a baixa disponibilidade de nutrientes, sobretudo fósforo e nitrogênio, nos solos agrícolas. O N é o nutriente absorvido em quantidades mais elevadas pelo feijoeiro e, conseqüentemente, a sua deficiência é mais freqüente (Oliveira et.al., 1996). A adição de nitrogênio na forma de fertilizantes é cara e, em muitos casos, ineficiente, principalmente devido às perdas do elemento causadas por práticas culturais inadequadas (Araújo, 1994).

Como muitas espécies leguminosas, o feijoeiro também é capaz de estabelecer simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico,

podendo, assim, garantir parte de suas exigências em nitrogênio por meio do processo de fixação biológica.

Existe um descrédito crônico na capacidade do feijoeiro em fixar nitrogênio atmosférico suficiente para expressar seu potencial produtivo quando em associação com BNL, recomendando-se, indistintamente, o uso de fertilizantes para a cultura. Entretanto, resultados de pesquisa apontam que é possível que a cultura do feijoeiro se beneficie, no campo, da fixação biológica de nitrogênio (Araújo, 1994) e o grande desafio que se apresenta é conseguir um manejo adequado dessa simbiose, visando aumentar a sua eficiência (Cassini & Franco, 1998).

Pode-se dividir as causas da baixa eficiência da fixação biológica do nitrogênio defendida por muitos entre dois elementos, os bióticos e os abióticos.

Dentro dos elementos abióticos, pode-se verificar que o cultivo do feijoeiro no Brasil é freqüentemente realizado em terras ácidas e de baixa fertilidade, condições que agem negativamente sobre a mineralização da matéria orgânica e a produtividade (Diaz-Romeu et al., 1970; Malavolta, 1972). Sabe-se que a toxicidade por alumínio e manganês e as deficiências de cálcio, fósforo e micronutrientes são prejudiciais à simbiose (Lovato et al., 1985a;b). A título de exemplo, o molibdênio é um micronutriente que tem efeito marcante sobre a eficiência da simbiose (Franco & Day, 1990) e a calagem tem sido considerada uma prática suficiente para o suprimento do molibdênio para as culturas, por torná-lo disponível para as plantas, em conseqüência da elevação do pH do solo, que promove liberação de íons de Mo adsorvidos na superfície dos óxidos de ferro e alumínio (Hodgson, 1963; Leeper, 1970; Stout et al., 1951). Os teores de nitrogênio do solo podem também influenciar a simbiose. Teores muito baixos de nitrato no solo podem ser limitantes à atividade simbiótica (Franco & Döbereiner, 1968; Ruschel & Saito, 1977) e teores mais elevados também podem prejudicar a FBN. Rennie & Kemp (1983), testando diferentes variedades

de feijão, observaram significativa redução na quantidade de nitrogênio fixado mediante aplicação de 40 $kg.ha^{-1}$ de nitrogênio. Mas, existem dados mostrando que um balanço adequado de nutrientes no solo pode aliviar os efeitos deletérios da fertilização com nitrogênio neste processo biológico, e aumentar significativamente as taxas de nitrogênio fixado pela planta (Tsai et al., 1993).

Além dos fatores nutricionais, a temperatura e a umidade também podem ser limitantes à simbiose BNL-leguminosas, em condições tropicais. O funcionamento dos nódulos de feijoeiro encontra seu ótimo entre 25°C e 30°C e é limitado por temperaturas do solo entre 30°C e 33°C (Hungria et al., 1985; Hernandez-Armenta et al., 1989; Pankhurst & Sprent, 1976; Piha & Munns, 1987). Algumas pesquisas têm mostrado diminuição da FBN sob condições de seca (Durand et al., 1987; Sprent, 1976; Walsh, 1995).

Os elementos bióticos também exercem grande influência no sucesso da FBN. A simbiose BNL-hospedeiro depende da compatibilidade genética de ambos, e a planta hospedeira desempenha papel preponderante nos estágios iniciais da nodulação (Nutman, 1969; Nutman, 1981; Pereira & Bliss, 1987) como nos estágios finais. À época de formação das vagens, a planta diminui o fluxo de carboidratos para os nódulos, limitando a FBN (Lawn et al., 1974). Variedades de feijão com maior capacidade de manter a constância do fluxo de carboidratos para os nódulos têm se mostrado mais eficientes nesse processo de fixação (Adams et al., 1978; Graham & Halliday, 1976).

Também existe dificuldade no estabelecimento de estirpes eficientes, devido à alta promiscuidade do feijoeiro em relação ao microsimbionte, nesse sentido. Mercante et al. (1992) relataram que a falta de resposta do feijoeiro à inoculação é, muitas vezes, devido à presença de BNL nativos no solo, que nodulam o feijoeiro mesmo em áreas nas quais a cultura nunca havia sido implantada e apresentam baixa eficiência simbiótica.

A seleção do feijoeiro e seu cultivo em terras férteis pode ter realizado

uma seleção negativa, em relação à capacidade de nodulação e à fixação de nitrogênio em genótipos domesticados de feijão (Gentry, 1969; Gepts et al., 1988; Kaplan, 1965; Pereira, 1990; Pereira & Bliss, 1987). Atualmente, tem se buscado uma maior variabilidade genotípica para as características de fixação biológica de nitrogênio nos genótipos selvagens de feijoeiro (Andriolo et al., 1994). Bliss (1993) sugere que os programas de melhoramento levem em consideração a capacidade dos genótipos em nodular e fixar nitrogênio na presença de nitrato no solo.

O microsimbionte também exerce influência na eficiência da FBN. O inoculante brasileiro para o feijoeiro, durante muito tempo, foi produzido utilizando-se BNL das espécies *Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli* e *Rhizobium etli*. Algumas destas bactérias eram obtidas no exterior e testadas pelas instituições de pesquisa no Brasil (Straliotto, 2007). Atualmente, sabe-se que as estirpes de *R. leguminosarum bv. phaseoli* e *R. etli* estão sujeitas a um elevado grau de instabilidade genética (Flores et al., 1988; Soberón-Chaves et al., 1986), podendo perder sua eficiência simbiótica com certa facilidade.

Atualmente, as estirpes recomendadas como inoculantes comerciais de feijoeiro no Brasil contêm duas estirpes de *R. tropici* (CIAT899 (BR322) e BR520). Foi observado que estirpes da espécie *Rhizobium tropici* são mais resistentes a temperaturas elevadas que as estirpes de *Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli* (Araújo et al., 1993; Goulart & Baldani, 1993; Oliveira et al., 1998; Raposeiras et al., 1998). Verificou-se maior competitividade de estirpes pertencentes a esta espécie na nodulação do feijoeiro sob condições elevadas de acidez (Vargas & Graham, 1989; Wolff et al., 1991).

Em experimentos em vasos, a estirpe CIAT 899 mostrou-se mais competitiva em condições de baixo pH (Streit et al., 1995) e altas temperaturas (Oliveira & Graham, 1990). Em campo, os resultados são variáveis, tendo apresentado baixa competitividade em solos do Havaí (Thies et al., 1992) e em

solos ácidos da Colômbia (Wolff et al., 1991), e alta competitividade em solo arenoso de baixa fertilidade no Brasil (Vlassak et al., 1996, 1997). Atualmente, é das estirpes utilizadas no inoculante comercial recomendado para o feijoeiro no Brasil.

Diante do exposto, vê-se que os pontos que limitam a baixa resposta à FBN pela cultura do feijão e que vêm sendo investigados e contornados pelos pesquisadores, seriam: instabilidade genética do microsimbionte, seleção inadequada do macrosimbionte, promiscuidade do macrosimbionte associada a ineficiências de populações nativa de microsimbionte e uso de solos inadequados ao estabelecimento da simbiose.

1.2.5 Projeto: Conservação e manejo sustentado da biodiversidade do solo

O projeto "Conservation and sustainable management of below ground biodiversity" (CSM-BGBD) foi submetido ao "Global Environment Facility" (GEF) em 16 de novembro de 1998 após o endosso dos pontos focais dos países participantes. O contrato com o Programa Ambiental das Nações Unidas (*United Nations Environmental Programme* – UNEP) foi assinado em agosto de 2002. O projeto está sendo conduzido em sete países: Brasil, Costa do Marfim, Índia, Indonésia, Quênia, México e Uganda, e seu objetivo é aumentar a consciência, o conhecimento e a compreensão sobre a diversidade biológica do solo (*Below Ground Biodiversity* - BGBD), importante para a produção agrícola sustentada em paisagens tropicais, pela demonstração de métodos para conservação e manejo sustentado. O projeto explora a hipótese de que, por manejo apropriado da biota acima e no solo, a conservação otimizada da biodiversidade para benefícios globais e nacionais pode ser alcançada em mosaicos de usos da terra com diferentes intensidades de manejo e, além disso, resultar em ganhos simultâneos para a produção agrícola sustentada (Moreira et al., 2005).

Os grupos funcionais da biota do solo estudados no Brasil compreendem: macrofauna, incluindo minhocas, formigas, besouros e cupins, pestes (moscas de frutos), mesofauna, nematóides, nematóides entomo-patogênicos, fungos antagonistas, fungos saprófitas, fungos patogênicos vegetais, fungos micorrízicos arbusculares, BNL e associativas. Em alguns dos outros seis países, além destes, foram estudados também fungos ectomicorrízicos Além do inventário dos organismos do solo, também realizou-se o inventário ambiental (solos e vegetação) (Moreira et al., 2005).

As áreas de estudo estão circunscritas pelas coordenadas geográficas de 4°26' de latitude Sul e 69°36' de longitude Oeste, correspondendo a uma superfície descontínua de, aproximadamente, 54.000 m . Situam-se no município Benjamin Constant, noroeste do estado do Amazonas. Esta região, denominada de Alto Solimões, localiza-se na tríplice fronteira Brasil, Colômbia e Peru. As Janelas são áreas descontínuas de, aproximadamente, 9 ha, enumeradas de 1 a 6, das quais as Janelas 1 e 2 situam-se na comunidade de Guanabara II; as Janelas 3, 4, e 5 na comunidade de Nova Aliança e a Janela 6 dista, aproximadamente, 2 km do centro do município de Benjamin Constant, a sudeste do mesmo, e 1,9 km do rio Javari, um tributário do rio Solimões, que serve de limite entre o Brasil e o Peru (Fidalgo et al., 2005).

Por seu difícil acesso, esta região permanece como uma das mais conservadas da Amazônia. A bacia do Alto Solimões é a terra de remanescentes de povos indígenas da Amazônia e um dos mais importantes "hotspots", em termos de agrobiodiversidade (Moreira et al., 2005).

O tipo climático predominante é Af, segundo a classificação de Köppen, com temperatura e pluviosidade médias anuais de, respectivamente, 25,7ºC e 2.562 mm. Cambissolos constituem os solos dominantes nas áreas estudadas, seguidos dos Gleissolos e Alissolos. Em comum, manifestam elevados e anormais teores de alumínio extraível, com valores que variam de 0,0

a 14,6 $cmol_c$/kg de solo em superfície e de 0,0 a 25,2 $cmol_c$/kg de solo em profundidade, podendo ou não apresentar elevados conteúdos de Ca e Mg, com valores médios em superfície de, respectivamente, 4,6 e 1,4 $cmol_c$/kg de solo. A despeito do elevado conteúdo de Al extraído por KCl 1N, que pode ou não estar relacionado com a atividade do elemento em solução, a pequena profundidade do solum, os elevados teores de silte e a presença de filossilicatos 2:1 evidenciam sua maior jovialidade em relação à grande maioria dos solos de terra firme já descritos e mapeados na bacia Amazônica. Estes fatores influenciam sobremaneira suas propriedades morfológicas, químicas, físicas e biológicas, bem como seu comportamento em relação aos diferentes usos e práticas de manejo. (Coelho et al., 2005)

Fidalgo et al. (2005) caracterizaram, quanto à cobertura vegetal e uso atual, os sistemas de uso da terra (SUT) estudados como sendo: floresta tropical (neste trabalho denominada floresta primária - FP), sub-região dos baixos platôs da Amazônia (Brasil, 1977); floresta secundária em estágio avançado de regeneração (capoeira Velha - CV) com mais de cinco anos de formação, após ter sido área de cultivo; floresta secundária em estágio inicial de regeneração (capoeira nova - CN) com menos de 5 anos de formação, também após ter sido área de cultivo; agricultura (AG), áreas de cultivos agrícolas anuais (mandioca, milho, cana-de-açúcar e abacaxi) e semiperenes (banana); agrofloresta (AF) caracterizada por ter grande parte formada regeneração espontânea de espécies florestais secundárias, além do enriquecimento de espécies por meio do plantio de mudas de interesse econômico, como cupuaçu (*Theobroma grandflorum*), pupunha (*Bactris gassipae*), banana, abacaxi, café e outras (essas áreas foram desflorestadas no período de 1979 a 1983 e cultivadas com banana e mandioca; os sistemas agroflorestais foram formados logo após os primeiros ciclos de cultivo, no período de 1980 a 1984); pastagem (P), área restrita à cidade de Benjamin Constant, implantada em 1970, com capim-imperial (*Axonopus*

scoparius), o qual, após o declínio, aproximadamente onze anos de implantação, foi substituído por *Brachiaria brizantha, B. humidicola* e grama batatais (*Paspalum notatum flugge*), apresentando atualmente espécies invasoras. A reforma das pastagens é realizada por meio do plantio de mudas em cova. As capinas são realizadas três vezes ao ano, com facão, enxada e machado. Em todos os SUTs não são aplicados corretivos, fertilizantes e defensivos para o controle de pragas e não existe registro de utilização de inoculantes de bactérias que nodulam leguminosas.

1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. W.; WIERMSA, J. V.; SALAZAR, J. Differences in starch accumulation among dry bean cultivars. **Crop Science**, Madison, v. 18, n. 1, p. 155-157, Jan./Feb. 1978.

AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, n. 1, p. 143-169, Mar. 1995.

ANDRIOLO, J.; PEREIRA, P. A. A.; HENSON, R. A. Variabilidade entre linhas de formas silvestres de *Phaseolus vulgaris* quanto à características relacionadas com a fixação biológica de N2**. Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, p. 831-837, 1994.

ARAÚJO, J. L. S.; STRALIOTTO, R.; FRANCO, A. A. Seleção de cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) para fixação biológica de nitrogênio em condições de temperaturas elevadas. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 4., 1993, Londrina. **Resumos...** Londrina: IAPAR, 1993. p. 136.

ARAÚJO, R. S. Fixação biológica de nitrogênio em feijão. In: ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. (Ed.). **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA, 1994. p. 91-120.

ATLAS, R. M.; BARTHA, R. **Microbial ecology:** fundamentals and applications. 4. ed. Benjamin Cumins, Redwood (CA, USA), 1998.

BLISS, F. A. Breeding common bean for improved biological nitrogen fixation. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 152, n. 1, p. 71-79, May 1993.

BRASIL. Departamento Nacional de Produção Mineral. **Projeto RADAMBRASIL. Folha SB. 19 – Juruá:** geologia, geomorfologia, pedologia, vegetação e uso potencial da terra. Rio de Janeiro, 1977. 436 p (Levantamento de Recursos Minerais, 15).

CASSINI, S. T. A.; FRANCO, M. C. Fixação biológica de nitrogênio. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A. **Feijão:** aspectos gerais e cultura no Estado de Minas Gerais. Viçosa: UFV, 1998. p. 153-180.

CHEN, W. M.; LAEVENS, S.; LEE, T. M.; COENYE, T.; VOS, P.; MERGEAY, M.; VANDAMME, P. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov. isolated from nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, n. 5, p. 1729-1735, Sept. 2001.

COELHO, M. R.; FIDALGO, E. C. C.; ARAÚJO, F. de O.; SANTOS, H. G.; SANTOS, M. de L. M.; PÉREZ, D. V. **Solos das áreas-piloto do Projeto GEF BIOS (Conservation and Sustainable Management of Below-Ground Biodiversity: Phase I), Município de Benjamin Constant, Estado do Amazonas.** Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2005. 158 p. (Boletim de Pesquisa).

DIAZ-ROMEU, R.; BALERDI, F.; FASSENBER, H. W. Contenido de matéria orgânica y nitrogênio en suelos de América Central. **Turrialba**, San José, v. 20, n. 2, p. 185-192, apr./jun. 1970.

DUPUY, N.; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; VANDENBRUAENE, I. Phenotypic and Genotypic Characterization of Bradyrhizobia Nodulating the Leguminous tree *Acacia albida*. **International Journal of Sistematic Bacteriology**, Washington, v. 44, n. 3, p. 461-473, July 1994.

DURAND, J. L.; SHEEHY, J. E.; MINCHIN, F. R. Nitrogenase activity, photosynthesis, nodule water potential in soybean plants experiencing water deprivation. **Journal of Experimental Botany**, Cambridge, v. 38, n. 187, p. 311-321, Feb. 1987.

FIDALGO, E. C.; COELHO, M. R.; ARAÚJO, F. O; MOREIRA, F. M. S.; SANTOS, H. G.; BREFIN, M. L. M. S.; HUISING, J. Levantamento do uso e cobertura da terra de seis áreas amostrais relacionadas ao projeto "Conservation and sustainable management of below-ground biodiversity:phase1", município de Benjamin Constant, (AM). **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento da Embrapa Solos**, Rio de Janeiro, p. 1-47, 2005.

FLORES, M.; GONZÁLES, V.; PARDO, M. A.; LEIJA, A.; MARTÍNEZ, E.; ROMERO, D.; PIÑERO, D.; DAVILA, G.; PALACIOS, R. Genomic instability in *Rhizobium phaseoli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, n. 3, p. 1191-1196, Mar. 1988.

FRANCO, A. A.; DAY, J. M. Effect of lime and molybdenum on nodulation and nitrogen fixation of *Phaseolus vulgaris* L. in acid soils of Brazil. **Turrialba**, San Jose, v. 30, n. 1, p. 99-105, ene./mar. 1990

FRANCO, A. A.; DÖBEREINER, J. Interferência do cálcio e nitrogênio na fixação simbiótica do nitrogênio por duas variedades de *Phaseolus vulgaris* L. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 3, p. 223-227, 1968.

GENTRY, H. S. Origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Economic Botany**, Bronx, v. 22, n. 1, p. 55-69, Jan./Mar. 1969.

GEPTS, P; KMIECIK, K.; PEREIRA, P. A. A.; BLISS, F. A. Dissemination pathways of common bean (*P. vulgaris* L.) deduced form phaseolin electrophoretic variability I the Americas**. Economic Botany**, Bronx, v. 42, n. 1, p. 73-85, Jan./Mar.1988.

GILLER, K. E.; BEARE, M. H.; LAVELLE, P.; IZAC, A. M. N.; SWIFT, M. J. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 6, n. 1, p. 3-16, Aug. 1997.

GOULART, L. S.; BALDANI, J. I. Efeito do choque térmico na expressão de estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli e Rhizobium tropici. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE FEIJÃO, 4., 1993, Londrina. **Resumos...** Londrina: IAPAR, 1993. p. 133

GRAHAM, P. H.; HALLIDAY, J. Inoculation; nitrogen fixation in the gender *Phaseolus*. In: REUNIAO LATINO-AMERICANA DE *Rhizobium*, 8., 1976, Cali. **Anais...** Cali: CIAT, 1976. p. 313-337.

HAWKSWORTH, D. L. **The biodiversity of microorganisms and invertebrates:** its role in sustainable agriculture. Wallingford: C. A. B. International, 1991a.

HAWKSWORTH, D. L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. **Mycological Research**, New York, v. 95, n. 6, p. 641-55, June 1991b.

HERNANDEZ-ARMENTA, R.; WIEN, H. C.; EAGLESHAM, A. R. J. Maximum temperature for nitrogen fixation in common bean. **Crop Science**, Madison, v. 29, n. 5, p. 1260-1265, Sept./Oct. 1989.

HODGSON, J. F. Micronutrientes in soils. **Advances in Agronomy**, New York, v. 15, p. 119-154, 1963.

HUNGRIA, M.; THOMAS, R. J.; DÖBEREINER, J. Efeito do sombreamento na fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 10, p. 1143-1156, out. 1985.

IBGE. **IBGE lança o Mapa de Biomas do Brasil e o Mapa de Vegetação do Brasil, em comemoração ao Dia Mundial da Biodiversidade**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=169&id_pagina=1>. Acesso em: 15 fev. 2007.

JESUS, E. C.; MOREIRA, F. M. S.; FLORENTINO, L. A.; RODRIGUES, M. I. D.; OLIVEIRA, M. S. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 8, p. 769-776, ago. 2005.

KAPLAN, L. Archeology; domestication in American *Phaseolus* (Bean). **Economic Botany**, Bronx, v. 19, n. 3, p. 358-368, July/Sept. 1965.

KARLEN, D. L.; DITZLER, C. A.; ANDREWS, S. S. Soil quality: why and how? **Geoderma**, Amsterdam, v. 114, n. 3/4, p. 145-156, June 2003.

LAVELLE, P.; BIGNELL, D.; LEPAGE, M.; WOLTERS, V.; ROGER, P.; INESI, P.; HEAL, O. W.; DHILLION, S. Soil function in a changing world: The role of invertebrate ecosystems engineers. **European Journal of Soil Biology**, Paris, v. 33, n. 4, p. 159-193, Oct./Dec. 1997.

LAWN, R. J.; BRUN, W. A. Symbiotic nitrogen fixation in soybeans. I. Effect of photosynthetic source sink manipulations. **Crop Science**, Madison, v. 14, n. 1, p. 11-16, Jan./Feb. 1974.

LEEPER, G. W. **Six trace elements in soils. Melbourne:** Melbourne University, 1970. p. 53-59.

LIMA, A. S.; PEREIRA, J. P. A. R.; MOREIRA, F. M. S. Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium spp*. Isoladas de solos da Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 11, p. 1095-1104, 2005.

LOVATO, P. E.; PEREIRA, J. C.; VIDOR, C. Flutuação populacional de estirpes de *Rhizobium phaseoli* na rizosfera de feijão. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 9, n. 1, p. 211-218, jan./abr. 1985a.

LOVATO, P. E.; PEREIRA, J. C.; VIDOR, C. Flutuação populacional de *Rhizobium phaseoli* em solos com e sem calagem. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 9, n. 1, p. 9-12, jan./abr. 1985b.

LOVELOCK, J. M. **The ages of Gaia**. Oxford: Oxford University Press, 1988.

MALAVOLTA, E. Nutrição e adubação. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DO FEIJÃO, 1972, Viçosa. **Anais...** Viçosa: UFV, 1972. p. 211-242.

MERCANTE, F. M.; STRALIOTTO, R.; DUQUE, F. F.; FRANCO, A. A. A **inoculação do feijoeiro comum com rizóbio.** Seropédica: Embrapa-CNPBS, 1992. 8 p. (Embrapa-CNPBS. Comunicado técnico, 10).

MOREIRA, F. M. S. Biodiversity of rhizobia from a wide range of forest Leguminosae species in Brazil. In: PEDROSA; F.; HUNGRIA, M.; YATES, G.; NEWTON, W. (Ed.). **Nitrogen fixation:** from molecules to crop productivity. 2000. p. 181-182.

MOREIRA, F. M. S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSTERS, K.; FRANCO, A. A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel eletrophoresis of their total proteins. **Systematic and Applied Microbiology**, New York, n. 1, v. 16, p. 135-146, Apr. 1993.

MOREIRA, F. M. S.; LIMA, A. S.; ACIOLI, A.; MOINO JÚNIOR, A.; TREGUE, A. P.; BARBERI, A.; DELABIE, J.; MARTINS, A. L. U.; GRIPPA, C. R.; SILVA FILHO, D. F. da; JESUS, E. C.; ANDRADE, E. P.; FIDALGO, E. C. C.; ARAÚJO, F. O.; VILLANI, F. T.; MACHADO, F. M.; RIBEIRO, F. V.; RIBEIRO, G.; SILVA, G. A.; SCHIFFLER, G.; PEREIRA, H.; NODA, H.; SANTOS, H. G. dos; AMARAL, I. L. do; HUISING, J.; SIQUEIRA, J. O.; . MORAIS, J. W.; PEREIRA, J. P.; VIDAL, J. O.; LOUZADA, J.; CARES, J.; UGUEN, K.; SILVA, K. da; FLORENTINO, L. A.; ABREU, L. M. de; PFENNING, L. H.; OLIVEIRA, M. S. de; GOMIDE, M.; BREFFIN, M. L. M. S.; RODRIGUES, M. I. D.; COELHO, M. R.; SILVA, M. A.; SANTOS, M. S.; SILVA, N. M. da; DIAS, N.; NÓBREGA, R. S. A.; CONSTANTINO, R.; CAVALCANTI, R. S.; LEAL, P. L.; FERREIRA, P. A.; SILVA, P. H.; ZANETTI, R.; TAPIA-CORAL, S. C.; STÜRNER, S. L.; ALFAIA, S. S.; ANDALÓ, V. Biodiversidade de ecossistemas naturais: Projeto Conservação e Manejo da Biodiversidade do Solo – Bios Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 30., 2005, Recife. **Anais...** Recife: SBCS: Embrapa Solos - UEP Recife: UFRPE, 2005. Seção Palestras. 1CD-ROM.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora UFLA, 2002. 626 p.

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the β-subclass of proteobacteria. **Nature**, London, v. 411, n. 6850, p. 948-950, Aug. 2001.

NCBI (National Center for Biotechnology Information) **Citation databases.** Bethesda: U. S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike. Disponível em:<http://www.ncbi.nih.gov>. Acesso em: 28 fev. 2007.

NUTMAN, P. S. Genetics of symbosis and nitrogen fixation in legumes. **Proceedings Royal Society**, v. 127, p. 417-437, 1969.

NUTMAN, P. S. Hereditary host factors affecting nodulation and nitrogen fixation. In: GIBSON, A. H.; NORTON, W. E. (Ed.). **Current perspectives in nitrogen fixation**. Camberra: Australian Academy of Science, 1981. p. 194-204.

OLIVEIRA, C. A.; VASCONCELOS, C. A.; MARRIEL, I. E.; PEREIRA FILHO, A.; SÁ, N. M. H. Efeito da temperatura sobre a fixação de N2 do feijoeiro. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 23.; REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 7.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 5.; REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 2., Caxambu, 1998. **Resumos...** Caxambu: Universidade Federal de Lavras, 1998. p. 181.

OLIVEIRA, I. P.; ARAÚJO, R. S.; DUTRA, L. G. Nutrição mineral e fixação biológica de nitrogênio. In: ARAÚJO, R. S.; RAVA, C. A.; STONE, L. F.; ZIMMERMANN, M. J. de O. (Coord.). **Cultura do feijoeiro comum no Brasil.** Piracicaba: Potafos, 1996. p. 169-221.

OLIVEIRA, L. A. de; GRAHAM, P. H. Evaluation of strain competitiveness in + - *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli using a nod fix natural mutant. **Archives in Microbiology**, Berlin, v. 153, n. 4, p. 305-310, Mar. 1990.

PALLERONI, N. J. Microbial diversity and the importance of culturing. In: SAMSON, R. A.; STALPERS, J. A.; VAN DER MEI, D. (Ed.). **Culture Collections to Improve the Quality of Life**. Baarn, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1996. p. 111-114.

PANKHURST, C. E.; SPRENT, J. I. Effects of temperature and oxygen tension on the nitrogenase and respiratory activities of turgid and water-stressed soybeans and French bean root nodules. **Journal of Experimental Botany**, London, n. 96, v. 27, p. 1-9, 1976.

PEREIRA, E. G. **Diversidade de rizóbios isolados de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia.** 2000. 93 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PEREIRA, P. A. A. Evidências de domesticação e disseminação do feijoeiro comum e conseqüências para o melhoramento genético da espécie. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 19-23, jan. 1990.

PEREIRA, P. A. A.; BLISS, F. A. Nitrogen fixation; plant growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) at different levels of phosphorus availability. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 104, n. 1, p. 79-84, 1987.

PIHA, M. I.; MUNNS, D. N. Sensitivity of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) symbiosis to high soil temperature. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 98, n. 2, p. 183-194, 1987.

RAPOSEIRAS, R.; PINTO, P. P.; PASSOS, R. V. M.; SCOTTI, M. R. M. M. L.; PAIVA, E.; SELDIN, L.; SÁ, N. M. H. Variabilidade de colônias isoladas de estirpes de *Rhizobium* efetivas na nodulação do feijoeiro, antes e após exposição à temperatura elevada. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 23.; REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 7.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 5.; REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 2., 1998, Caxambu. **Resumos...** Caxambu: Universidade Federal de Lavras, 1998. p. 208.

RAPPÉ, M. S.; GIOVANNONI, S. J. The uncultured microbial majority. **Annual Review Microbiology,** Palo Alto, v. 57, p. 369–394, 2003.

RENNIE, R. J.; KEMP, G. A. N2-fixation in field beans quantified by N dilution. I. Effect of strains of *Rhizobium phaseoly*. **Agronomy Journal**, Madison, v. 75, n. 4, p. 640-644, Apr. 1983.

RIVAS, R.; VELÁZQUEZ, E.; WILLEMS, A.; VIZCAÍNO, N.; SUBBA-RAO, N.; MATEOS, P. F.; GILLIS, M.; DAZZO, F. D.; MARTINEZ-MOLINA, E. A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule

symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 11, p. 5217-5222, 2002.

RUSCHEL, A. P.; SAITO, S. M. T. Efeito da inoculação de *Rhizobium*, nitrogênio e matéria orgânica na fixação simbiótica de nitrogênio em feijão (Phaseolus vulgaris L.). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 1, n. 1, p. 21-24, jan./abr. 1977.

SOBERÓN-CHAVES, G.; NAJERA, R.; OLIVEIRA, H.; SEGOVIA, L. Genetic rearrangements of a *Rhizobium phaseoli* symbiotic plasmid. **Journal of Bacteriology**, Oxford, v. 167, n. 2, p. 487-491, Aug. 1986.

SPRENT, J. I. Water deficits and nitrogen-fixing root nodules. In: KOZLOWSKI, T. T. (Ed.). **Water deficits and plant growth**. New York: Academic Press, 1976. p. 291- 315.

STOLZ, J. F.; BOTKIN, D. B.; DASTOOR, M. N. The integral biosphere. In: RAMBLER, M. B.; MARGULIS, L.; FESTER, R. (Ed). **Global Ecology**. San Diego, 1989. p. 31-49.

STOUT, P. R.; MEAGHER, W. R.; PEARSON, G. A.; JOHNSON, C. M. Molybdenum nutrition of crop plants. I. The influence of phosphate and sulfate on the absorption of molybdenum from soils and solution cultures. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 3, n. 1, p. 51-87, 1951.

STRALIOTTO, R. **A Importância Da Inoculação Com Rizóbio Na Cultura Do Feijoeiro**. Disponível em: <http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes /artigos/fbnl_inocula_feijoeiro.html> Acesso em: 16 fev. 2007.

STREIT, W.; BOTERO, L.; WERNER, D.; BECK, D. Competition for nodule occupancy on *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium etli* and *Rhizobium tropici* strains can be efficiently monitored in an ultisol during early stages of growth using a constitutive GUS gene fusion. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 27, n. 8, p. 1075-1081, Aug. 1995.

SY, A.; GIRAUD, E.; JOURAND, P.; GARCIA, N.; WILLEMS, A.; DE LAJUDIE, P.; PRIN, Y.; NEYRA, M.; GILLIS, M.; BOIVIN-MASSON, C.; DREYFUS, B. *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**, Oxford, v. 183, n. 1, p. 214-220, Jan. 2001.

SWIFT, S.; THROUP, J. P.; SALMOND, G. P. C.; WILLIAMS, P.; STEWART, G. S. A. B. Quorum sensing; a population-density component in the determination of bacterial phenotype. **Trends Biochemistry Science**, v. 21, n. 6, p. 214–219, June 1996.

THIES, J. E.; BOHLOOL, B. B.; SINGLETON, P. W. Environmental effects on competition for nodule occupancy between introduced and indigenous rhizobia and among introduced strains. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, n. 6, p. 493-500. June 1992.

TORSVIK, V.; SORHEIM, R.; GOKSOYR, J. Total bacterial diversity in soil and sediment communities - a review. **Journal of Industrial Microbiology**, Hampshire, v. 17, n. 3/4, p. 170-178, Sept./Oct. 1996.

TRUJILLO, M. E.; WILLEMS, A.; ABRIL, A.; PLANCHUELO, M. A.; RIVAS, R.; LUDEN˜A, D.; MATEOS, F. P.; MOLINA, E. M.; VELA´ZQUEZ1, E. Nodulation of *Lupinus albus* by Strains of *Ochrobactrum lupine*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, 71, n. 3 p. 1318-1327, Mar. 2005

TRÜPER, H. G. Prokaryotes: an overview with respect to biodiversity and environmental importance. **Biodiversity and Conservation**, v. 1, n. 4, p. 227-236, Dec. 1992

TSAI, S. M.; BONETTI, R.; AGBALA, S. M.; ROSSETTO, R. Minimizing the effect of mineral nitrogen on biological nitrogen fixation in common bean by increasing nutrient levels. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 152, n. 1, p. 131-138, May 1993.

VALOIS, A. C. C. **Benefícios e estratégias de utilização sustentável da Amazônia**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. 75 p.

VAN BERKUN, P.; EARDLY, B. D. The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificand* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschinomene indica*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 3, p. 1132-1136, Mar. 2002.

VAN NOORDWIJK, M.; CERRI, C.; WOOMER, P. L.; NUGROHO, P.; BERNOUX, M. Soil carbon dynamics in the humid tropical forest zone. **Geoderma**, Amsterdam, v. 79, n. 1/4, p. 187-225, Sept. 1997.

VARGAS, A. A. T.; GRAHAM, P. H. Cultivar and pH effects on competition for nodule sites between isolates of *Rhizobium* in beans. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 117, n. 2, p. 195-200, July 1989.

VLASSAK, K.M.; MERCANTE, F.; STRALIOTTO, R.; FRANCO, A. A.; VUYLSTEKE, M.; VANDERLEYDEN, J. Evaluation of the intrinsic competitiveness and saprophytic competence of *Rhizobium tropici* IIB strains. **Biologogy and Fertility of Soils**, Berlin, v. 24, n. 3, p. 274-282, Mar. 1997.

VLASSAK, K.; VANDERLEYDEN, J.; FRANCO, A. A. Competition and persistence of Rhizobium tropici and Rhizobium etli in a tropical soil during sucessive bean (Phaseolus vulgaris L.) cultures. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 21, n. 1/2, p. 61-68, 1996.

WALSH, K. B. Physiology of the legume nodule and its response to stress. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 27, p. 637-655, 1995.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 51, n. 2, p. 221-271, June 1987.

WOLFF, A. B.; STREIT, W.; KIPE-NOLT, J. A.; VARGAS, H.; L WENER, H. Competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli strains in relation to environmental stress and plant defense mechanisms. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 12, n. 3, p. 170-176, 1991.

ZILLI, J. É.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. da C.; NEVES, M. C. P. Diversidade Microbiana Como Indicador de Qualidade do Solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologi**a, Brasília, v. 20, n. 3, p. 391-411, 2003.

CAPÍTULO 2

OCORRÊNCIA E EFICIÊNCIA DE POPULAÇÕES DE BACTÉRIAS QUE NODULAM FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.), EM SOLOS SOB DIFERENTES SISTEMAS DE USO DA TERRA, NA AMAZÔNIA OCIDENTAL

RESUMO

BARBERI, Alexandre. Ocorrência e eficiência de populações de bactérias que nodulam feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos sob diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental**. In:_____ Diversidade e eficiência de bactérias que nodulam feijoeiro de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental***.* 2007. Cap. 2, p. 28-59. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG[1].

Diversas são as razões para o baixo rendimento do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), mas uma das mais importantes é devido à condições limitantes em nitrogênio. A fixação biológica de nitrogênio pode contornar os inconvenientes da aplicação do nitrogênio mineral, tornando o processo de produção menos prejudicial ao meio ambiente, permitindo ao agricultor ser menos dependente de produtos externos a sua propriedade, gerando uma produção mais sustentável. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência de populações edáficas de bactérias que nodulam leguminosas (BNL), bem como a sua eficiência na fixação biológica de nitrogênio em associação com feijão e suas relações com os atributos do solo em região da Amazônia Ocidental, em diferentes sistemas de uso da terra. Coletaram-se amostras de solo, na camada de 0-20 cm, em 98 pontos distribuídos nos seguintes sistemas de uso da terra (SUT): 30 pontos na capoeira nova (CN), 10 na capoeira velha (CV), 17 na floresta primária (FP), 13 em pastagem (P), 18 na agricultura (AG) e 10 em agrofloresta (AF). O feijoeiro capturou bactérias que formam nódulo em 58% das unidades amostrais, tendo as menores porcentagens de unidades amostrais noduladas sido encontradas nos SUTs floresta primária, capoeira nova e agricultura e as maiores nos SUTs agrofloresta, pastagem e capoeira velha. Concluiu-se que: existem populações de bactéria fixadoras de nitrogênio que nodulam feijão presentes em solos sob diferentes SUTs na Amazônia Ocidental. As populações nativas de bactérias que formam nódulos no feijoeiro dos diversos SUTs, inoculadas por meio de suspensões de solo, foram ineficientes. A população de bactérias que nodulam leguminosas do SUT pastagem foi a que possibilitou maior acúmulo de nitrogênio na parte aérea em associação com o feijoeiro. O único SUT que se diferenciou dos demais pelas análises de variáveis canônicas foi a pastagem, provavelmente, devido à diferenças entre atributos edáficos. As variáveis que apresentaram maior correlação com as variações ocorridas no experimento foram: o acúmulo de nitrogênio, para as relativas à nodulação e ao crescimento do feijoeiro, e o teor de ferro do solo, para os atributos edáficos.

[1]Orientadora: Fátima Maria de Souza Moreira – UFLA.

ABSTRACT

BARBERI, Alexandre. Occurrence and Efficiency of Populations of Bacteria that Nodulating Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Soil under Different Land Use Systems in the Amazonian Occidental In:_____ **Diversity and Efficiency of Bacteria Nodulating Common Beans from Different Land Use Systems in the Western Amazon region.** 2007. p. 28-59 Thesis (Doctorate in Soils e Plants Nutrition) - Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil[1].

Many are the reasons for the low income of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), but one of major limiting factor is nitrogen. The biological nitrogen fixation may replace nitrogen fertilizers, with economic and ecological advantages, to the farmers, turning them less dependent of external inputs, generating more sustainable yields. The present work aimed to evaluate the occurrence of soil bacterial populations nodulating common beans, as well as their efficiencies in the biological nitrogen fixation and their relationships with soil attributes, from different land use systems in western Amazon region. Soil samples were collected at the layer 0-20 cm,in 98 points dsitributed in the following land use systems (LUS): 30 points in the young secondary forest (CN), 10 in the old secondary forest (CV), 17 in the pristine forest (FP), 13 in pasture (p), 18 in agriculture (AG) and 10 in agroforestry (AF), all with 3 replicates. The common bean captured bacteria that form nodule in 58% of the units samples, being the small percentage of nodulating units found in the LUSs FP, CN and AG and the highest in AF, P and CV. Nitrogen –fixing Bacterial populations nodulating common beans occurred in soils under all LUSs in . The native populations nodulating common beans of diverse the LUSs, were inefficient in promoting plant growth. The populations of LUS P presented the highest shoot N-content The only LUS different from the others by the analyzis of canonic variables was pasture, probably, due to differences among soils attributes. The biological variable that presented highest correlation with the variations occurred in the experiment were: shoot N-content and soil iron content.

[1]Adviser:: Fátima Maria de Souza Moreira – UFLA

2.1 INTRODUÇÃO

Entre as leguminosas, o feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é, reconhecidamente, a de maior importância social, já que é a principal fonte de proteína das famílias. No Brasil, são cultivados, anualmente, mais de 4.225.000 ha (Conab, 2006) de feijão, a maioria em áreas de pequenas dimensões e com rendimento muito baixo. Diversas são as razões para este baixo rendimento, porém, a mais importante é a dificuldade de investimento dos pequenos produtores. Cerca de 71% (Oliveira & Teixeira, 2005) do feijão cultivado no Brasil provém de pequenos agricultores, que utilizam pouca tecnologia.

A utilização de fertilizantes, principalmente fontes de fósforo e nitrogênio, poderia melhorar estes rendimentos, mas, além do alto custo, alguns nutrientes, como o nitrogênio, podem ser poluidores em potencial e têm, aproximadamente, 50% de eficiência (Peoples et al., 1995a,b; Cassman et al., 2002), o que força o agricultor a aplicar doses elevadas do mesmo.

A fixação biológica de nitrogênio pode contornar os inconvenientes da aplicação do nitrogênio mineral, tornando o processo de produção menos impactante ao meio ambiente, deixando o agricultor menos dependente de produtos externos à sua propriedade e gerando uma produção mais sustentável, além do baixo custo comparado à adubação mineral.

O feijoeiro, em relação à associação com bactérias formadoras de nódulos, é considerado uma planta promíscua, podendo associar-se simbioticamente com diversas espécies de bactérias que incluem: *Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli, R. tropici, R. gallicum, R. giardinii, R. etli, R. mongolense, R. yanglingense, Sinorhizobium fredii, S. americanum, Mesorhizobium. loti* e *M. huakuii* (Moreira & Huising, 2004).

De modo geral, as populações nativas de BNL são muito competitivas pelos sítios de infecção nas raízes das plantas hospedeiras, mas, freqüentemente,

apresentam baixa eficiência simbiótica, limitando a produtividade das leguminosas (Berg et al., 1988; Keyser et al., 1984)

Diversos trabalhos têm demonstrado que a eficiência destas associações pode variar, dependendo tanto da espécie de bactéria como da variedade de feijão (Andriolo et al., 1994; Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1975; Franco, 1993; Kipe-Nolt et al., 1992; Singh et al., 1991)

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência de populações edáficas de bactérias formadoras de nódulo, bem como a sua eficiência na fixação biológica de nitrogênio, em associação com feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e suas correlações com os atributos do solo na região da Amazônia Ocidental, em diferentes sistemas de uso da terra.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho faz parte do projeto *Conservation and Sustainable Management of Below-Ground Biodiversity* e as áreas estudadas estão localizadas em uma das comunidades indígenas contempladas pelo projeto. O local situa-se a, aproximadamente, 1.100 km a oeste de Manaus, no município de Benjamin Constant e está localizado às margens do Rio Solimões, no noroeste do estado do Amazonas, no limite da tríplice fronteira Brasil, Colômbia e Peru. Esta é uma área remanescente de povos indígenas e é um dos mais importantes "hotspots", em termos de agrobiodiversidade (Moreira et al., 2005).

Não há estradas disponíveis para o acesso ao local, o qual é realizado por meio de barco ou avião. As comunidades indígenas estão organizadas em associações, interagindo com pesquisadores desde 1995, por meio do Projeto de Desenvolvimento Sustentado do Alto Solimões (Prodesas), praticando agricultura de pequena escala, agrofloresta e extrativismo vegetal.

As áreas avaliadas estão localizadas nas comunidades de Benjamin Constant, Nova Aliança e Guanabara II, que existem há 22 anos e são formadas por representantes dos índios Ticuna, algumas delas constituem reservas da Funai desde o segundo semestre de 2003.

As áreas amostradas (Janelas) são áreas descontínuas de, aproximadamente, 9 ha, enumeradas de 1 a 6. As Janelas 1 e 2 situam-se na comunidade de Guanabara II, as Janelas 3, 4, e 5 na comunidade de Nova Aliança e a Janela 6 dista, aproximadamente, 2 km do centro do município de Benjamin Constant, a sudeste do mesmo, e a 1,9 km do rio Javari, um tributário do rio Solimões, que serve de limite entre Brasil e Peru (Fidalgo et al., 2005).

As amostras de solo foram coletadas de cinco diferentes sistemas de uso da terra. As localizações, a identificação de culturas e os croquis de campo destas áreas (janelas) nas comunidades estão apresentados no Anexo 1.

Coletaram-se 98 amostras de solo, na camada de 0-20 cm, utilizando-se trado de rosca, distribuídos em 30 pontos na capoeira nova (CN), floresta secundária em estágio inicial de regeneração com menos de 5 anos de formação, após ter sido área de cultivo; 10 pontos na capoeira velha (CV), floresta secundária em estágio avançado de regeneração com mais de cinco anos de formação, após ter sido área de cultivo; 17 pontos na floresta primária (FP), floresta tropical da sub-região dos baixos platôs da Amazônia (Brasil, 1977); 13 pontos na pastagem (P), área implantada em 1970 com capim-imperial (*Axonopus scoparius*), que, após declínio, aproximadamente onze anos da sua implantação, foi substituído por *Brachiaria brizantha, B. humidicola* e grama batatais (*Paspalum notatum flugge*), apresentando atualmente espécies invasoras; 18 na agricultura (AG), áreas de cultivos agrícolas anuais (mandioca, milho, cana-de-açúcar e abacaxi) e semiperenes (banana); e 10 na agrofloresta (AF), formada por regeneração espontânea de espécies florestais secundárias, além do enriquecimento de espécies por meio do plantio de mudas de interesse

econômico, como cupuaçu (*Theobroma grandflorum*), pupunha (*Bactris gassipae*), banana, abacaxi, café e outras. Essas áreas foram desflorestadas no período de 1979 a 1983 e cultivadas com banana e mandioca, tendo os sistemas agroflorestais sido formados logo após os primeiros ciclos de cultivo, no período de 1980 a 1984. A caracterização das áreas de estudo encontra-se em Fidalgo et al. (2005).

Na primeira janela, foram coletados 13 pontos; na segunda, 19 pontos; na terceira, 11 pontos; na quarta, 16 pontos; na quinta, 21 pontos e na sexta, 18 pontos. As análises química e física dos solos encontram-se em Nóbrega (2006) sendo as médias dos valores apresentadas na Tabela 1.

Em nenhuma das áreas houve introdução de estirpes exóticas por meio da inoculação. A coleta das amostras de solos seguiu normas instituídas pelo projeto, sendo iguais para todos os países envolvidos. A descrição detalhada desta encontra-se em Moreira & Huising (2004) (ver também www.biosbrasil.ufla.br).

Cada amostra composta, representante do ponto georreferenciado, constituiu-se de 12 amostras simples, coletadas à profundidade de 0-20cm. As amostras simples foram coletadas nos raios de 3 a 6 m do ponto principal, conforme esquema representado na Figura 1.

TABELA 1 Características químicas dos solos amostrados nos diferentes sistemas de uso da terra (SUTs)

SUT	FP	P	AF	AG	CN	CV
pH	4,5	5,2	4,9	5,4	4,9	4,6
S	7,2	6,0	22,9	5,5	6,9	22,4
P	4,0	2,8	4,5	4,4	3,6	3,8
P-rem	10,2	11,2	14,4	17,9	14,2	11,4
K^+	62,8	40,4	62,8	94,5	76,4	56,1
Ca^{2+}	3,8	2,2	7,3	8,9	6,1	4,0
Mg^{2+}	2,0	1,4	2,1	2,5	2,5	1,7
Al^{3+}	5,7	2,8	2,5	1,7	3,0	5,2
H+Al	22,1	12,8	12,4	8,2	13	19,9
SB	6,0	3,8	9,6	11,7	8,8	5,8
t	11,7	6,6	12,1	13,3	11,9	11,1
T	28,1	16,6	22,0	19,9	21,8	25,7
V %	22,3	24,2	43,9	61,6	43,6	26,9
M %	49,4	42,5	21,4	12,8	25,3	51,9
MO	1,7	1,6	1,8	1,9	1,9	1,7
Zn	6,5	7,7	5,2	7,0	6,7	3,6
Fe	190	471,8	136,7	97,3	157,6	126,2
Mn	70,0	40,5	58,0	70,1	53,9	56,4
Cu	1,5	1,9	2,0	1,4	2,0	1,4
B	0,3	0,1	0,4	0,4	0,2	0,1
Areia %	13,6	28,2	13,6	22,4	22,0	13,2
Silte %	44,1	39,2	47,4	39,8	41,9	47,3
Argila %	42,3	32,6	39,0	37,8	36,1	39,5

Média dos valores para os números de pontos de coleta em cada SUT: 10 pontos na agrofloresta (AF); 18 na agricultura (AG); 17 na floresta primária (FP); 10 na capoeira velha (CV); 30 na capoeira nova (CN) e 13 na pastagem (P). Para os resultados de análises de: pH em água; S: enxofre, em ppm; P: fósforo, em ppm; K: potássio, em ppm; Ca: cálcio, em meq/100cc; Mg: magnésio, em meq/100 cc; Al: alumínio, em meq/100cc; H + Al: hidrogênio + alumínio, em meq/100cc; SB: soma de bases trocáveis, em meq/100cc; t: CTC efetiva, em meq/100cc; T: CTC em pH 7; V: saturação de bases da CTC a pH 7; m: saturação de Al da CTC efetiva, em porcentagem (%); MO: matéria orgânica, em porcentagem (%); P: remanescente, em ppm; Zn: zinco, em ppm; Fé: ferro, em ppm; Mn: manganês, em ppm; Cu: cobre, em ppm; B: boro, em ppm (Nóbrega, 2006).

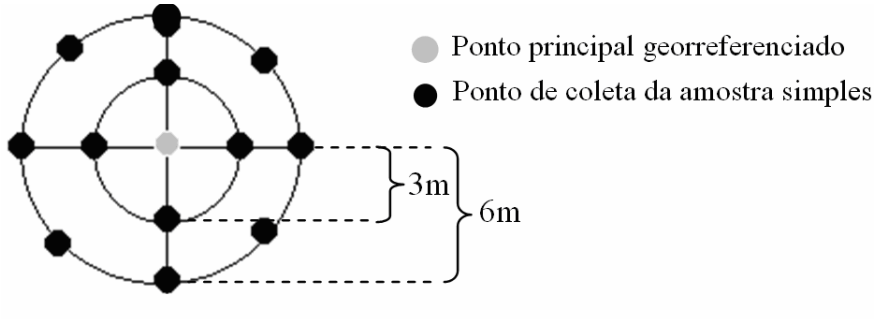


FIGURA 1 Esquema de coleta das amostras de solo. O ponto do centro do círculo foi georreferenciado. Os 12 pontos em negrito representam as amostras simples.

A serrapilheira foi retirada antes da coleta das amostras e os instrumentos de coleta foram flambados, antes e após a coleta de diferentes amostras compostas, para evitar a contaminação entre amostras e com as BNL exóticas. Cerca de 300g de cada amostra composta foram destinados para a análise microbiológica e 200g para a análise das características físicas e químicas do solo. As amostras destinadas à análise microbiológica foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis e armazenadas em recipientes de isopor, para conservação e levadas, o mais rápido possível, para o laboratório, onde foram conservadas a 4ºC. Estas amostras foram utilizadas para o isolamento de BNL e de outros grupos de microrganismos.

A planta-isca utilizada foi o feijoeiro *(Phaseolus vulgaris* L), cultivar Talismã, de grão tipo carioca, lançada em 2002, que possui resistência à antracnose e ao vírus do mosaico comum e é moderadamente resistente à mancha-angular (Ramalho et al., 2002).

Para a avaliação da ocorrência e da eficiência das populações de BNL conduziu-se, durante os meses de agosto a outubro de 2004, durante 45 dias, um experimento em vasos Leonard (Vincent, 1970), seguindo os métodos padronizados instituídos no projeto para todos os países envolvidos (Moreira & Huising, 2004), no Laboratório de Microbiologia do Solo/DCS/UFLA.

O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado (DIC), desbalanceado. Os tratamentos foram: os cinco sistemas de uso da terra (capoeira nova, capoeira velha, floresta primária, pastagem, agricultura e agrofloresta) com 30, 10, 17, 13, 18 e 10 repetições, respectivamente e quatro tratamentos testemunhas: dois sem inoculação (uma com adição de N mineral e outra sem N mineral) e duas com inoculação (1 ml por semente de um caldo de cultivo de estirpes CIAT899 (BR322) e UFLA 02100, para a verificação da ausência de contaminação e para comparações com as plantas inoculadas) com três repetições laboratoriais cada.

As unidades experimentais foram compostas por vasos de Leonard inoculados com 1 mL da suspensão de solo da diluição 10^{-1} de cada um dos 98 pontos da coleta. O nitrogênio, quando aplicado, foi em quatro parcelas, a intervalos de 7 dias, totalizando 280 mg de N por vaso, na forma de NO_3NH_3.

A escolha das estirpes deveu-se ao fato de a primeira (CIAT899) ser recomendada como inoculante comercial e a segunda (UFLA02100) por ser uma estirpe isolada da Amazônia que tem mostrado boa eficiência em experimentos (Soares et al., 2006).

Realizaram-se as diluições de solo em solução salina 0,55% (10 g de solo com base no peso seco: 90 mL solução salina esterilizada) misturadas em agitadores horizontais durante 30 minutos a 220 rpm.

Os vasos de Leonard foram compostos por duas partes. A parte superior continha uma mistura 1:1 de areia (250 mL) e vermiculita (250mL), e a inferior continha solução nutritiva de Jensen modificada (K_2HPO_4 0,2 g L^{-1}; $MgSO_47H_2O$ 0,2 g L^{-1}, NaCl 0,2 g L^{-1}, $CaHPO_4$ 1 g L^{-1}, $FeCl_3.6H_2O$ 0,1 g L^{-1}; H_3BO_3 2,86 mg L^{-1}; $MnSO_4.4H_2O$ 2,03 mg L^{-1}; $ZnSO_4.7H_2O$ 0,22 mg L^{-1}; $CuSO_4.5H_2O$ 0,08 mg L^{-1} e $Na_2MoO_4.H_2O$ 0,09 mg L^{-1}) diluída quatro vezes, autoclavada, por 30 minutos, a 1,5 $kg.cm^{-2}$ e a 127°C. Após o preparo, os vasos foram autoclavados por uma hora, à pressão de 1,5 $kg.cm^{-2}$ e a 127°C.

As sementes utilizadas foram desinfestadas superficialmente com etanol 70% por 1 segundo e hipoclorito de sódio a 1,5%, por 4 minutos. Em seguida, foram lavadas seis vezes, com água destilada esterilizada. Foram, então, semeadas quatro sementes por vaso e, posteriormente, foi feita a inoculação com as suspensões provenientes das diluições, colocando-se 1 mL junto a cada semente. Também foi colocada, sobre a superfície do vaso, uma fina camada de mistura esterilizada de areia, benzeno e parafina (proporção de 5:1:0,015, respectivamente), com a finalidade de evitar possíveis contaminações.

Para a composição dos tratamentos controles inoculou-se 1 mL de meio 79 semi-sólido com a estirpe na fase log de seu crescimento apresentando, aproximadamente, 10^8 células por semente (quatro dias de cultivo a 28ºC) em cada semente.

A solução nutritiva dos vasos foi reposta periodicamente com solução autoclavada. Decorridos três a cinco dias após a germinação, foi feito o desbaste, deixando-se somente uma planta por vaso. As plantas foram colhidas por ocasião do florescimento, para a determinação da nodulação (contagem de nódulos e matéria seca dos mesmos), da matéria seca da parte aérea e do nitrogênio total da parte aérea, além do isolamento das bactérias nativas presentes nos nódulos.

O teor de nitrogênio total foi avaliado pelo método semimicrokjedahl, de acordo com Sarruge & Haag (1979), determinando-se a percentagem de N na matéria seca da parte aérea. O N acumulado na parte aérea foi calculado multiplicando-se o peso da matéria seca da parte aérea pelo teor de N.

De cada unidade amostral foram selecionados doze nódulos aleatoriamente para isolamento posterior, sendo incluídos no cálculo de número de nódulos por planta e não fizeram parte da variável matéria seca de nódulos por planta.

Após efetuada a colheita, foram avaliadas as seguintes variáveis: número de nódulos por planta (N° N); matéria seca de nódulos por planta (MSN); matéria seca da parte aérea por planta (MSPA); teor (%N) e acúmulo de N na MSPA (ACM N) (Sarruge & Haag, 1979). A eficiência relativa (ER) de cada parcela foi calculada pela seguinte expressão:

$$ER = \frac{\text{MSPA inoculada}}{\text{MSPA média da planta inoculada com UFLA 02100}} \times 100$$

2.2.1 Análise dos dados

Todos os dados foram submetidos à análise de variância, empregando-se o sistema de análise estatística Sisvar, versão 4.0 (Ferreira, 2000). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade e os valores das variáveis número de nódulos por planta (N° N) e matéria seca de nódulos por planta (MSN) foram transformados pela formula (X+0,5) ^ 0,5.

Utilizando-se os dados de variáveis das plantas (número de nódulos por planta (N° N); matéria seca de nódulos por planta (MSN); matéria seca da parte aérea por planta (MSPA); teor (%N) e acúmulo de N na MSPA (ACM N) e eficiência relativa (ER)) e atributos edáficos (P, K, Ca, Mg, H+Al, Al, m, T, CTC, P rem, Zn, Fe, B, SB, t, Mn, Cu, S, matéria orgânica, areia, argila) fornecidos por Nóbrega (2006), foi realizada a análise de variância multivariada conjunta (MANAVA). Utilizou-se, para isso, o programa SAS. Para testar a hipótese de igualdade dos efeitos de tratamento, foi adotado o critério de Wilks. A significância do teste foi atribuída à existência de divergência entre os tratamentos. A análise de correlação canônica, realizada na matriz dos resíduos, foi proveniente de um modelo inteiramente casualizado multivariado, em que se

realizou a correlação entre o grupo formado pelos atributos edáficos e o grupo formado pelas variáveis das plantas de feijão.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Comparação dos SUT de coleta nas diversas variáveis, avaliados para amostras coletadas na Amazônia Ocidental

Na Tabela 2 são apresentadas as médias das diversas variáveis em cada SUT e tratamentos testemunha, comparadas pelo teste de médias de Scott-Knott ($p<0,05$). Verificam-se os maiores valores para teor de nitrogênio e acúmulo de nitrogênio no SUT pastagem, respectivamente, 1,87% e 2,44 mg. Estes valores refletem provavelmente os menores valores encontrados para população de BNL no SUT Floresta Primária e a maior população ativa no SUT Pastagem, indicados pelo número de nódulos, embora este não tenha tido diferenças significativas. Quanto às demais variáveis, todos os SUTs apresentaram valores iguais. Entre as testemunhas inoculadas, a estirpe UFLA02100 foi a que apresentou maior acúmulo de nitrogênio, 6,63 mg, sendo inferior apenas à testemunha que recebeu nitrogênio mineral. Estes resultados indicam a ineficiência das populações de BNL em todos os SUTs.

As médias das variáveis relativas à nodulação, ao número de nódulos e à matéria seca de nódulos, nos tratamentos testemunhas inoculadas, apresentaram resultados similares aos encontrados por outros pesquisadores (Hungria et al., 2000; Oliveira et al., 2004).

TABELA 2 Valores médios de número de nódulos (N° N), matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA), teor de nitrogênio (%N), acúmulo de nitrogênio (ACM N) e eficiência relativa (ER), nos diferentes sistemas de uso da terra (SUT), na Amazônia Ocidental

SUT	**N° N**	**MSN**	**MSPA**	**%N**	**ACM N**	**ER**
Unidade	**uni**	**mg**	**mg**	**%**	**mg**	**%**
AF[1]	83,10 b	21,60 b	975 c	1,36 b	1,56 d	36,90 c
CN[2]	45,07 b	29,42 b	895 c	1,33 b	1,28 d	33,84 c
CV[3]	80,70 b	29,73 b	780 c	1,63 b	1,37 d	29,46 c
FP[4]	5,94 b	4,00 b	663 c	1,34 b	0,89 d	25,08 c
P[5]	78,33 b	47,79 b	1095 c	1,87 a	2,44 c	41,38 c
AG[6]	38,37 b	16,57 b	755 c	1,41 b	1,16 d	28,63 c
T02100[7]	238,67 a	86,67 a	2637 b	2,57 a	6,63 b	99,67 b
T899[8]	337,00 a	130,33 a	1907 b	2,17 a	3,95 c	72,00 b
Tabsol[9]	0,00 b	0,00 b	640 c	0,67 b	0,40 d	24,33 c
Tnitro[10]	0,00 b	0,00 b	7300 a	1,60 b	11,65 a	276,67 a
MÉDIA[11]	52,70	25,50	941	1,47	1,55	35,60
CV[12] (%)	130,06*	138,35*	71,75*	47,48*	120,82*	71,85*

AF[1] agrofloresta; CN[2] capoeira nova; CV[3] capoeira velha; FP[4] floresta primária; P[5] pastagem; AG[6] agricultura; T02100[7] testemunha inoculada com estirpe UFLA02100; T899[8] testemunha inoculada com estirpe CIAT899; Tabsol[9] testemunha absoluta; Tnitro[10] testemunha com nitrogênio; MÉDIA[11] média geral; CV[12] coeficiente de variação pela ANAVA. Letras diferentes na coluna diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p<0,05$), * Significância estatística análise de variância ($\alpha = 0,01$).

2.3.2 Porcentagem de vasos de Leonard nodulados para cada SUT

Dos 98 pontos amostrados, 41 não apresentaram nodulação em nenhuma de suas unidades amostrais, sendo encontrada uma porcentagem de nodulação geral de 58% de unidades amostrais noduladas. Dentre os sistemas de uso da terra, a floresta primária a capoeira nova e a agricultura foram os que apresentaram menor porcentagem de unidades amostrais noduladas. Os resultados da floresta primária corroboram os encontrados por outros

pesquisadores (Jordan, 1989; Snedaker, 1980; Sprent, 1987; Thielen-Klinge, 1997). A floresta primária é considerada um sistema em estado de equilíbrio, em que a entrada e a saída de nutrientes é mínima. Assim, devido ao alto custo energético da mantença da simbiose (Burris & Roberts, 1993; Lynch & Whipps, 1990) e à disponibilidade de nitrogênio no sistema, ocorre a diminuição da nodulação (Chalk, 2000) e a conseqüente diminuição da população de BNL (Figura 2).

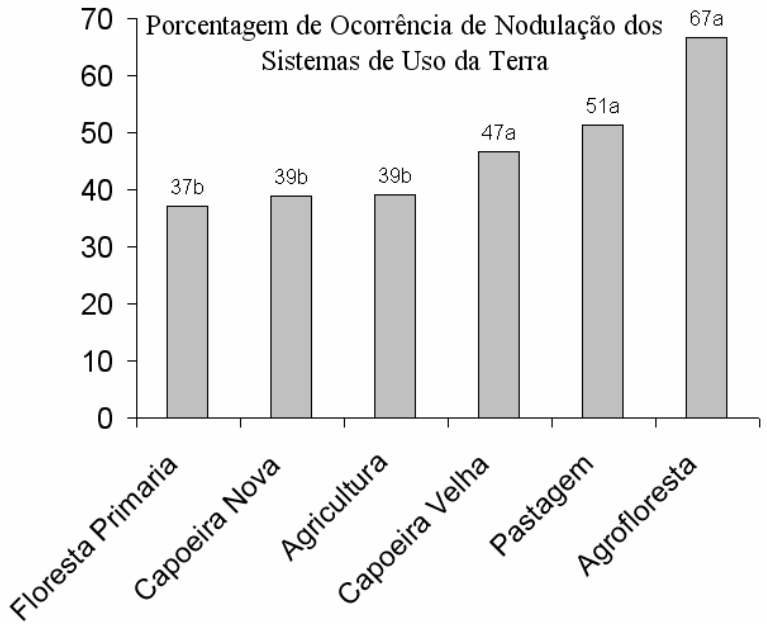


FIGURA 2 Porcentagem de unidades amostrais que apresentaram nódulos nos diferentes sistemas de uso da terra de um total de 90 unidades amostrais na capoeira nova; 30, na capoeira velha; 51, na floresta primária; 39, em pastagem; 54, na agricultura e 30, na agrofloresta.

Os sistemas agrofloresta, pastagem e capoeira velha foram os que obtiveram maior porcentagem de unidades amostrais noduladas. Estes resultados demonstram que estes sistemas, provavelmente, apresentam populações de BNL

maiores e mais ativas. Gorham et al. (1979) e Thielen-Klinge (1997), citados por Gehring (2003), postularam um máximo da fixação biológica de nitrogênio na sucessão 'inicial' ou 'média', em conseqüência de uma alta demanda por nitrogênio, acompanhada por uma disponibilidade elevada de luz e fósforo como as mais importantes limitações.

Verificou-se também alta porcentagem de nodulação no sistema pastagem. Isso, provavelmente, está relacionado ao melhor ambiente promovido pelo sistema radicular das gramíneas que, devido à constante regeneração, mantém uma rizosfera mais rica em nutriente e, conseqüentemente, mais propícia à mantença da população de FBN em estado saprofítico.

2.3.3 Análise multivariada dos dados

Constatou-se diferença significativa entre os tratamentos. Os valores de coeficiente parcial de correlação residual, para as correlações que apresentaram significância com as variáveis das plantas. são apresentados na Tabela 3. As variáveis número de nódulos (N° N), matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA), teor de nitrogênio (%N) e acúmulo de nitrogênio (ACM N) se correlacionaram entre si positivamente. A variável N° N correlacionou-se positivamente com os teores de manganês (Mn) e enxofre (S). A variável MSN apresentou correlação negativa com CTC a pH natural do solo (t) e positiva com teor de ferro (Fe). O teor de nitrogênio na parte aérea não se correlacionou com nenhum atributo edáfico (Tabela 3).

TABELA 3 Valores de coeficiente parcial de correlação residual e significância, das variáveis de planta: número de nódulos (N° N), matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA), teor de nitrogênio (%N), acúmulo de nitrogênio (ACM N) e atributos edáficos: CTC no pH natural (t), ferro (Fe), manganês (Mn), cobre (Cu), boro (B), enxofre (S) e as variáveis de planta, para as diferentes localidades de amostragem na Amazônia Ocidental.

Variáveis	N° N	MSN	MSPA	%N	ACM N
T	-0,08^{ns}	-0,20*	-0,13^{ns}	0,06^{ns}	-0,10^{ns}
Fe	0,07^{ns}	0,27**	0,34**	0,03^{ns}	0,39**
Mn	0,22*	0,15^{ns}	0,07^{ns}	0,10^{ns}	0,06^{ns}
Cu	-0,02^{ns}	0,01^{ns}	0,08^{ns}	-0,14^{ns}	0,00^{ns}
B	0,13^{ns}	0,20^{ns}	0,28**	0,17^{ns}	0,34**
S	0,36**	0,12^{ns}	0,24*	0,10^{ns}	0,16^{ns}
NN	1,00	0,79**	0,65**	0,29**	0,56**
PNMG	0,79**	1,00	0,81**	0,27**	0,72**
PMSG	0,65**	0,81**	1,00	0,35**	0,88**
TN	0,29**	0,27**	0,35**	1,00	0,64**
ANMG	0,56**	0,72**	0,88**	0,64**	1,00

* significativo, com probabilidade de erro menor que 5%
** significativo, com probabilidade de erro menor que 1%.
^{ns} não significativo

Diversos estudos verificaram que maiores teores de cálcio no solo aumentaram a nodulação (Andrade et al., 2002; Jesus, 2005; Philip et al., 1995; Poolpipatana & Hue, 1994; Reid, 1996) e que altos teores de alumínio e valores baixos de pH são prejudiciais à nodulação (Andrade et al., 2002; Grewal & Williams, 2003). Mas, esses resultados não puderam ser confirmados no presente estudo, já que as correlações com teores de cálcio e alumínio e valores de pH não foram significativas. Os resultados relativos ao pH e aos teores de alumínio encontrados podem ser esclarecidos por estudos realizados em alguns solos da Amazônia com altos teores de alumínio extraível, os quais verificaram que as plantas não apresentavam sintomas de toxidez, nem queda de

produtividade (Gamma & Kiehl, 1999). Nestes solos, o teor de alumínio extraível encontrado não tem correlação com o alumínio disponível na solução do solo (Marques et al., 2002; Scrocht et al., 2000).

Vincent (1980) relata que o boro tem papel estável no sistema vascular, que permite um transporte de duas vias entre o nódulo e a planta. Cakmak & Römheld (1997) afirmam que a atividade da nitrogenase é sensível à deficiência de boro e o seu papel relaciona-se à manutenção dessa atividade. Verificou-se correlação positiva entre o teor de boro (B) e ferro (Fe), e as variáveis MSPA e ACM N.

Na Tabela 4 são apresentados os dados das avaliações de contrastes dos diversos sistemas de uso da terra pelas variáveis das plantas.

Na variável %N, ocorreu contraste significativo unicamente para AG "versus" P. Para as variáveis MSPA e ACM N, não ocorreu contraste significativo. Na variável N° ISO e MSN ocorreu contraste significativo para FP "versus" os demais. Este resultado confirma o que foi apresentado anteriormente, em que a porcentagem de unidades amostrais noduladas foi menor para o SUT floresta primária.

Estes resultados, possivelmente, devem-se à baixa densidade de populações de BNL em áreas de floresta primária Nessas condições, coexistem com a grande diversidade de outros microrganismos edáficos (Borneman & Triplett, 1997), diminuindo o tamanho de sua população. Alem disso o baixa requerimento por N, torna a simbiose desnecessária e de elevado custo para o hospedeiro, levando ao desestímulo da mesma, que pode condicionar as BNL a se adaptarem às condições saprofíticas. (Moreira & Franco, 1994). Resultados semelhantes, em florestas clímax na Amazônia, já foram encontrados por Bonetti et al. (1984), Jesus et al. (2005), Magalhães et al. (1982), Moreira et al. (1992) e Nóbrega (2006).

TABELA 04 Contrastes entre floresta primária (FP), agricultura (AG), pastagem (P), agrofloresta (AF), Capoeira nova e velha (CN e CV) das variáveis: número de nódulos (N° N), matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA), teor de nitrogênio (%N) acúmulo de nitrogênio (ACM N) estimador (EST), erro padrão (Erro), t calculado e probabilidade do t calculado.

N° N	**EST**	**Erro**	**t**	**Pr > |t|**
FP vs demais	-299,08	112,16	-2,67	0,01**
AG e P vs FP e CN e CV	185,76	126,82	1,46	0,15^{ns}
AG vs P	12,00	34,81	0,34	0,73^{ns}
AF vs CV e CN	-57,06	49,35	-1,16	0,25^{ns}
CV vs CN	35,63	30,22	1,18	0,24^{ns}
MSN	**EST**	**Erro**	**t**	**Pr > |t|**
FP vs demais	-126,15	60,14	-2,10	0,04*
AG e P vs FP e CN e CV	66,18	68,00	0,97	0,33^{ns}
AG vs P	-23,89	18,67	-1,28	0,20^{ns}
AF vs CV e CN	-28,56	26,46	-1,08	0,28^{ns}
CV vs CN	0,31	16,20	0,02	0,98^{ns}
MSPA	**EST**	**Erro**	**t**	**Pr > |t|**
FP vs demais	-1,18	0,74	-1,59	0,12^{ns}
AG e P vs FP e CN e CV	1,27	0,84	1,52	0,13^{ns}
AG vs P	-0,14	0,23	-0,61	0,55^{ns}
AF vs CV e CN	-0,14	0,33	-0,43	0,67^{ns}
CV vs CN	-0,11	0,20	-0,58	0,57^{ns}
%N	**EST**	**Erro**	**t**	**Pr > |t|**
FP vs demais	-0,92	0,76	-1,21	0,23^{ns}
AG e P vs FP e CN e CV	0,85	0,86	0,99	0,32^{ns}
AG vs P	-0,53	0,23	-2,26	0,03*
AF vs CV e CN	-0,11	0,33	-0,34	0,73^{ns}
CV vs CN	0,30	0,20	1,47	0,14^{ns}
ACM N	**EST**	**Erro**	**t**	**Pr > |t|**
FP vs demais	-3,34	2,10	-1,59	0,12^{ns}
AG e P vs FP e CN e CV	4,25	2,38	1,79	0,08^{ns}
AG vs P	-0,91	0,65	-1,40	0,17^{ns}
AF vs CV e CN	-0,30	0,92	-0,32	0,75^{ns}
CV vs CN	0,09	0,57	0,15	0,88^{ns}

ns - teste não significativo, * e ** teste significativo, a 5% e a 1% de significância, respectivamente.

Para a análise conjunta das variáveis dos diversos SUTs estudados, realizou-se uma análise de variáveis canônicas principais, todas as variáveis

estudadas (crescimento e nodulação de plantas e atributos edáficos) e duas adicionais, uma com variáveis de crescimento e nodulação de plantas e outra com variáveis de atributos edáficos. Na análise principal, as duas primeiras variáveis canônicas apresentaram correlação de 0,914 e 0,786 com a variação geral dos dados, respondendo por 57,14% e 18,15% desta variação respectivamente. Os coeficientes canônicos padronizados das variáveis relativas a crescimento e nodulação de plantas encontram-se na Tabela 5 e expressam o quanto cada variável contribui na variação da variável canônica. Verifica-se que a variável acúmulo de nitrogênio (ACM N) foi a que mais influenciou na variável canônica 1 (C1) e que o número de nódulos (N° N) foi o que mais influenciou a variável 2 (C2).

TABELA 5 Coeficiente canônico padronizados entre as variáveis canônicas independentes C1 e C2 da análise principal com as variáveis: número de nódulos (N° N), matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA), teor de nitrogênio (%N) e acúmulo de nitrogênio (ACM N)

Variável	**C1**	**C2**
N° N	-0,209458	-0,893809
MSN	0,125204	0,283976
MSPA	-0,618740	0,093068
%N	-0,513737	0,312066
ACM N	1,009750	0,039816

Com a intenção de identificar sistemas de uso da terra com comportamentos distintos ou iguais aos demais, elaboraram-se três diagramas de ordenação dos sistemas de uso da terra pelos valores individuais das duas variáveis canônicas. No primeiro diagrama (Planta + Solo), utilizaram-se todos os valores das variáveis relativas ao crescimento e à nodulação de plantas e os atributos edáficos; no segundo (Planta), somente variáveis relativas ao crescimento e à nodulação de plantas e, no terceiro (Solo), atributos edáficos (Figura 3).

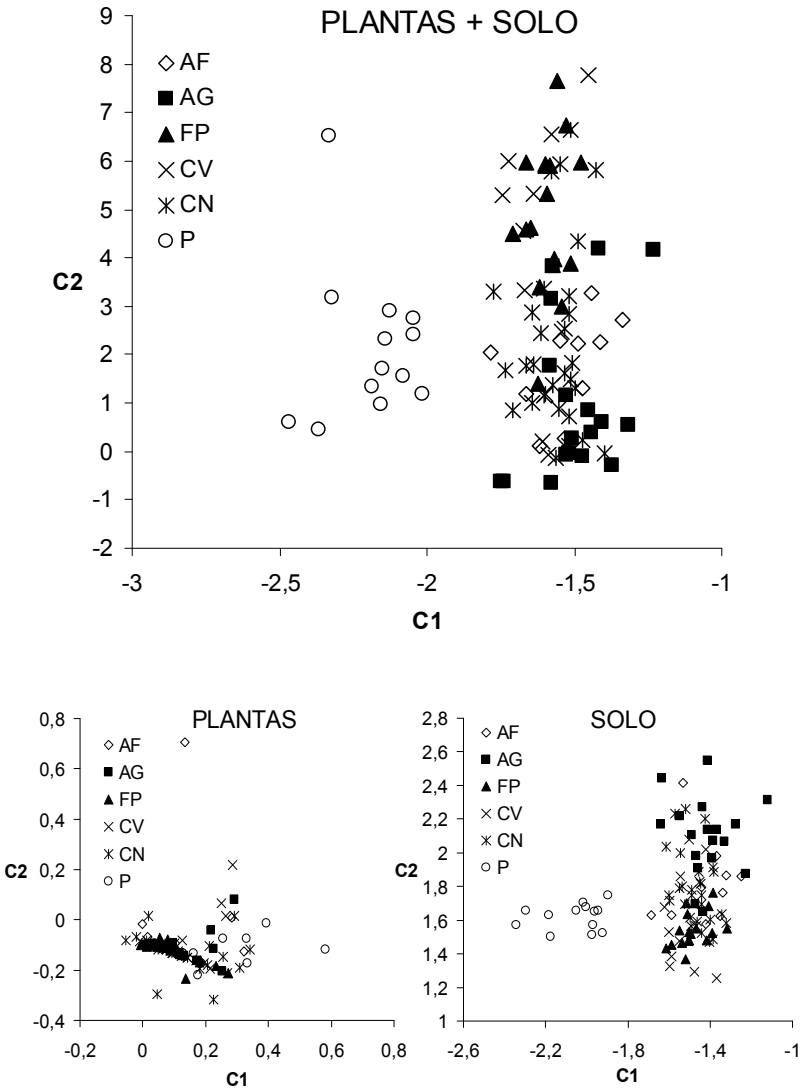


FIGURA 3 Diagramas de ordenação das variáveis canônicas independentes (C1 e C2) dos diferentes sistemas de uso da terra avaliados: agrofloresta (AF); agricultura (AG); floresta primária (FP); capoeira velha (CV); capoeira nova (CN) e pastagem (P). Acima, ordenação com todas as variáveis (crescimento e nodulação de plantas e atributos edáficos); abaixo, à esquerda, ordenação somente de variáveis relativas a crescimento e nodulação de plantas e abaixo à direita, ordenação por variáveis de atributos edáficos.

O SUT pastagem (P) se diferenciou dos demais SUT no diagrama Planta + Solo. Pela análise dos diagramas Planta e Solo, pode-se concluir que a diferença encontrada, no primeiro diagrama, do SUT pastagem, provavelmente, está relacionada a diferenças entre atributos edáficos, pois, no diagrama Planta, todos os SUT apresentaram comportamento semelhante.

2.3.4 Correlação canônica entre atributos edáficos e variáveis relacionadas ao crescimento e à nodulação das plantas

Com a intenção de avaliar as correlações existentes entre as variáveis avaliados e os atributos edáficos, realizou-se uma análise de correlação canônica.

Segundo o teste de hipóteses, apenas o primeiro par canônico apresenta significância a 1 %. Este par canônico (V1W1) responde por 74,35% das variações das variáveis estudadas.

Nas Tabelas 9 e 10 são apresentadas as correlações encontradas para os variáveis avaliadas de crescimento e nodulação e os atributos do solo com as suas variáveis canônicas.

Para as variáveis avaliadas de crescimento e nodulação e suas variáveis canônicas, a maior correlação encontrada foi para acúmulo de nitrogênio (ACM N), com 61% de correlação com a variável canônica relativa a crescimento e nodulação de plantas V1, significando que a variável ACM N é responsável por grande parcela das variações encontradas na variável canônica V1 (Tabela 6).

Para os atributos do solo e suas variáveis canônicas, o que apresentou maior correlação foi o teor de ferro (Fe), com 71%, com a variável canônica W1 (Tabela 7).

TABELA 6 Correlação das variáveis canônicas relacionadas às variáveis de crescimento e nodulação das plantas de feijão (número de nódulos (N° N), matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA), teor de nitrogênio (%N) e acúmulo de nitrogênio (ACM N) com as mesmas variáveis.

Variáveis	V1	V2	V3	V4	V5
N° N	-0,16	0,80	0,29	-0,08	0,49
MSN	0,30	0,61	-0,04	0,03	0,73
MSPA	0,47	0,68	0,17	0,42	0,33
%N	0,12	-0,17	0,80	0,28	0,49
ACM N	0,61	0,44	0,50	0,20	0,38

TABELA 7 Correlação das variáveis canônicas relacionadas às variáveis dos atributos edáficos com as mesmas variáveis.

Atributos	W1	W2	W3	W4	W5
pH	0,04	-0,21	0,23	0,36	-0,01
P	-0,25	0,17	0,42	-0,39	-0,17
K	-0,06	-0,55	0,27	0,16	-0,19
Ca	-0,12	-0,06	0,37	0,33	-0,09
Mg	-0,16	-0,21	0,33	0,14	-0,23
Al	-0,04	0,02	-0,21	-0,37	-0,29
Hal	-0,07	0,04	-0,21	-0,35	-0,26
SB	-0,14	-0,12	0,40	0,30	-0,13
t	-0,19	-0,12	0,32	0,08	-0,36
CTC	-0,15	-0,04	-0,04	-0,26	-0,34
V	-0,09	-0,04	0,31	0,35	0,05
m	0,03	0,11	-0,26	-0,42	-0,21
MO	0,09	0,22	0,00	0,04	-0,09
P rem	0,10	0,06	0,11	0,35	0,13
Zn	0,06	-0,17	0,27	-0,26	-0,14
Fe	0,71	0,25	0,03	-0,20	0,03
Mn	-0,18	0,16	0,14	-0,07	0,44
Cu	0,06	0,16	-0,26	0,23	-0,28
B	0,38	0,20	0,37	0,07	0,10
S	-0,28	0,54	0,48	0,33	-0,16
areia	0,28	0,08	0,02	0,17	0,18
argila	-0,08	-0,21	0,12	-0,01	-0,06

Nas Tabelas 8 e 9 são apresentadas as correlações cruzadas entre as variáveis avaliadas de crescimento e nodulação das plantas de feijão com as variáveis canônicas relativas aos atributos do solo e as correlações dos atributos do solo com as variáveis canônicas relativas às variáveis avaliadas de crescimento e nodulação.

Verifica-se que a maior correlação entre a variável canônica relativa a atributos edáficos (W1) e as variáveis relativas a crescimento e nodulação de plantas encontrada foi para a variável acúmulo de nitrogênio (ACM N), com um valor de 46% (Tabela 8).

TABELA 8 Correlação das variáveis canônicas relacionadas às variáveis dos atributos edáficos com as variáveis de crescimento e nodulação das plantas de feijão.

Variáveis	W1	W2	W3	W4	W5
N° N	-0,12	0,57	0,13	-0,04	0,20
MSN	0,22	0,43	-0,02	0,01	0,29
MSPA	0,35	0,48	0,08	0,18	0,13
%N	0,09	-0,12	0,37	0,12	0,20
ACM N	0,46	0,31	0,23	0,09	0,15

Para a correlação entre variáveis canônicas relacionadas às variáveis de crescimento e nodulação das plantas de feijão com as variáveis dos atributos edáficos, a variável que apresentou maior correlação entre os atributos edáficos foi o teor de ferro (Fe), com 53% de correlação (Tabela12)

O ferro é um micronutriente chave para os seres vivos, pois está envolvido em diversas reações de oxirredução, sendo necessário para a síntese de clorofila e para a divisão celular, sendo um nutriente imóvel em plantas. Nos diazotróficos, é componente da leghemoglobina (proteína que conduz oxigênio) e da nitrogenase (enzima encarregada da "quebra" do N_2). Os estados de oxidação dos compostos do ferro variam de II a VI; os mais comuns são os

estados II e III. Em solos, os mais encontrados estão na forma de III, forma oxidada de baixa solubilidade em água. Esta forma é indisponível aos seres vivos. Assim, maiores teores de ferro podem aumentar a disponibilidade do elemento aos seres vivos, contribuindo para o estabelecimento da simbiose.

TABELA 09 Correlação das variáveis canônicas relacionadas às variáveis de crescimento e nodulação das plantas de feijão com as variáveis dos atributos edáficos.

Atributos	V1	V2	V3	V4	V5
pH	0,03	-0,15	0,11	0,15	0,00
P	-0,18	0,12	0,19	-0,17	-0,07
K	-0,05	-0,39	0,13	0,07	-0,08
Ca	-0,09	-0,04	0,17	0,14	-0,04
Mg	-0,12	-0,15	0,15	0,06	-0,09
Al	-0,03	0,02	-0,10	-0,16	-0,12
HAl	-0,05	0,03	-0,10	-0,15	-0,10
SB	-0,10	-0,08	0,19	0,13	-0,05
t	-0,14	-0,09	0,15	0,03	-0,14
CTC	-0,11	-0,03	-0,02	-0,11	-0,14
V	-0,07	-0,03	0,14	0,15	0,02
m	0,03	0,08	-0,12	-0,18	-0,08
MO	0,07	0,15	0,00	0,02	-0,04
PRE	0,08	0,04	0,05	0,15	0,05
Zn	0,05	-0,12	0,13	-0,11	-0,05
Fe	0,53	0,18	0,02	-0,08	0,01
Mn	-0,13	0,11	0,07	-0,03	0,18
Cu	0,05	0,11	-0,12	0,10	-0,11
B	0,28	0,14	0,17	0,03	0,04
S	-0,21	0,38	0,22	0,14	-0,06
areia	0,21	0,06	0,01	0,07	0,07
argila	-0,06	-0,15	0,06	-0,01	-0,03

2.4 CONCLUSÕES

Existem populações de bactéria fixadoras de nitrogênio, que nodulam feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), presentes em solos sob diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental.

O feijoeiro capturou bactérias que formam nódulo em 58% das unidades amostrais. As menores porcentagens de unidades amostrais noduladas foram encontradas nos sistemas de uso da terra floresta primária, capoeira nova e agricultura e as maiores nos sistemas de uso da terra agrofloresta, pastagem e capoeira velha.

As populações nativas de bactérias que formam nódulo com o feijoeiro dos diversos sistemas de uso da terra, aqui estudadas, apresentaram-se ineficientes.

A população de bactérias que nodulam leguminosas do sistema de uso da terra pastagem foi a que possibilitou maior acúmulo de nitrogênio em associação com o feijoeiro, dentre todas as populações dos sistemas de uso da terra analisadas.

O único sistema de uso da terra que se diferenciou dos demais pelas análises de variáveis canônicas foi o pastagem, provavelmente, devido à diferença entre seus atributos edáficos.

As variáveis que apresentaram maior correlação com as variações ocorridas no experimento foram, para variáveis relativas à nodulação e ao crescimento do feijoeiro, o acúmulo de nitrogênio e, para atributos edáficos, o teor de ferro do solo.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, D. S.; MURPHY, P. J.; GILLER, K. E. Effects of liming and legume/cereal cropping on populations of indigenous rhizobia in an acid Brasilian Oxisol. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 34, n. 4, p. 477-485, Apr. 2002.

ANDRIOLO, J.; PEREIRA, P. A. A.; HENSON, R. A. Variabilidade entre linhas de formas silvestres quanto a características relacionadas com a fixação biológica de N2. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 6, p. 831-837, jun. 1994.

BERG, R. K.; LOYNACHAN, T. E.; ZABLOTOWICZ, R. M.; LIEBERMAN, M. T. Nodule occupancy by introduced *Bradyrhizobium japonicum* in Iowa soils. **Agronomy Journal**, Madison, v. 80, n. 6, p. 876-881, Nov./Dec. 1988.

BONETTI, R.; OLIVEIRA, L. A.; MOREIRA, F. M. S. População de *Rhizobium* spp e ocorrência de micorriza VA em cultivos de essências florestais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 2, p. 137-142, Fev. 1984.

BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E. W. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: Evidence for unusual microorganisms and microbial populations shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 7, p. 2647-2653, July 1997.

BRASIL. Departamento Nacional de Produção Mineral. **Projeto RADAMBRASIL. Folha SB. 19 – Juruá:** geologia, geomorfologia, pedologia, vegetação e uso potencial da terra. Rio de Janeiro, 1977. 436 p (Levantamento de Recursos Minerais, 15).

BURRIS, R. H.; ROBERTS, G. P. Biological nitrogen fixation. **Annual Review Nutrition**, Palo Alto, v. 13, p. 317-35, 1993.

CAKMAK, I.; RÖMHELD, V. Boron deficiency-induced impairments of cellular functions in plants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 193, n. 1/2, p. 71-83, June 1997.

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (Cali, Colômbia). **Sistemas de producción de fríjol**. Cali, 1975. 64 p.

CASSMAN, K. G.; DOBERMANN, A.; WALTERS, D. Agroeco-systems, nitrogen-use efficiency, and nitrogen management. **Ambio**, Stockholm, v. 31, n. 2, p. 132-140, Mar. 2002.

CHALK, P. M. Integrated effects of mineral nutrition on legume performance. **Soil Biology Biochemistry**, v. 32, n. 4, p. 577-579, Apr. 2000.

CONAB. **Avaliação da Safra Agrícola 2006/2007** – Primeiro Levantamento – Outubro/2006. 21p. http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/ 1safragraos 2006_07.pdf.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4. 0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos, SP. **Programas e Resumos...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 235.

FIDALGO, E. C. C. **Levantamento do uso e cobertura da terra de seis áreas amostrais relacionadas aoprojeto BiosBrasil (Conservation and Sustainable Management of Below-GroundBiodiversith: Phase I), município de Benjamim Constant (AM)** [recurso eletrônico] -- Dados eletrônicos. -- Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2005.

FRANCO, M. C. **Capacidade de nodulação de feijões (*Phaseolus vulgaris* L.) silvestres e domesticados**, 1993. 86 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

GAMA, J. R. N.; KIEHL, J. C. Influência do alumínio de um podzólico vermelho-amarelo do Acre sobre o crescimento as plantas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo,** Viçosa, v. 23, n. 2, p. 475-482, abr./jun. 1999.

GEHRING, G. O **Papel da Fixação Biológica de Nitrogênio em Floresta Secundária e Primária da Amazônia Central.** 2003. 30 p. Tese (Doutorado) (versão curta), Faculdade de Agronomía Rheinische Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn, Alemanha,

GORHAM, E.; VITOUSEK, P. M.; REINERS, W. A. The regulation of chemical budgets over the course of terrestrial ecosystem succession. **Annual Review Ecology Systematic**, Palo Alto, v. 10, p. 53-84, 1979.

GREWAL, H. S.; WILLIAMS, R. Liming and Cultivars Affect Root Growth, Nodulation, Leaf to Stem Ratio, Herbage Yield, and Elemental Composition of

Alfalfa on an Acid Soil. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 26, n. 8, p. 1683-1696, 2003.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CHUEIRE, L. M. O.; PROBANZA, A. GUTTIERREZ-MANERO, F. J.; MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 32, n. 11/12, p. 1515-1528, Oct. 2000.

JESUS, E. C.; MOREIRA, F. M. S.; FLORENTINO, L. A.; RODRIGUES, M. I. D.; OLIVEIRA, M. S. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 8, p. 769-776, ago. 2005.

JORDAN, C. F. **An Amazonian rain forest - the structure and function of a nutrient stressed ecosystem and the impact of slash-and-burn agriculture**. Park Ridge, NJ: UNESCO, MAB Series, 1989.

KEYSER, H. H.; WEBER, D. F.; URATSU, S. L. *Rhizobium japonicum* Serogroup and Hydrogenase Phenotype Distribution in 12 States. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 47, n. 4, p. 613-615, 1984.

KIPE-NOLT, J. A.; MONTEALEGRE, M. C. M.; THOME, J. Restriction of nodulation by the broad hostrange of *Rhizobium tropici* strain CIAT 899 in wild accessions of *Phaseolus vulgaris* L. **New Phytologist**, New York, v. 120, n. 4, p. 489-494, Apr. 1992.

LYNCH, J. M.; WHIPPS, J. M. Substrate flow in the rhizosphere. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 129, n. 1, p. 1-10 Dec. 1990.

MAGALHÃES, F. M. S.; OLIVEIRA, L. A.; DOBEREINER, J. Ocorrência de nodulação em leguminosas florestais nativas da região de Manaus-AM. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 12, n. 3, p. 509-514, set. 1982.

MARQUES, J.J.; TEIXEIRA, W.G.; SCHULZE, D.G.; CURI, N. Mineralogy of soils with unusually high exchangeable Al from the western Amazon Region. Clay Minerals, v.37, p.651-661, 2002.

MOREIRA, F. M. S.; HUISING, J. Methodology for the inventory of Nitrogen-fixing Leguminosae nodulating bacteria. In: **Conservation and sustainable management of below-ground biodiversity:** Annual Meeting Report 04 Embu, Kenya, 2004

MOREIRA, F. M. S.; LIMA, A. S.; ACIOLI, A.; MOINO JÚNIOR, A.; TREGUE, A. P.; BARBERI, A.; DELABIE, J.; MARTINS, A. L. U.; GRIPPA, C. R.; SILVA FILHO, D. F. da; JESUS, E. C.; ANDRADE, E. P.; FIDALGO, E. C. C.; ARAÚJO, F. O.; VILLANI, F. T.; MACHADO, F. M.; RIBEIRO, F. V.; RIBEIRO, G.; SILVA, G. A.; SCHIFFLER, G.; PEREIRA, H.; NODA, H.; SANTOS, H. G. dos; AMARAL, I. L. do; HUISING, J.; SIQUEIRA, J. O.; . MORAIS, J. W.; PEREIRA, J. P.; VIDAL, J. O.; LOUZADA, J.; CARES, J.; UGUEN, K.; SILVA, K. da; FLORENTINO, L. A.; ABREU, L. M. de; PFENNING, L. H.; OLIVEIRA, M. S. de; GOMIDE, M.; BREFFIN, M. L. M. S.; RODRIGUES, M. I. D.; COELHO, M. R.; SILVA, M. A.; SANTOS, M. S.; SILVA, N. M. da; DIAS, N.; NÓBREGA, R. S. A.; CONSTANTINO, R.; CAVALCANTI, R. S.; LEAL, P. L.; FERREIRA, P. A.; SILVA, P. H.; ZANETTI, R.; TAPIA-CORAL, S. C.; STÜRNER, S. L.; ALFAIA, S. S.; ANDALÓ, V. Biodiversidade de ecossistemas naturais: Projeto Conservação e Manejo da Biodiversidade do Solo – Bios Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 30., 2005, Recife. **Anais...** Recife: SBCS: Embrapa Solos - UEP Recife: UFRPE, 2005. Seção Palestras. 1CD-ROM.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, MF; FARIA, S. M. Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon region of Brazil. **New Phytologist**, Cambridge, v. 121, n. 4, p. 563-570, Aug. 1992.

MOREIRA, F. M. S; FRANCO, A. A. Rhizobia – Host interactions in tropical ecosystems in Brazil. In: SPRENT, J. I.; D. Mc KEY (Ed.). **Advances in legume systematic 5:** The nitrogen factor, 1994. p. 63-74.

NÓBREGA, R. S. A. **Efeito de sistemas de uso da terra na Amazônia sobre atributos do solo, ocorrência, eficiência e diversidade de bactérias que nodulam caupi [Vigna unguiculata (L.) Walp].** Lavras : UFLA, 2006.

OLIVEIRA, M. A. S.; TEIXEIRA, E. C. Política de estabilização de renda para a agricultura familiar: uma análise de risco. **RER**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 1, p. 000-000, jan./mar. 2005.

OLIVERA, M.; TEJERA, N.; IRIBARNE, C.; OCAÑA, A.; LLUCH, C. Growth, nitrogen fixation and ammonium assimilation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): effect of phosphorus. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 121, n. 3, p. 498-505, July 2004.

PEOPLES, M. B.; FRENEY, J. R.; MOSIER, A. R. Minimizing gaseous losses of nitrogen. In: BACON, P. E. (Ed.). **Nitrogen Fertilization in the Environment**. New York: Marcel Dekker, 1995a. p. 565–602.

PEOPLES, M. B.; HERRIDGE, D. F.; LADHA, J. K. Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 174, n. 1/2, p. 3-28, July 1995b.

PHILIP, A.; JOSEPH, M.; PUNNOOSE, K. I.; *et al*. Effects of liming on nutrient uptake, biomass production and nodulation in *Pueraria phaseoloides*. **Indian Journal of Natural Rubber Research**, Kerala, v. 8, p. 130-134, 1995.

POOLPIPATANA, S.; HUE, N. V. Differential acidity tolerance of tropical legumes grown for green manure in acid sulfate soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 163, n. 1, p. 31-139, June 1994.

RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. de F. B.; CARNEIRO, J. E. de S.; GONÇALVES, F. M. A.; SANTOS, J. B. dos; DEL PELOSO, M. J.; FARIA, L. C. de; CARNEIRO, G. E. de S.; PEREIRA FILHO, I. A. **O 'Talismã' de sua lavoura de feijoeiro**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2002. 4 p. (Embrapa Arroz e Feijão. Comunicado Técnico, 36).

REID, W. S. Influence of lime and calcium:magnesium ratio on alfalfa and birdsfoot trifoil yields. **Communications in Soil Science and Plant Analysis,** New York, v. 27, n. 5-8, p. 1885-1900, 1996.

SARRUGE, J. R.; HAAG, H. P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: Esalq; USP, 1979. 27 p.

SCROCHT, G.; SEIXAS, R.; SILVA, L. F. da; TEIXEIRA, W. G.; ZECH, W. Nutrient concentrations and acidity in ferralic soil under perennial cropping, fallow and primary Forest in central Amazônia. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 51, n. 2, p. 219-231, June 2000.

SINGH, S. P.; GEPTS, P.; DEBOUCK, D. G. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). **Economic Botany**, New York, v. 45, n. 3, p. 379-396, July/Sept. 1991.

SNEDAKER, S. C. Successional immobilization of nutrients and biologically mediated recycling in tropical forests. **Biotropica**, St. Louis, v. 12, n. 1, p. 16-22, Mar. 1980.

SOARES, A. L. L.; FERREIRA, P. A. A.; PEREIRA, J. P. A. R.; VALE, H. M. M. do; LIMA, A. S.; ANDRADE, M. J. B.; MOREIRA, F. M. S. Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). II-Feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, n. 5, p. 803-811, set./out. 2006.

SPRENT, J. I. **The ecology of the nitrogen cycle**. Cambridge: Cambridge University Press, 1987.

THIELEN-KLINGE, A. **Rolle der biologischen N2-Fixierung von Baumleguminosen im östlichen Amazonasgebiet, Brasilien**. 1997. Tese (Doutorado) - Institute of Agriculture in the Tropics, Universidade de Göttingen, Alemanha.

VINCENT, J. M. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. In: **International biological programme handbook n. 15**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970.

VINCENT, J. M. Factors controlling the legumes-*rhizobium* symbiosis. In: NEWTON, W. E.; ORME-JOHNSON, E. H. (Ed.). **Nitrogen fixation**. Baltimore: University Park Press, 1980. v. 3, p. 103-129.

CAPÍTULO 3

DIVERSIDADE FENOTÍPICA DE BACTÉRIAS QUE NODULAM FEIJÃO (*Phaseolus vulgaris* L.), EM SOLOS SUBMETIDOS A DIFERENTES SISTEMAS DE USO DA TERRA, NA AMAZÔNIA OCIDENTAL

RESUMO

BARBERI, Alexandre. Diversidade fenotípica de bactérias que nodulam feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos submetidos a diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental. In: _____. **Diversidade e eficiência de bactérias que nodulam feijoeiro de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental.** 2007. Cap. 3, p. 60-86. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.[1]

Os objetivos deste trabalho foram quantificar e avaliar a diversidade fenotípica de bactérias que nodulam leguminosas (BNL) e que podem fixar nitrogênio em simbiose com feijão, em solos submetidos a diferentes sistemas de uso da terra (SUT), na Amazônia Ocidental. Coletaram-se amostras de solo na camada de 0-20 cm, em 98 pontos distribuídos da seguinte forma: 30 pontos amostrados no SUT capoeira nova (CN), 10 na capoeira velha (CV), 17 na floresta primária (FP), 13 em pastagem (P), 18 na agricultura (AG) e 10 em agrofloresta (AF). Em nenhuma das áreas houve introdução de estirpes exóticas, por meio da inoculação. Para a captura de BNL, instalou-se um experimento em vasos de Leonard, onde as plantas-isca de feijoeiro foram inoculadas com suspensões das amostras de solos dos pontos amostrados. No total, foram encontrados 930 isolados sendo 52 isolados oriundos da FP, 64 na CV, 156 na AF, 163 na AG, 224 na P e 271 na CN. Por meio do dendrograma construído com base nas características culturais e analisado a 100% de similaridade obtiveram-se os grupos culturais e procedeu-se a análise de diversidade, que foram agrupados em 40 grupos culturais. Concluiu-se que: existe diferença entre os sistemas de uso da terra quanto à distribuição dos grupos fenotípicos dos isolados. Ocorreu predominância de isolados de crescimento rápido e que acidificam o meio em todos os sistemas de uso da terra. O sistema de uso da terra agrofloresta foi o que apresentou maior número de grupos culturais. A maior diversidade, indicada pelo índice de Shannon e o maior índice de riqueza de Chao2, foi encontrada no sistema de uso da terra capoeira nova e a menor diversidade foi encontrada no sistema de uso da terra floresta primaria.

[1]Orientadora: Fátima Maria de Souza Moreira – UFLA.

ABSTRACT

BARBERI, Alexandre. Phenotypic Diversity of Bacteria that Nodulating Common Bean (Phaseolus vulgaris L.) in Soil Submitted the Different Land Use Systems in the Amazonian Occidental. In: _____. **Diversity and Efficiency of Bacteria Nodulating Common Beans from Different Land Use Systems in the Western Amazon region.** 2007. p. 60-86. Thesis (Doctorate in Soils e Plants Nutrition) – Federal Univesity of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.[1]

The objective of this work was: to quantify and to evaluate the phenotypic diversity of Leguminosae nodulating bacteria (BNL) that can fix nitrogen in symbiosis with common beans from different land use systems (LUS) in the western Amazon region. Soil samples were collected at 0-20 cm depth, in 98 points distributed as following: 30 points in the young secondary forest (CN), 10 in the old secondary forest (CV), 17 in the pristine forest (FP), 13 in pasture (P), 18 in agriculture (AG) and 10 in agroforestry (AF). Exotic strains were never introduced in none of the areas by inoculation. The experiment was carried out in Leonard jars and plants of the trap species were inoculated with soil suspensions from all sampling points. Isolates 930 isolates were obtained, being 52 from FP, 64 from CV, 156 from AF, 163 from AG, 224 from P and 271 from CN. A dendrogram were constructed based on cultural characteristics and 40 groups were obtained at 100% similarity. Differences among LUS were observed regarding the distribution of the phenotypic groups. Fast growing isolates acidifying the medium predominated in all the land use systems. Agroforestry presented the highest number of cultural groups. The highest diversity, indicated by the Shannon and Chao2 indexes, was found in the young secondary forest and the lowest diversity was found in the forest pristine.

[1]Adviser:: Fátima Maria de Souza Moreira – UFLA

3.1 INTRODUÇÃO

A sustentabilidade de um ecossistema é reflexo de sua resiliência (conceito deslocado da física, significando a propriedade de alguns materiais de acumular energia, quando exigidos e estressados, e voltar ao seu estado original, sem qualquer deformação (Ferreira, 1999)). A resiliência expressa a capacidade que tem um ecossistema em manter seus processos ativos (degradação de matéria orgânica, respiração, etc.), mesmo quando é impactado por algum desequilíbrio.

A resiliência está apoiada em dois pilares: a redundância funcional e a biodiversidade. Quanto maior for a biodiversidade, maiores as chances de um ecossistema possuir redundância funcional, contendo espécies que são capazes de substituir funcionalmente espécies importantes. Isso significa que quanto maior o número de espécies, maior será o número de relações fracas entre os componentes do ecossistema, diminuindo a importância relativa de interações fortes que podem desestabilizar o sistema, caso sejam significativamente perturbadas (Mccann, 2000).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) atmosférico é um dos mais importantes processos biológicos para a manutenção da vida na Terra, pois contribui com cerca de 50% do nitrogênio total requerido por sistemas agrícolas e naturais (Galloway & Cowling, 2002).

A FBN somente pode ser realizada por organismos que possuem um complexo sistema enzimático para este fim, e somente um grupo seleto de procariontes o possui: os diazotróficos. Dentro destes grupo, existem organismos de vida livre e simbióticos, como é o caso das bactérias que nodulam leguminosas (BNL).

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) mostra-se bastante promissor em estudos de diversidade de BNL, principalmente com espécies que possuem

crescimento rápido em meio de cultura, devido a sua promiscuidade em estabelecer associação simbiótica com estas espécies.

Atualmente, são descritas diversas espécies de bactérias que formam nódulos com o feijoeiro. Entre elas incluem-se: *Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli* (Jordan, 1984), *Rhizobium tropici* (Martínez-Romero et al., 1991), *Rhizobium etli bv. phaseoli* (Segovia et al., 1993), *Rhizobium gallicum bvs. gallicum e phaseoli* (Amarger et al., 1997), *Rhizobium giardinii bvs. giardinii e phaseoli* (Amarger et al., 1997), *R.(Sinorhizobium) fredii* (Scholla & Elkan, 1984), *Mesorzhizobium loti* (Jordan, 1984) e *Mesorzhibium huahuii* (Chen et al., 1991). No Brasil, três espécies distintas de BNL são de reconhecida importância ecológica como simbiontes do feijoeiro: *R. leguminosarum bv. phaseoli, R. etli e R. tropici* (Straliotto & Rumjanek, 1999).

Características culturais referentes ao tempo de aparecimento das colônias isoladas e quanto à modificação do pH do meio são indicadoras da presença de diferentes gêneros entre os grupos de isolados (Moreira, 1991). *Rhizobium* (Frank, 1889) e *Sinorhizobium* (Chen et al., 1988) são gêneros de crescimento rápido, ou seja, tempo de aparecimento de colônias isolados de 2 a 3 dias. Produzem reação ácida no meio de cultura, mas, em alguns casos, podem não produzir modificação visível do pH. *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1997) tem crescimento de rápido a intermediário, 3 a 5 dias, e pode ter também reação ácida ou não produzir modificação do pH no meio. *Allorhizobium* (de Lajudie et al., 1998) tem crescimento rápido, de 1 a 2 dias. *Azorhizobium* (Dreyfus et al., 1988) tem crescimento de rápido a intermediário, de 3 a 4 dias e produz reação alcalina no meio. *Bradyrhizobium* (Jordan, 1984) é de crescimento lento a muito lento, 6 a mais de 10 dias, e produz reação alcalina no meio. *Burkholderia* (Moulin et al., 2001) tem crescimento rápido e pode tanto ter reação ácida quanto alcalina no meio (Moreira & Siqueira, 2006).

A Floresta Amazônica se mostra altamente dependente dos processos biológicos, já que está estabelecida sobre solos pobres, o que a torna dependente dos processos de ciclagem de nutrientes existentes que ocorrem na região. Assim, o conhecimento da modificação da estrutura das populações de BNL em relação aos sistemas de uso da terra (SUTs) pode fornecer subsídios para o manejo sustentável dos solos, pois estas são indicadoras sensíveis da alteração do manejo dos mesmos (Ballard et al., 2004; Kaschuk, et al., 2006; Melloni et al., 2006). Além disso, pode possibilitar a captura de estirpes que tolerem condições edafo-climáticas adversas.

Este trabalho foi realizado utilizando características fenotípicas de isolados, que é um método rápido, barato e não destrutivo, para avaliar a biodiversidade de isolados de bactérias e faz parte do projeto "Conservation and Sustainable Management of Below-Ground Biodiversity", financiado pelo Global Environment Facility (GEF) e implementado pelo "United Nations Environment Programme (UNEP)", que está sendo executado em sete países: Brasil, Costa do Marfim, Índia, Indonésia, Quênia, México e Uganda. O objetivo é o de despertar a consciência e a compreensão sobre a biodiversidade do solo, importante para a produção agrícola sustentada em áreas tropicais, por meio da demonstração de métodos para a conservação e o manejo sustentado (Projeto GF/2715-02).

Neste contexto, os objetivos específicos deste trabalho foram quantificar e avaliar a diversidade fenotípica de bactérias que nodulam leguminosas e que podem fixar nitrogênio em simbiose com feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), em solos sob diferentes sistemas de uso da terra, na Amazônia Ocidental.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Amostragem do solo, captura e isolamento de bactérias que nodulam leguminosas através de planta isca.

Na primeira quinzena de março de 2004 (período úmido e com maior intensidade pluviométrica), coletaram-se 98 amostras de solo na camada de 0-20 cm, utilizando-se trado de rosca. A caracterização das vegetações das áreas de estudo encontra-se em Fidalgo et al. (2005) e totalizaram 30 pontos amostrados na capoeira nova (CN), floresta secundária em estágio inicial de regeneração com menos de 5 anos de formação, após ter sido área de cultivo; 10 pontos na capoeira velha (CV), floresta secundária em estágio avançado de regeneração com mais de cinco anos de formação, após ter sido área de cultivo; 17 pontos na floresta primária (FP), floresta tropical da sub-região dos baixos platôs da Amazônia (Brasil, 1977); 13 pontos na pastagem (P), área implantada em 1970 com capim-imperial (*Axonopus scoparius*) que, após declínio, aproximadamente onze anos decorridos da implantação, foi substituído por *Brachiaria brizantha, B. humidicola* e grama batatais (*Paspalum notatum flugge*), apresentando atualmente espécies invasoras; 18 na agricultura (AG), áreas de cultivos agrícolas anuais (mandioca, milho, cana-de-açúcar e abacaxi) e semiperenes (banana); e 10 na agrofloresta (AF), formada por regeneração espontânea de espécies florestais secundárias, além do enriquecimento de espécies por meio do plantio de mudas de interesse econômico como cupuaçu, pupunha, banana, abacaxi, café e outras, áreas que foram desflorestadas no período de 1979 a 1983 e cultivadas com banana e mandioca, tendo os sistemas agroflorestais sido formados logo após os primeiros ciclos de cultivo, no período de 1980 a 1984. Em nenhuma das áreas houve introdução de estirpes exóticas por meio da inoculação. A coleta das amostras de solos seguiu normas instituídas pelo projeto, sendo iguais para todos os países envolvidos. Descrição detalhada desta

encontra-se em Moreira & Huising (2004). As análises química e física dos solos encontram-se em Nóbrega (2006), sendo as médias dos valores encontrados apresentadas na Tabela 1.

TABELA 01 Características químicas dos solos amostrados nos diferentes sistemas de uso da terra. (SUTs)

SUT	FP	P	AF	AG	CN	CV
pH	4,5	5,2	4,9	5,4	4,9	4,6
S	7,2	6,0	22,9	5,5	6,9	22,4
P	4,0	2,8	4,5	4,4	3,6	3,8
P-rem	10,2	11,2	14,4	17,9	14,2	11,4
K^+	62,8	40,4	62,8	94,5	76,4	56,1
Ca^{2+}	3,8	2,2	7,3	8,9	6,1	4,0
Mg^{2+}	2,0	1,4	2,1	2,5	2,5	1,7
Al^{3+}	5,7	2,8	2,5	1,7	3,0	5,2
H+Al	22,1	12,8	12,4	8,2	13	19,9
SB	6,0	3,8	9,6	11,7	8,8	5,8
t	11,7	6,6	12,1	13,3	11,9	11,1
T	28,1	16,6	22,0	19,9	21,8	25,7
V %	22,3	24,2	43,9	61,6	43,6	26,9
M %	49,4	42,5	21,4	12,8	25,3	51,9
MO	1,7	1,6	1,8	1,9	1,9	1,7
Zn	6,5	7,7	5,2	7,0	6,7	3,6
Fe	190	471,8	136,7	97,3	157,6	126,2
Mn	70,0	40,5	58,0	70,1	53,9	56,4
Cu	1,5	1,9	2,0	1,4	2,0	1,4
B	0,3	0,1	0,4	0,4	0,2	0,1
Areia %	13,6	28,2	13,6	22,4	22,0	13,2
Silte %	44,1	39,2	47,4	39,8	41,9	47,3
Argila %	42,3	32,6	39,0	37,8	36,1	39,5

Média dos valores para os números de pontos de coleta em cada SUT: 10 pontos na agrofloresta (AF); 18 na agricultura (AG); 17 na floresta primária (FP); 10 na capoeira velha (CV); 30 na capoeira nova (CN) e 13 na pastagem (P). Para os resultados de análises de: pH em água; S: enxofre, em ppm; P: fósforo, em ppm; K: potássio, em ppm; Ca: cálcio, em meq/100cc; Mg: magnésio, em meq/100 cc; Al: alumínio, em meq/100cc; H + Al: hidrogênio + alumínio, em meq/100cc; SB: soma de bases trocáveis, em meq/100cc; t: CTC efetiva, em meq/100cc; T: CTC em pH 7; V: saturação de bases da CTC a pH 7; m: saturação de Al da CTC efetiva, em porcentagem (%); MO: matéria orgânica, em porcentagem (%); P: remanescente em ppm; Zn: zinco, em ppm; Fe: ferro, em ppm; Mn: manganês, em ppm; Cu: cobre, em ppm; B: boro, em ppm (Nóbrega, 2006).

Para a avaliação da ocorrência, eficiência relativa e captura das populações de BNL, conduziu-se, durante o período de agosto a outubro de 2004, por 45 dias, um experimento em casa de vegetação do Laboratório de Microbiologia do Solo/DCS/UFLA, com a utilização do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), como planta isca. Foi utilizada a cultivar Talismã, de grão tipo carioca (Ramalho et al., 2002), e vasos Leonard (Vincent, 1970), inoculados com soluções de solo dos pontos amostrados, em concentração de 10^{-1}, seguindo os métodos padronizados instituídos no projeto para todos os países envolvidos (Moreira & Huising, 2004).

Decorridos 45 dias de crescimento, as plantas foram colhidas e suas raízes lavadas, sendo retirados seus nódulos por destacamento manual. Doze nódulos de cada planta-isca, quando presentes, foram utilizados para o isolamento das BNL, pois ficaria inviável o isolamento de todos os nódulos existentes.

Estes nódulos foram, primeiramente, imersos em álcool etílico 95%, por 30 segundos, com o objetivo de quebrar a tensão superficial e, posteriormente, imersos em H_2O_2, por 1 minuto, para a desinfestação superficial do nódulo e, depois, lavados seis vezes em água esterilizada, para a retirada do H_2O_2. Os nódulos foram, então, esmagados com o auxílio de uma pinça devidamente esterilizada, em placas contendo meio de cultura 79 (Fred & Waksman, 1928) com azul de bromotimol, como indicador de pH. O material interno foi espalhado nas placas em forma de estrias compostas, para a obtenção de colônias isoladas (Vincent, 1970).

Após a purificação dos isolados, estes foram transferidos para tubos com meio sólido 79, armazenados a 4°C, em tubos rosqueáveis de plástico e também em meio líquido, acrescidos de glicerol 20% e armazenados a -80°C.

As características culturais avaliadas para cada isolado foram: taxa de crescimento, medida pelo tempo de aparecimento de colônias isoladas (rápido -

2 a 3 dias; intermediário - 4 a 5 dias; lento - 6 a 10 dias; muito lento>10 dias); diâmetro médio das colônias isoladas; modificação do pH do meio (acidificação, alcalinização e neutralização), conforme Moreira (1991), alterado pela inclusão muito lenta e, ainda, forma do bordo (circular, irregular; inteira, ondulada); elevação do bordo (lente, convexo, plano), superfície (lisa, concêntrica), produção (escassa, pouca, moderada, abundante) e consistência (elástica, gomosa, butírica, aquosa) de muco, absorção de indicador (azul de bromotimol), transmissão de luz (opaco, brilhante, translúcido) e coloração das colônias (branco, creme, amarelo e laranja), conforme Jesus (2004). Com exceção da característica tempo, em dias, para visualização das colônias, as demais foram avaliadas após 5, 8, 12 e 15 dias de aparecimento das colônias isoladas, para os isolados de crescimento rápido, intermediário, lento e muito lento, respectivamente.

Características culturais referentes ao tempo de aparecimento das colônias isoladas e quanto à modificação do pH do meio foram utilizadas como análise preliminar da diversidade de BNL

3.2.2 Análise dos dados

Uma matriz binária dos dados de características culturais de cada isolado foi montada para formar os agrupamentos. Utilizaram-se todas as características culturais avaliadas, tendo, para cada característica, sido atribuído valor 1 ou 0, indicando presença ou ausência da mesma. O dendrograma foi construído pelo método UPGMA (método da média aritmética não ponderada), com a utilização do coeficiente de Jaccard, com o programa estatístico NTSYS, 2002 (Numerical Taxonomic and Multivariate Analysis System, version 2.0, Applied Biostatistics, New York).

Os grupos culturais formados a 100% de similaridade, todas as características idênticas, foram utilizados no cálculo do índice de diversidade de Shannon e na análise de rarefação, com o auxílio do programa EstimateS, versão 7.5 (Colwell, 2006). Por meio dele é possível contabilizar a riqueza de tipos culturais e também estimá-la pelo índice de riqueza Chao 2 (Chao, 1987), dado pela expressão:

$$\text{Chao2} = S + \frac{L^2}{2 \times M}$$

em que S representa o número de tipos culturais observados, L é o número de tipos culturais que ocorrem somente em uma amostra (espécies únicas) e M corresponde ao número de tipos culturais que ocorrem em somente duas amostras. O programa selecionou os isolados ao acaso, de modo a constituir amostras de um até o número total de isolados, tendo os dados sido aleatorizados mil vezes Foram construídas curvas com a variação do índice Chao 2 e de Shannon, em função do número de amostras (esforço de amostragem). O programa também calculou o número de Singletons (grupos com apenas um indivíduo), Doubletons (grupos com apenas dois indivíduos), Uniques (grupos que ocorrem em apenas uma amostra) e Duplicates (grupos que ocorrem em apenas duas amostras) (Colwell & Coddington, 1994). Também realizou-se uma análise de correlação entre o número de isolados por SUT e o número de grupos por SUT, por meio do software Excel.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Isolamento e caracterização cultural de bactérias que nodulam leguminosas

No total, foram encontrados 930 isolados, sendo a distribuição por SUTs apresentada na Figura 1. Os valores apresentados são provenientes dos nódulos totais que foram encontrados em cada SUT, respectivamente: 4056 no SUT capoeira nova (CN); 3055 na pastagem (P); 2493 na agrofloresta (AF); 2421 na capoeira velha (CV); 2072 na agricultura (AG) e 303 na floresta primária (FP).

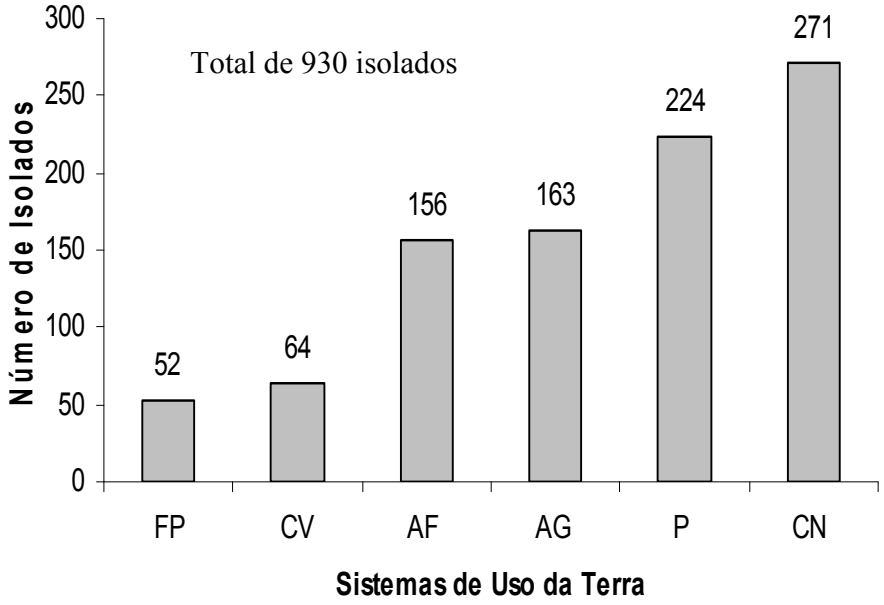


FIGURA 1 Distribuição dos diversos isolados encontrados pelos seguintes sistemas de uso da terra: capoeira nova (CN), capoeira velha (CV), floresta primária (FP), pastagem (P), agricultura (AG) agrofloresta (AF) dos pontos amostrados para sua coleta, na região da Amazônia Ocidental

Dos 930 isolados, apenas um, encontrado no SUT agrofloresta, apresentou crescimento rápido e reação alcalina ao meio. Dois isolados

apresentaram crescimento lento e reação alcalina ao meio e foram encontrados no SUT agricultura. Outros 91 isolados apresentaram crescimento rápido e reação neutra ao meio, enquanto que 836 apresentaram crescimento rápido e reação ácida ao meio, sendo encontrados nos diversos SUTs. Estes resultados corroboram os resultados encontrados por Jesus et al. (2005), Nóbrega (2006) e Pereira (2000). A distribuição destes isolados nos diversos SUTs, de acordo com seu tempo de crescimento e reação do indicador de pH do meio é apresentada na Figura 2.

Verificou-se distribuição similar entre os SUTs: capoeira nova e pastagem, agrofloresta e agricultura, floresta primária e capoeira velha.

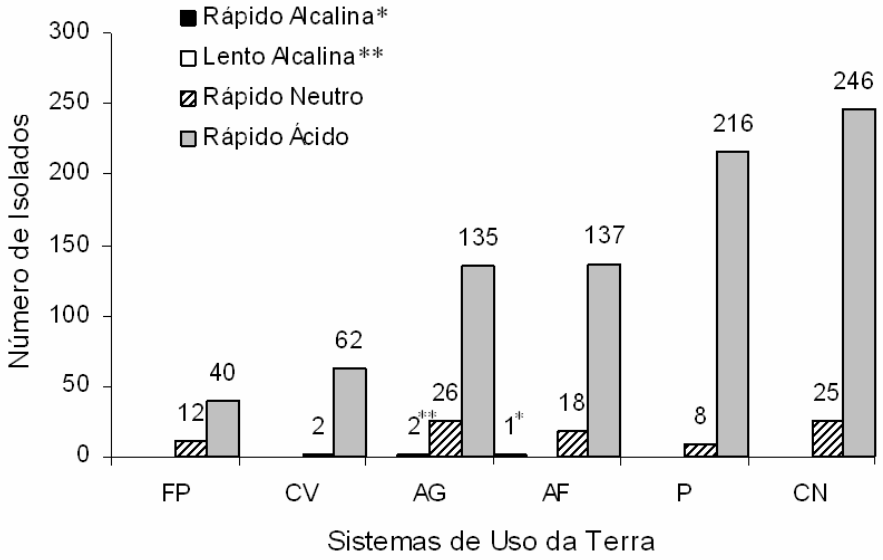


FIGURA 2 Distribuição dos diversos tipos de isolados classificados pela velocidade de crescimento e reação do indicador do meio nos seguintes sistemas de uso da terra: capoeira nova (CN), capoeira velha (CV), floresta primária (FP), pastagem (P), agricultura (AG) agrofloresta (AF) dos pontos amostrados para sua coleta, na região da Amazônia Ocidental

O número de pontos que nodularam nos diversos SUTs foram: 16, no SUT capoeira nova (CN); 16, na capoeira velha (CV); 7, na floresta primária (FP); 11, na pastagem (P); 10, na agricultura (AG) e 7, na agrofloresta (AF). Dividindo-se o número de isolados por SUT pelo número de pontos que nodularam pode-se encontrar a média de isolados por pontos que nodularam em cada SUT. Esta média foi de: 17, no SUT capoeira nova (CN); 4, na capoeira velha (CV); 9, na floresta primária (F); 20, na pastagem (P); 16, na agricultura (AG) e 22, na agrofloresta (AF). Verificaram-se os menores valores de médias nos SUTs capoeira velha e floresta primária, os quais também apresentaram menores valores para o número de isolados. Isso se deveu, provavelmente, ao maior equilíbrio dos ecossistemas, diminuindo a necessidade de entrada de nutrientes de fora do ciclo estabelecido.

Tais resultados corroboram os encontrados por Bonetti et al. (1984), Jesus et al. (2005), Magalhães et al. (1982), Moreira & Franco (1994), Nóbrega (2006) e Pereira (2000), que encontraram baixa densidade de nódulos e populações de BNL em florestas da Amazônia. Há vários relatos de que nódulos são raramente encontrados em floresta primária de terra firme (Bonetti et al., 1984; Magalhães et al., 1982; Moreira et al., 1992; Sylvester-Bradley et al., 1980). Contudo, isso não significa que BNL não estejam presentes, mas, deve-se às condições desfavoráveis à nodulação como, por exemplo, a presença de nitrogênio pela ciclagem da serrapilheira (Magalhães et al., 1982).

O SUT capoeira nova foi o que apresentou maior número de isolados, seguido pelo SUT pastagem. Estes resultados expressam, provavelmente, o maior desequilíbrio destes sistemas, mostrando a necessidade de introdução de nutrientes de fora do ambiente para o equilíbrio dos mesmos.

Verificou-se grande similaridade entre os SUT agrofloresta e agricultura, tanto na distribuição do número de isolados quanto aos diversos tipos de isolados classificados. Estes SUTs se posicionaram em relação aos

outros SUTs de forma intermediária, provavelmente, por estarem em um estado mediano de equilíbrio.

Segundo a literatura (Chen et al., 1988; Dreyfus et al., 1988; Frank, 1889; Jarvis et al., 1997; Jordan, 1984; de Lajudie et al., 1998; Moreira, 1991; Moreira & Siqueira, 2006), os isolados que apresentaram crescimento rápido e acidificaram o meio podem pertencer aos gêneros *Rhizobium, Sinorhizobium, Mesorhizobium*, *Allorhizobium* ou *Burkholderia;* os que apresentaram crescimento rápido e reação neutra podem pertencer aos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium, Mesorhizobium, Allorhizobium;* os que apresentaram crescimento lento e reação alcalina do pH do meio podem pertencer ao gênero *Bradyrhizobium*. Os que apresentaram crescimento rápido e reação alcalina ao meio podem ser indicativos do gênero *Azorhizobium.*

3.3.2 Agrupamento e diversidade dos isolados de BNL

Para avaliar a riqueza de isolados, 33 características culturais foram analisadas por meio de um dendograma, determinando os grupos formados a 100% de similaridade. Foram encontrados 40 grupos culturais. Na Figura 3 são apresentados o dendograma de similaridade dos 40 grupos e o número de isolados agrupados em cada um deles.

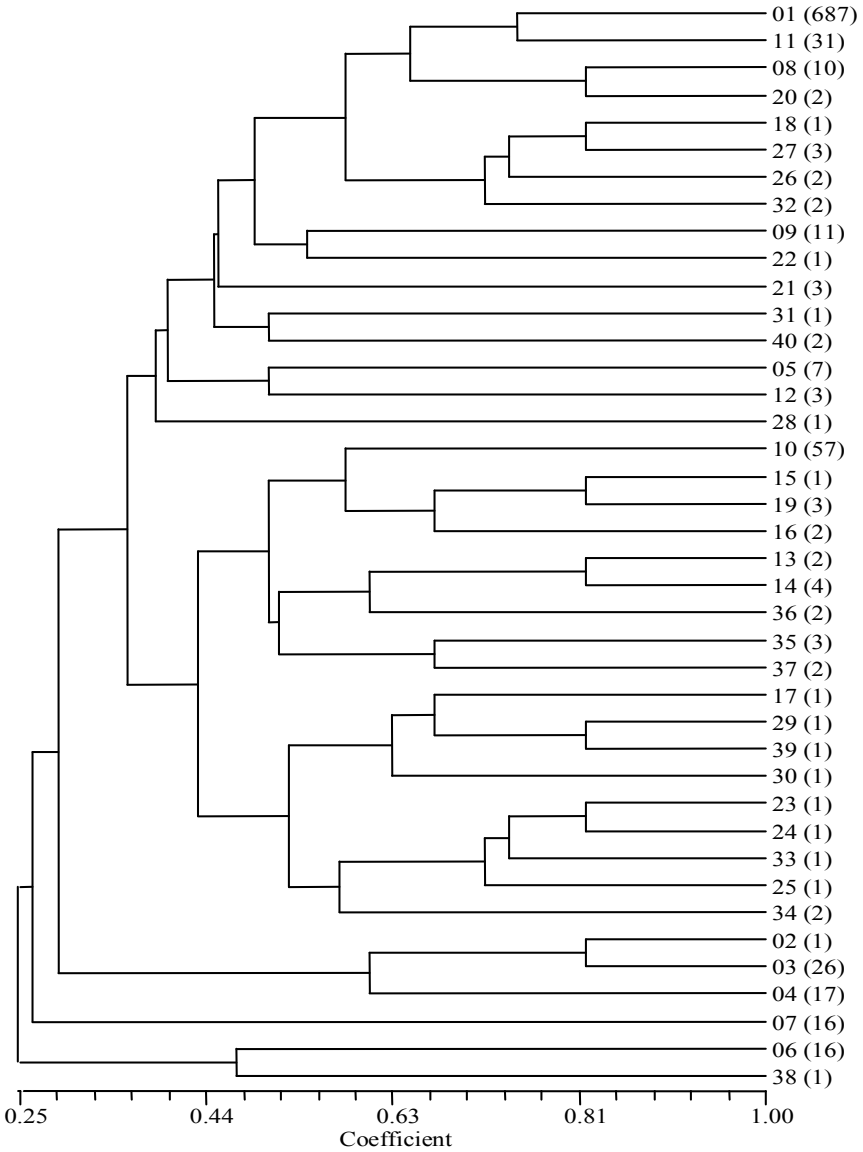


FIGURA 3 Dendograma com grupos culturais e entre parênteses, número de isolados agrupados a 100% de similaridade para isolados obtidos como a planta isca feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), para todos os pontos amostrados nos diferentes sistemas de uso da terra, na região da Amazônia Ocidental.

A distribuição do número de grupos por SUT foi desigual, tendo o SUT que apresentou maior número de grupos sido o agrofloresta, com 20 grupos diferentes, seguido pelo SUT agricultura, com 18. Estes dados se devem, provavelmente, à maior diversidade de espécies vegetais existentes nestes SUT, aliada à necessidade de introdução de nutrientes externos a estes, estimulando a nodulação no mesmo. O SUT que apresentou menor número de grupos culturais foi o capoeira velha, com 6 grupos. Estes dados encontram-se na Figura 4.

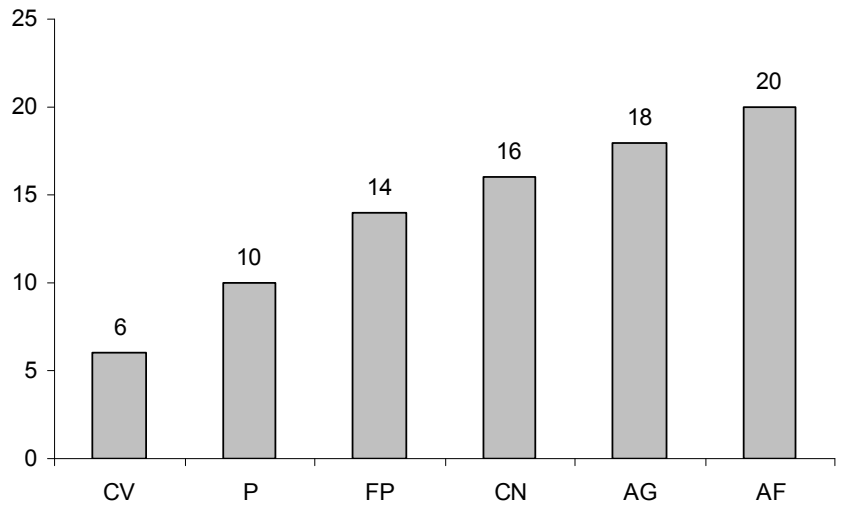


FIGURA 4 Distribuição do número de grupos culturais nos diferentes sistemas de uso da terra, na região da Amazônia Ocidental

Com o cálculo de correlação entre número de isolados e grupos culturais encontrados em cada SUT, encontrou-se um valor de 32%. Este baixo valor de correlação demonstra que, provavelmente, o maior ou o menor número de isolados de um SUT não reflete um maior ou menor número de tipos culturais, sendo este reflexo das características do SUT em estudo.

Por meio do cálculo do índice de diversidade de Shannon e na análise de rarefação foi possível contabilizar a riqueza de tipos culturais observada e também estimá-la por meio do índice riqueza Chao 2 (Chao, 1987). Os resultados encontram-se na Tabela 1.

TABELA 01 Riqueza de grupos fenotípicos culturais de bactérias que nodulam e leguminosas isoladas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.).

Amostras	**CN**[(1)]	**CV**[(2)]	**FP**[(3)]	**P**[(4)]	**AG**[(5)]	**AF**[(6)]
Pontos coletados	30	10	17	13	18	10
Pontos com isolados	16	7	6	11	10	7
Isolados obtidos	271	64	52	224	163	156
Espécies observadas	16	6	14	10	18	20
Isolados estimados	255,1	85,6	55,9	226,6	151,6	158,0
Riqueza de grupos*	15	4	6	11	10	7
Singletons	0,28	0,13	0,06	0,18	0,08	0,06
Doubletons	1,55	0,27	0,46	1,09	0,20	0,18
Uniques	2,68	1,98	1,13	2,89	1,03	0,37
Duplicates	2,73	1,67	1,17	2,17	1,29	0,7
Chao 2**	15,14	6,68	5,76	12,56	9,69	6,67
Shannon	2,38	1,45	1,51	1,7	2,11	1,87

[(1)] Capoeira nova (CN). [(2)] Capoeira velha (CV). [(3)] Floresta primária (FP). [(4)] Pastagem (P). [(5)] Agricultura (AG). [(6)] Agrofloresta (AF).* Riqueza observada. ** Riqueza estimada

Os maiores valores de número de isolados estimados, riqueza de grupos observada e estimada (Chao 2) e diversidade (Shannon) foram os do SUT capoeira nova. Os SUTs floresta primária e capoeira velha foram os que apresentaram menores índices de diversidade e número de isolados obtidos e estimados.

Os números de Singletons, Doubletons, Uniques e de Duplicates foram maiores no SUT capoeira nova, seguido pelo SUT pastagem (Tabela 1), resultados que refletem, provavelmente, o estímulo destes SUTs à sustentação de grupos de isolados mais raros.

Na Figura 5 é apresentada a variação do índice Chao 2 (riqueza estimada) em função do número de unidades amostrais coletadas (esforço de

amostragem) em solos sob diferentes SUTs. Sabe-se que o número de espécies ou grupos taxonômicos encontrados em uma área aumenta com o aumento do tamanho das amostras ou da intensidade de amostragem (Magurran, 1987). Verifica-se que, para a maioria dos SUTs, o número de unidades amostrais foi suficiente na coleta das diversas espécies de BNL dos locais de amostragem, já que a distribuição dos pontos tende a um patamar com máxima riqueza estimada. Apenas no SUT pastagem este comportamento não se confirmou, mostrando que, possivelmente, maior número de unidades amostrais poderia levar à coleta de um número maior de espécies. Resultados similares foram encontrados por Nóbrega (2006).

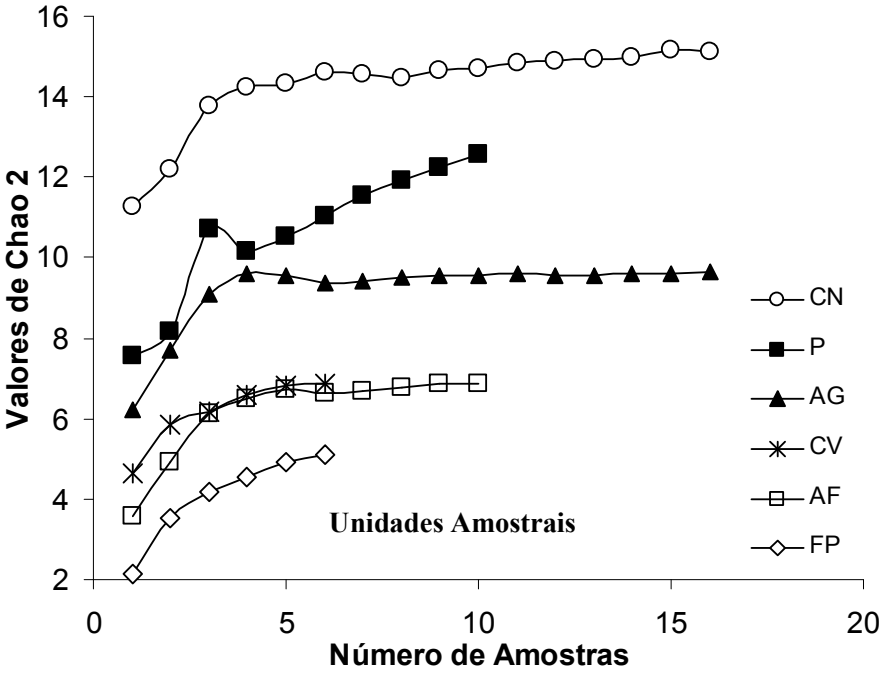


FIGURA 5 Variação do índice Chao 2 (Riqueza estimada), em função do número de unidades amostrais coletadas (esforço de amostragem) em solos sob agrofloresta (AF), agricultura (AG) capoeira nova (CN), floresta primária (FP), pastagem (P) e capoeira velha (CV), na região da Amazônia Ocidental

Definir diversidade é complexo, pois essa é composta por dois elementos principais: a variação e a abundância de espécies. O índice de diversidade de Shanonn é um dos mais usados para indicar a diversidade das espécies, pelo fato de combinar o número de espécies presentes e a densidade relativa da espécie em um único valor (Daniel, 2004). Na Figura 6 são apresentados os valores de Shannon (H') para os isolados de BNL, em função do número de amostras coletadas (esforço de amostragem) nos solos sob diferentes SUTs estudados. Verificou-se que, em todos os SUTs, a curva tende a se tornar assíntotas (paralelas ao eixo X). Este resultado mostra que o número de pontos amostrados foi suficiente para a obtenção dos valores próximos aos valores máximos do índice de Shannon. O maior valor do índice de Shannon foi obtido no SUT capoeira nova, seguido do SUT agricultura. Pode-se notar também que os SUTs pastagem, capoeira velha e agrofloresta tiveram resultados semelhantes, só diferindo em relação ao número de unidades amostrais para cada SUT. O menor valor do índice de Shannon foi encontrado no SUT floresta primária. Estes resultados corroboram os encontrados por Jesus (2004) que, estudando sistemas de uso da terra e BNL, também encontrou valores menores de Shannon em floresta primária.

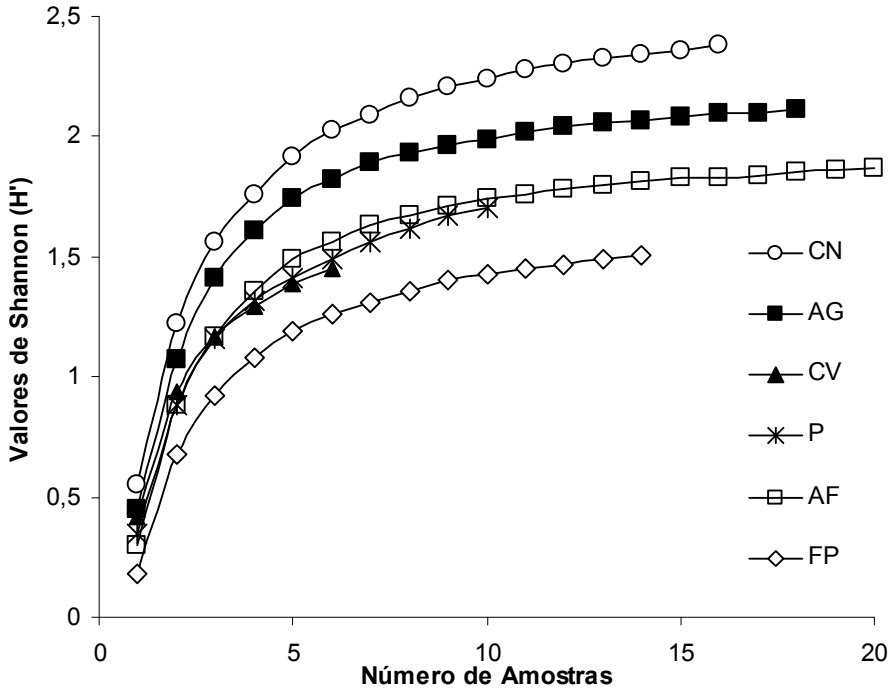


FIGURA 6 Valores de Shannon (H') para os isolados de BNL em função do número de amostras coletadas (esforço de amostragem) em solos sob agrofloresta (AF), agricultura (AG) capoeira nova (CN), floresta primária (FP), pastagem (P) e capoeira velha (CV), na região da Amazônia Ocidental

3.4 CONCLUSÕES

Existe diferença entre os sistemas de uso da terra quanto à distribuição dos grupos fenotípicos dos isolados capturados na Amazônia Ocidental.

No total, encontraram-se 930 isolados, que foram agrupados em 40 grupos culturais, diferenciados por suas características fenotípicas.

Ocorreu predominância de isolados de crescimento rápido e que acidificam o meio em todos os sistemas de uso da terra.

O sistema de uso da terra agrofloresta foi o que apresentou maior número de grupos culturais.

A maior diversidade, indicada pelo índice de Shannon e o maior índice de riqueza de Chao2 foram encontrados no sistema de uso da terra capoeira nova e a menor diversidade foi encontrada no sistema de uso da terra floresta primária.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov. from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 47, n. 4, p. 996-1006, Oct. 1997.

BALLARD, R. A.; CHARMAN, N.; MCINNES, A.; DAVIDSON, J. A. Size, symbiotic effectiveness and genetic diversity of field pea rhizobia (*Rhizobium leguminosarum* bv. viciae) populations in South Australian soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, n. 8, p. 1347-1355, Aug. 2004.

BONETTI, R.; OLIVEIRA, L. A.; MAGALHÃES, F. M. M. População de *Rhizobium* spp. e ocorrência de micorriza VA em cultivos de essências florestais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 19, n. 2, p. 139-139, fev. 1984.

BRASIL. Departamento Nacional de Produção Mineral. **Projeto RADAMBRASIL. Folha SB. 19 – Juruá:** geologia, geomorfologia, pedologia, vegetação e uso potencial da terra. Rio de Janeiro, 1977. 436 p (Levantamento de Recursos Minerais, 15).

CHAO, A. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. **Biometrics**, Washington, v. 43, n. 4, p. 783-791, Dec. 1987.

CHEN, W. X.; LI, G. S.; QI, Y. L.; WANG, E. T.; YUAN, H. L.; LI, J. L. *Rhizobium huahuii* sp. nov. isolated from root nodules of *Astragalus sinicus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 41, n. 2, p. 275-280, Apr. 1991.

CHEN, W. M.; YAN, G. H.; LI, J. L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium gen*. nov**. International Journal Systematic Bacteriology**, Reading, v. 38, n. 4, p. 392-397, Oct. 1988 .

COLWELL, R.K. **Estimates**: statistical estimation of species ichness ans shared species from samples. Version 5. User's Guide and application published at 1997. Disponível em: <http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates>. Acesso em: 10 mar. 2006.

DANIEL, O. Subsidios al uso del índice de **diversidad de shannon**. In: CONGRESO LATINOAMERICANO IUFRO, 1., 1998, Valdivia-Chile. **Anais....** Valdivia-Chile: IUFRO, 1998. 1CD-ROM.

COLWELL, R. K.; CODDINGTON, J. A. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. **Philosophical Transactions of the Royal Society (Series B)**, London, v. 345, n. 1311, p. 101-118, July 1994.

de LAJUDIE, P.; LAURENT-FUTELE, E.; WILLENS, A.; TORCK, U.; COOPMAN, R.; COLLINS, M. D.; KERSTERS, K.; DREYFUS, B.; GILIS, M. *Allorhizobium undicola* sp. Nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. **International Journal Systematic Bacteriology**, Reading, v. 48, n. 4, p. 1277-1290, Oct. 1998.

DREYFUS, B.; GARCIA, J. L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacteria isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal Systematic Bacteriology**, Reading, v. 38, n. 1, p. 89-98, Jan. 1988

FERREIRA, A. B. H. **Novo Aurélio século XXI.** 3. ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1999.

FIDALGO, E. C.; COELHO, M. R.; ARAÚJO, F. O; MOREIRA, F. M. S.; SANTOS, H. G.; BREFIN, M. L. M. S.; HUISING, J. Levantamento do uso e cobertura da terra de eis áreas amostrais relacionadas ao proeto "Conservation and sustainable management of below-ground biodiversity:phase1", município de Benjamin Constant, (AM). **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento da Embrapa Solos**, Rio de Janeiro, p. 1-47, 2005.

FRANK, B. Ueber dies Pilzsymbiose der Leguminosen. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, Berlin, v. 7, p. 332-346, 1889.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology**. New York: McGraw-Hill Book, 1928. 143 p.

GALLOWAY, J. N.; COWLING, E. B. Reactive nitrogen and the world: 200 years of change. **Ambio**, Stockholm, v. 31, n. 2, p. 64-71, Mar. 2002.

JARVIS, B. D. W.; VAN BERKUM, P.; CHEN, W. X.; NOUR, S. M.; FERNANDES, M. P.; CLEYET-MAREL, J. C.; GILLIS, M. Transfer of *Rhizobium loti, Rhizobium huakuii, Rhizobium ciceri,Rhizobium mediterraneum*

and *Rhizobium tianshanense* to *Mesoorhizobium gen*. nov. **International Journal Systematic Bacteriology**, Reading, v. 47, n. 3, p. 895-898, July 1997.

JESUS, E. C. **Diversidade de bactérias que nodulam leguminosas isoladas de três sistemas de uso da terra na região do Alto-Solimões – AM**, 2004. 114 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

JESUS, E. C. et al. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 8, p. 769-776, ago. 2005.

JORDAN, D. C. Family III. Rhizobiacae. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. p. 234-244.

KASCHUK,G.; HUNGRIA, M.; SANTOS, J. C. P.; BERTON-JUNIOR, J. F. Differences in common bean rhizobial populations associated with soil tillage management in southern Brazil. **Soil Tillage Research**, v. 87, n. 2, p. 205–217, June 2006.

MAGALHÃES, L. M . S.; OLIVEIRA, L. A.; DOBEREINER, J. Ocorrência de nodulação em leguminosas florestais de terra firme nativas da região de Manaus, AM. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 12, n. 3, p. 509-514, set. 1982.

MAGURRAN, A. E. **Ecological diversity and its measurement**. New Jersey: Princeton, 1987. 179 p.

MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F. M.; FRANCO, A. A.; GRAHAM, P.; PARDO, M. A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 41, n. 3, p. 417-426, July 1991.

MCCANN, K. S. The diversity-stability debate. **Nature**, London, v. 405, n. 6783, p. 228-233, May 2000.

MELLONI, R.; NOBREGA, R. S. A. ; MOREIRA, M. F. S. ; SIQUEIRA, J. O. Efficiency and phenotypic diversity among nitrogen-fixing bacteria that nodulate cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in bauxite-mined soils under rehabilitation. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, n. 2, p. 235-246, mar./abr. 2006.

MOREIRA, F. M. S. **Caracterização de estirpes de rizóbio isoladas de espécies florestais pertencentes a diversos grupos de diversos grupos de divergência de Leguminosae introduzidas ou nativas da Amazônia e Mata Atlântica**. 1991. 152 p. Tese (Doutorado)-Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, RJ.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. **O. Microbiologia e bioquímica do solo** . 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729 p.

MOREIRA, F. M. S.; FRANCO, A. A. Rhizobia – Host interactions in tropical ecosystems in Brazil. In: SPRENT, J. I.; D. Mc KEY. (Ed.). **Advances in legume systematic 5: The nitrogen factor**. Royal Botanic Garden, Kew, Inglaterra: 1994. p. 63-74.

MOREIRA, F. M. S.; HUISING, J. Methodology for the inventory of Nitrogen-fixing Leguminosae nodulating bacteria. In: **Conservation and Sustainable Management of Below-Ground Biodiversity:** Annual Meeting Report 04 Embu, Kenya, 2004

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, M. F. da; FARIA, S. M. de. Ocurrence of nodulation in legume species in the Amazon region of Brazil. **New Phytologist**, Cambridge, v. 121, n. 4, p. 563-570, Aug. 1992.

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the β-subclass of proteobacteria. **Nature,** London, v. 411, n. 6850, p. 948-950, Aug. 2001.

NÓBREGA, R. S. A. **Efeito de sistemas de uso da terra na Amazônia sobre atributos do solo, ocorrência, eficiência e diversidade de bactérias que nodulam caupi [Vigna unguiculata (L.) Walp].** Lavras : UFLA, 2006.

NTSYS pc: versão. 2. 0, Software. ROHLF, F. J. - Numerical taxonomy system, 2002.

PEREIRA, E. G. **Diversidade de rizóbios isolados de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia**, 2000. 93 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. de F. B.; CARNEIRO, J. E. de S.; GONÇALVES, F. M. A.; SANTOS, J. B. dos; DEL PELOSO, M. J.; FARIA, ; CARNEIRO, L. C. de.; PEREIRA FILHO, G. E. de S, I. A. **O 'Talismã' de sua**

lavoura de feijoeiro. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2002. 4 p. (Embrapa Arroz e Feijão. Comunicado Técnico, 36).

SCHOLLA, L.; ELKAN, G. H. *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybean. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 34, n. 4, p. 484-486, 1984.

SEGOVIA, L.; YOUNG, J. P. W.; MARTINEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. Nov.**International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 43, n. 2, p. 374-377, Apr. 1993.

STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N. G. **Biodiversidade do rizóbio que nodula o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e os principais fatores que afetam a simbiose.** Seropédica – RJ, 1999. p. 51. (Embrapa/CNPAB-Documentos, 94).

SYLVESTER-BRADLEY, R.; OLIVEIRA, L. A.; PODESTÂ FILHO, J. A.; ST. JOHN, T. V. Nodulations of legumes, nitrogen activity of roots and occurrence of nitrogen-fixing *Azospirillum* spp. in representative soil of Central Amazonia. **Agro. Ecosystems**, Amsterdam, v. 6, n. 3, p. 249-266, 1980.

VINCENT, J. M. **A manual for the practial study of root-nodule bactéria.** Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. **(**Internationaçl Biological Programme Handbook, n. 15).

CAPÍTULO 4

EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE BACTÉRIAS QUE NODULAM O FEIJOEIRO EM SOLOS SOB DIFERENTES SISTEMAS DE USO DA TERRA, NA AMAZÔNIA OCIDENTAL

RESUMO

BARBERI, Alexandre. Eficiência simbiótica e diversidade genética de bactérias que nodulam o feijoeiro em solos sob diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental. In:_____. **Diversidade e eficiência de bactérias que nodulam feijoeiro de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental.** 2007. Cap. 4, p. 87-118. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.[1]

O feijão representa uma importante fonte protéica na dieta humana dos países em desenvolvimento das regiões tropicais e subtropicais. Os países em desenvolvimento são responsáveis por 86,7% do consumo mundial. Um dos fatores mais limitantes à produtividade do feijoeiro é a baixa disponibilidade de nutrientes, sobretudo fósforo e nitrogênio, e estirpes eficientes de bactérias que nodulam leguminosas (BNL) podem suprir esta deficiência. Há evidências da existência de grande diversidade de BNL na região Amazônica. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência simbiótica de isolados de BNL em fixarem nitrogênio em simbiose com feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), em solo sob diferentes sistemas de uso da terra (SUTs) na Amazônia Ocidental e sua diversidade genética, a partir de um total de 930 isolados, distribuídos nos seguintes SUTs: 271 isolados capturados do SUT capoeira nova (CN), 64 na capoeira velha (CV), 52 na floresta primária (FP), 224 em pastagem (P), 163 na agricultura (AG) e 156 em agrofloresta (AF). Estes isolados pertenciam a 40 diferentes grupos fenotípicos. Foram realizados sorteios repetidos de um isolado de cada grupo fenotípico e de cada SUT, com o objetivo de selecionar isolados que foram testados em dois experimentos para sua autenticação e verificação de eficiência. Ao final, em 31 isolados autenticados sequenciou se o gene 16S rDNA. No total, foram testados 260 isolados, tendo 80% deles sido autenticados, ou seja, nestes verificou-se sua capacidade de nodulação. Concluiu-se que ocorreu diferença entre a eficiência relativa dos isolados, independentemente dos sistemas de uso da terra de origem. As eficiências relativas dos isolados autenticados, quando agrupados pelos sistemas de uso da terra de origem, foram iguais entre si e superiores à testemunha absoluta, indicando que estas populações puras são eficientes. As seqüências de 16S rDNA, mostraram predominância de isolados com alta similaridade genética com espécies dos gêneros *Burkholderia, Pseudomonas* e *Paenibacillus.*

[1]Orientadora: Fátima Maria de Souza Moreira – UFLA.

ABSTRACT

BARBERI, Alexandre. Symbiotic Efficiency and Genetic Diversity of Bacteria that Nodulating the Common Bean in Soil under Different Land Use Systems in the Amazonian Occidental. In: _____. **Diversity and Efficiency of Bacteria Nodulating Common Beans from Different Land Use Systems in the Western Amazon region.** 2007. p. 87-118. Thesis (Doctorate in Soils e Plants Nutrition) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil.[1]

The common bean is an important protein source in the human diet of the tropical and subtropical developing countries. The developing countries are responsible for 86,7% of the world-wide consumption. One of the factors limiting common beans productivity is the low availability of nutrients, mainly phosphorus and nitrogen. Thus, efficient strains of bacteria nodulating legumes (BNL) can supply this deficiency. There is evidence of great diversity of BNL in the Amazon region. The objective of the present study was to evaluate the symbiotic efficiency in fixing nitrogen of bacteria nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from different land use systems (LUSs) in the western Amazon region and their genetic diversity. 930 isolates were distributed in the LUS as following: 271 from the young secondary forest LUS (CN), 64 from the old secondary forest (CV), 52 from the pristine forest (FP), 224 from pasture (P), 163 from agriculture (AG) and 156 from agroforestry (AF). These isolates belonged to 40 different phenotypic groups. Isolates from each group were selected randomly for authentication and efficiency experiments. 16 SrDNA gene was sequenced in 31 authenticated isolates. Eighty percent of 260 isolates were authenticated, i.e., they induced nodulation in the original host-siratro. Difference in the relative efficiency occurred among the isolates, with no relationship with the LUSs. The relative efficiencies of the authenticated isolates when grouped by LUSs of origin were similar and superior to the control without inoculation, therefore being considered efficient. 16 S rDNA sequences were predominantly similar to species of genera *Burkholderia, Pseudomonas and Paenibacillus.*

[1]Adviser:: Fátima Maria de Souza Moreira – UFLA

4.1 INTRODUÇÃO

O feijão representa importante fonte protéica na dieta humana dos países em desenvolvimento das regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, é um dos componentes básicos da dieta alimentar da população e importante fonte de proteína para as classes economicamente menos favorecidas. As Américas respondem por 43,2% do consumo mundial, seguidas pela Ásia (34,5%), África (18,5%), Europa (3,7%) e Oceania (0,1%). Os países em desenvolvimento são responsáveis por 86,7% do consumo mundial. No Brasil, o consumo *per capita*, na década de 1970, era de 18,5 $kg.hab^{-1}$ ano^{-1}; já em 2002, baixou para 16,3 $kg.hab^{-1}$ ano^{-1} (Wander, 2005).

Um dos fatores mais limitantes à produtividade do feijoeiro é a baixa disponibilidade de nutrientes, sobretudo fósforo e nitrogênio, nos solos agrícolas. A adição de nitrogênio na forma de fertilizantes é cara e, em muitos casos, ineficiente, principalmente devido às perdas do elemento causadas por práticas culturais inadequadas (Araújo, 1994).

De modo geral, a baixa produtividade média dessa cultura está ligada ao fato de ser, em boa parte, uma cultura de subsistência cujos produtores não dispõem de recursos para utilização de fertilizantes, normalmente necessários. Desse modo, é gerada uma cadeia de deficiências nutricionais que, associada à suscetibilidade a pragas e doenças, vem promovendo a estagnação da produção nos atuais patamares (Cassini & Franco, 1998).

Estas características da cultura do feijão poderiam ser amenizadas pelo uso de uma tecnologia barata e de pouco impacto ao meio ambiente: a fixação biológica de nitrogênio. Mas, existe um descrédito crônico na capacidade de o feijoeiro fixar nitrogênio atmosférico suficiente para expressar seu potencial produtivo quando em associação com o BNL, recomendando-se indistintamente, o uso de fertilizantes para a cultura. Entretanto, resultados de pesquisa apontam

ser possível a cultura do feijoeiro se beneficiar, no campo, da fixação biológica de nitrogênio (Araújo, 1994) e o grande desafio que se apresenta é conseguir um manejo adequado dessa simbiose, visando aumentar a sua eficiência (Cassini & Franco, 1998).

No entanto, estirpes selecionadas em laboratório e casa de vegetação podem não alcançar o máximo potencial de fixação no campo, devido, entre outros fatores, à competição com a população nativa estabelecida do solo que, normalmente, é ineficiente e adaptada às condições ambientais locais. Por esta razão, reveste-se da maior importância o estudo de densidade e da diversidade da população de BNL nativas (Pereira, 2000).

Embora a pesquisa tenha mostrado que as BNL podem tornar as plantas menos dependentes da aplicação de fertilizantes nitrogenados e fosfatados, fatores do solo predominantes na Amazônia, como pH ácido (Bonetti et al., 1984) e alta concentração de alumínio tóxico (Cochrane & Sanchez, 1982), podem diminuir a população desses microrganismos no solo (Wood, 1995). No entanto, alguns isolados apresentam mecanismos de tolerância a esses fatores (Watkin et al., 2000).

Há evidências da existência de grande diversidade de BNL na região Amazônica (Moreira et al., 1993), sendo possível que estirpes nativas possam ser mais adaptadas às características adversas dos solos, tornando a região fonte de novas estirpes, com potencial para superar fatores críticos.

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência simbiótica de isolados de bactérias que fixam nitrogênio, sob condições axênicas controladas em simbiose com feijoeiro *(Phaseolus vulgaris L.)* advindas de solos sob diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia e avaliar sua diversidade genética.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Amostragem, captura por meio de planta isca e isolamento de bactérias que nodulam leguminosas (BNL)

Os isolados foram obtidos pelo método de inoculação de planta isca, feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), com suspensões de 98 amostras de solo, coletadas na camada de 0-20 cm, utilizando-se trado de rosca. No total, foram 30 pontos amostrados na capoeira nova (CN), na floresta secundária em estágio inicial de regeneração com menos de 5 anos de formação, após ter sido área de cultivo; 10 pontos na capoeira velha (CV), floresta secundária em estágio avançado de regeneração com mais de cinco anos de formação, após ter sido área de cultivo; 17 pontos na floresta primária (FP), floresta tropical da sub-região dos baixos platôs da Amazônia (Brasil, 1977); 13 pontos na pastagem (P), área implantada em 1970 com capim-imperial (*Axonopus scoparius*) que, após declínio, aproximadamente onze anos decorridos da implantação, foi substituído por *Brachiaria brizantha, B. humidicola* e grama batatais (*Paspalum notatum flugge*), apresentando atualmente espécies invasoras; 18 na agricultura (AG), áreas de cultivos agrícolas anuais (mandioca, milho, cana-de-açúcar e abacaxi), e semiperenes (banana); e 10 na agrofloresta (AF), formada por regeneração espontânea de espécies florestais secundárias, além do enriquecimento de espécies por meio do plantio de mudas de interesse econômico, como cupuaçu (*Theobroma grandflorum*), pupunha (*Bactris gassipae*), banana, abacaxi, café e outras. Essas áreas foram desflorestadas no período de 1979 a 1983 e cultivadas com banana e mandioca, tendo os sistemas agroflorestais sido formados logo após os primeiros ciclos de cultivo, no período de 1980 a 1984. Em nenhuma das áreas houve introdução de estirpes exóticas por meio da inoculação.

A descrição detalhada da coleta das amostras de solos, seguindo as normas instituídas do projeto para todos os países envolvidos encontra-se em Moreira & Huising, 2004 (ver também www.biosbrasil.ufla.br). A caracterização das áreas de estudo encontram-se em Fidalgo et al. (2005). As áreas compreendem as comunidades de Guanabara II e de Nova Aliança e da cidade de Benjamim Constant, situadas a, aproximadamente. 1.100 km a oeste de Manaus, na base do Rio Solimões. Após o destacamento manual, 12 nódulos das raízes de cada planta-isca foram utilizados para o isolamento das BNL. A descrição detalhada dos tratamentos e da coleta das amostras de solos, assim como da caracterização das áreas de estudo e de diversidade fenotípica dos isolados de BNL, encontram-se nos capítulos 2 e 3.

4.2.2 Autenticação e eficiência de isolados de BNL por meio da inoculação no hospedeiro de origem

No experimento de captura foram obtidos 930 isolados, distribuídos em 40 grupos, de acordo com suas características culturais. Neles foi feita uma seleção de isolados que contemplassem representantes de todos os grupos e de todos os sistemas de uso da terra (SUT). Então, foram realizados sorteios de um isolado de cada grupo por cada SUT, até completar um total de 82 isolados, que foram testados no primeiro experimento e mais 178 isolados, que foram testados no segundo experimento. Foram montados dois experimentos, devido a limitações de espaço.

Em casa de vegetação do Laboratório de Microbiologia do Solo, no Departamento de Ciências do Solo da Universidade Federal de Lavras, foram montados os experimentos: de maio a julho de 2006, em garrafas de vidro âmbar (350 mL), objetivando verificar a capacidade de 260 isolados nodularem no hospedeiro de onde havia sido isolado, o feijão, tendo sido utilizada a cultivar

Talismã, de grão tipo carioca, lançada em 2002 (Ramalho et al., 2002). Para a montagem das garrafas, foram utilizados papel de filtro, fita adesiva e papel alumínio. O papel de filtro foi cortado de forma a apresentar a mesma altura da garrafa para servir como suporte às raízes. Posteriormente, estas foram autoclavadas, por 60 minutos, a uma pressão de 1,5 kg/cm^2, a 127°C, com papel de filtro mais a solução nutritiva de Jensen modificada (K_2HPO_4 0,2 g L^{-1}; $MgSO_47H_2O$ 0,2 g L^{-1}, NaCl 0,2 g L^{-1}, $CaHPO_4$ 1 g L^{-1}, $FeCl_3.6H_2O$ 0,1 g L^{-1}; H_3BO_3 2,86 mg L^{-1}; $MnSO_4.4H_2O$ 2,03 mg L^{-1}; $ZnSO_4.7H_2O$ 0,22 mg L^{-1}; $CuSO_4.5H_2O$ 0,08 mg L^{-1} e $Na_2MoO_4.H_2O$ 0,09 mg L^{-1}), diluída quatro vezes.

As sementes utilizadas foram desinfestadas superficialmente com etanol a 70%, por 1 segundo e hipoclorito de sódio a 1,5%, por 4 minutos. Em seguida, foram lavadas seis vezes com água destilada esterilizada. Posteriormente, foram imersas em água estéril por 2 horas e, posteriormente, colocadas em placas de Petri com algodão umedecido (autoclavado) e mantidas, por 12 horas, em câmara de crescimento a 28°C. Deste lote, vinte sementes também foram colocadas em meio de cultura sólido 79, para a verificação de possíveis contaminações. As sementes pré-germinadas foram inseridas manualmente no orifício da garrafa, com auxílio de uma pinça. A boca da garrafa ficou protegida com papel alumínio. O primeiro experimento foi constituído de 87 tratamentos, sendo 82 isolados, mais dois controles positivos, constituídos pela inoculação de 2 estirpes de referência (CIAT899 (BR322) e UFLA02100) e mais dois controles negativos (um com nitrogênio 140 mg de N e uma testemunha geral). O segundo foi constituído de 183 tratamentos, sendo 178 isolados mais os controles.

Os dois experimentos foram instalados em casa de vegetação, utilizando-se delineamento inteiramente casualizado, ambos com três repetições por tratamento. Para a composição dos tratamentos, inoculou-se 1 mL de meio 79 semi-sólido com os isolados na fase log de seu crescimento (quatro dias de

cultivo a 28ºC), em cada semente. Nos controles sem inoculação e sem adição de nitrogênio, foi inoculado apenas 1 mL de meio 79 semi-sólido sem inóculo e, no controle com N mineral, aplicaram-se 140 mg de N (NH_4NO_3) na solução nutritiva, no dia do plantio.

As plantas foram colhidas 30 dias após germinação, para a determinação da matéria seca da parte aérea e a avaliação do número e do peso de nódulos secos. Após o destacamento manual, os nódulos das raízes foram contados e, assim como a parte aérea, foram acondicionados em sacos de papel e levados para estufa de circulação forçada (65ºC a 70ºC) até peso constante, para a determinação do peso da matéria seca. A eficiência relativa de cada tratamento foi calculada segundo a fórmula (Bergensen et al., 1971):

ER=((MSPAinoculada) / (MSPAcomN))X100

em que: ER – eficiência relativa; MSPA inoculada – matéria seca da parte aérea da planta inoculada; MSPA com N – matéria seca da parte aérea da planta com N mineral.

4.2.3 Análise dos dados

Todos os dados foram submetidos à análise de variância, empregando-se o sistema de análise estatística Sisvar, versão 4.0 (Ferreira, 2000). As médias dos tratamentos para os dados de número de nódulos (N° N) e matéria seca de nódulos (MSN) foram transformados pela expressão (X+0,5) ^ 0,5 e as médias de todos os dados foram comparadas, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

4.2.4. Amplificação e seqüenciamento do gene 16S do RNA ribossomal

Do total de isolados autenticados, 60 foram escolhidos para representar os grupos culturais (capitulo 3) e foram crescidos em meio 79. Colônias isoladas

foram retiradas e colocadas em microtubos de 1,5 mL contendo 1 mL de água ultrapura estéril e aquecidos, por 10 minutos, a 95°C. Uma alíquota de 10 µL foi utilizada para a reação em cadeia da polimerase (PCR), para um volume final de 50 µL por reação. As quantidades de reagentes utilizados na PCR são apresentadas na Tabela 1.

TABELA 01 Quantidades e concentrações dos reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase (PCR) para um total de 50 µL.

Componentes	**Volume em µL**
Solução DNA extraído	10,00
"Master mix" por tubo	40,00
Água estéril	25,10
Tampão PCR 1X	5,00
$MgCl_2$ (25 mM)	2,50
DNTPs (10mM)	5,00
Iniciador 27F (10 µM)	1,00
Iniciador 1492R (10 µM)	1,00
Taq polymerase (5 U μL^{-1})	0,40

A reação de amplificação foi realizada no termociclador Eppenbdorf Mastercycle®, Alemanha. As temperaturas do ciclo de amplificação foram: de desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação (94°C por 40 segundos); de anelamento (55°C por 40 segundos); de extensão (72°C por 1,5 minuto) e de extensão final de 72° por 7 minutos. A reação de PCR do 16S rDNA (50 µL) foi corrida em gel de agarose 1% (p/v), com tampão TAE e, depois, corada em brometo de etídeo (5 µg mL^{-1}). As amostras foram congeladas e liofilizadas e enviadas para a empresa Macrogen, República da Coréia, para a realização do seqüenciamento, o qual foi realizado utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores 27F. As seqüências obtidas foram comparadas às existentes no banco de dados GenBank (NCBI, 2007), para a possível identificação das espécies.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Autenticação e eficiência simbiótica de isolados de BNL por meio da inoculação no hospedeiro de origem

4.3.1.1 Primeiro experimento

Dentre os 82 isolados testados, 47 apresentaram nodulação e 35 não apresentaram nodulação. Estes, possivelmente, são isolados de bactérias que não nodulam leguminosas.

Quanto à eficiência relativa (ER), dos 47 isolados que nodularam, 4,26% obtiveram ER superior, 59,57% obtiveram ER similar e 36,17% obtiveram ER inferior ao tratamento inoculado com a estirpe CIAT899. Os isolados 17AIIF1 e 81IIF4, representantes dos grupos 10 e 01, respectivamente, apresentaram resultados médios, em todas as variáveis, superiores aos tratamentos testemunha inoculados e similares aos encontrados para as testemunhas que receberam adubação mineral de nitrogênio, tornando-se isolados potenciais para futuros estudos de seleção de estirpes inoculantes para feijão.

Não foi possível comparar os resultados de matéria seca da parte aérea com resultados de literatura, pois o método de cultivo foi empregado para esta espécie pela primeira vez. Mas, observou-se bom desenvolvimento das plantas e dos nódulos.

Resultados de peso da matéria seca de nódulos superiores aos obtidos pelos tratamentos inoculados foram encontrados em 33 isolados, mas estes resultados não refletiram em aumento da eficiência relativa, provavelmente, por possuírem nódulos menos eficientes que a testemunha inoculada.

O tratamento testemunha inoculado com a estirpe UFLA02100 não apresentou bom desenvolvimento, e seus resultados para eficiência relativa não foram diferentes dos da testemunha absoluta sem inoculação e sem nitrogênio.

Na Tabela 2 são apresentados os valores médios das variáveis avaliadas em relação aos grupos culturais dos isolados testados. Observou-se que apenas três grupos culturais com isolados testados (27, 30 e 40) tiveram resultados médios de crescimento das plantas (matéria seca da parte aérea e eficiência relativa) similares ao tratamento com estirpe teste CIAT899, tendo os outros tratamentos apresentado resultados similares ao tratamento testemunha absoluta. Com relação à nodulação (número de nódulos e matéria seca de nódulos), sete grupos (01, 13, 14, 15, 20, 30 e 40) tiveram médias maiores que os tratamentos testemunha inoculados.

Quanto à eficiência relativa (ER), dos 19 grupos que nodularam, 10,53% obtiveram médias iguais e 89,47%, inferiores ao tratamento inoculado com a estirpe CIAT899 (Tabela 2).

TABELA 2 Valores médios de número de nódulos (N° N), matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA) e eficiência relativa (ER) para os diferentes grupos culturais de isolados de BNL testados no primeiro experimento, obtidos dos solos em diferentes SUTs da Amazônia Ocidental

Grupos	**N° N**	**MSN**	**MSPA**	**ER**
Unidades	**uni**	**mg**	**mg**	**%**
G01	100,10 a	37,70 a	218,85 c	51,70 c
G03	36,33 b	15,83 c	137,17 c	32,40 c
G04	59,83 a	14,00 c	126,67 c	29,92 c
G05	85,67 a	16,67 b	209,00 c	49,37 c
G06	74,83 a	33,17 b	218,17 c	51,54 c

... continua ...

TABELA 2, Cont.

Grupos	**N° N**	**MSN**	**MSPA**	**ER**
Unidades	**uni**	**mg**	**mg**	**%**
G07	75,44 a	22,33 b	216,56 c	51,16 c
G08	25,83 b	7,33 c	120,83 c	28,55 c
G09	42,17 a	20,00 b	153,67 c	36,30 c
G10	39,81 b	14,59 c	179,37 c	42,37 c
G11	74,67 a	22,83 b	171,67 c	40,55 c
G12	67,67 a	21,33 b	233,67 c	55,20 c
G13	79,33 a	44,33 a	127,00 c	30,00 c
G14	55,17 a	22,67 b	194,67 c	45,98 c
G15	218,00 a	40,00 a	194,33 c	45,91 c
G16	0,00 b	0,00 c	119,00 c	28,11 c
G17	119,33 a	50,33 a	177,33 c	41,89 c
G19	66,33 a	19,00 b	171,00 c	40,39 c
G20	110,67 a	56,33 a	151,67 c	35,83 c
G21	0,00 b	0,00 c	108,67 c	25,67 c
G23	0,00 b	0,00 c	155,00 c	36,61 c
G26	0,00 b	0,00 c	193,33 c	45,67 c
G27	0,00 b	0,00 c	251,33 b	59,37 b
G29	0,00 b	0,00 c	145,33 c	34,33 c
G30	138,67 a	63,33 a	305,67 b	72,20 b
G31	0,00 b	0,00 c	176,00 c	41,57 c
G34	0,00 b	0,00 c	160,33 c	37,88 c
G35	0,00 b	0,00 c	135,00 c	31,89 c
G36	0,00 b	0,00 c	158,33 c	37,40 c
G37	0,00 b	0,00 c	179,33 c	42,36 c
G38	0,00 b	0,00 c	159,67 c	37,72 c

... continua ...

TABELA 2, Cont.

Grupos	**N° N**	**MSN**	**MSPA**	**ER**
Unidades	**uni**	**mg**	**mg**	**%**
G40	107,67 a	52,67 a	266,00 b	62,84 b
T02100[1]	28,00 b	4,00 c	97,00 c	22,91 c
T899[2]	63,33 a	18,00 b	293,00 b	69,21 b
Tabsol[3]	0,00 b	0,00 c	122,67 c	28,98 c
Tnitro [4]	0,00 b	0,00 c	425,33 a	100,47 a
MÉDIA[5]	66,40	24,36	197,72	46,71
CV[6] (%)	70,42*	62,27*	36,75*	36,75*

T02100[1] testemunha inoculada com estirpe UFLA02100; T899[2] testemunha inoculada com estirpe CIAT899; Tabsol[3] Testemunha absoluta Tnitro[4] Testemunha com nitrogênio dose de 140mg de N; MÉDIA[5] Média geral; CV[6] Coeficiente de variação pela ANAVA. Letras diferentes na coluna diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p<0,05$) * Significância estatística da análise de variância ($\alpha = 0,01$)

Na Tabela 3 são apresentadas as médias das variáveis em função dos sistemas de uso da terra de origem dos isolados. Verificou-se que não ocorreu diferença entre os sistemas de uso da terra para as variáveis de crescimento de planta (matéria seca parte aérea e eficiência relativa), ficando seus valores intermediários entre a testemunha absoluta e a testemunha inoculada com a estirpe CIAT899. Já para as variáveis de nodulação (número de nódulos, matéria seca de nódulos), os sistemas de uso da terra agrofloresta, capoeira nova, capoeira velha e pastagem foram melhores, igualando-se ao tratamento testemunha inoculada com estirpe CIAT899.

TABELA 3 Valores médios de número de nódulos (N° N), matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA) e eficiência relativa (ER) para os diferentes sistemas de uso da terra (SUT), obtidos dos solos na Amazônia Ocidental.

SUTS	**N° N**	**MSN**	**MSPA**	**ER**
Unidades	**un**	**mg**	**M g**	**%**
AF[1]	67,74 a	20,96 a	192,39 c	45,45 c
CN[2]	88,78 a	35,16 a	194,16 c	45,86 c
CV[3]	74,93 a	31,85 a	211,56 c	49,97 c
FP[4]	30,48 b	13,73 b	164,94 c	38,96 c
P[5]	111,10 a	41,77 a	226,56 c	53,52 c
AG[6]	35,90 b	10,10 b	172,33 c	40,71 c
T02100[7]	28,00 a	4,00 b	97,00 d	22,91 d
T899[8]	63,33 a	18,00 a	293,00 b	69,21 b
Tabsol[9]	0,00 b	0,00 b	122,67 d	28,98 d
Tnitro[10]	0,00 b	0,00 b	425,33 a	100,00 a
MÉDIA[11]	66,40	24,36	197,72	46,71
CV[12] (%)	76,74*	68,02*	38,18*	38,18*

AF[1] Agrofloresta CN[2] Capoeira nova; CV[3] Capoeira velha FP[4] Floresta P[5] Pastagem; AG[6] Agricultura; T02100[7] testemunha inoculada com estirpe UFLA02100; T899[8] testemunha inoculada com estirpe CIAT899; Tabsol[9] Testemunha absoluta Tnitro[10] Testemunha com nitrogênio dose 140 mg de N; MÉDIA[11] Média geral; CV[12] Coeficiente de variação pela ANAVA Letras diferentes na coluna diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p<0,05$) * Significância estatística da análise de variância ($\alpha = 0.01$)

Estes resultados não corroboram os encontrados no experimento de populações do segundo capítulo desta tese, no qual as médias das ER das populações foram iguais à média da testemunha absoluta. Este aumento de eficiência pode ter ocorrido pelo aumento da densidade inoculada dos isolados neste experimento ou pela existência de organismos antagônicos nas soluções do solos utilizados no segundo capítulo.

4.3.1.2 Segundo experimento

Dos 178 isolados autenticados, 162 apresentaram nodulação, tendo 73 mostrado eficiência relativa similar à dos tratamentos testemunha inoculados com as estirpes CIAT899 e UFLA02100, representando 45% dos isolados que nodularam. Provavelmente, são isolados potenciais para futuros estudos de estirpes a serem indicadas como inoculante comerciais para a cultura do feijão. Os valores médios das variáveis destes isolados estão apresentados na Tabela 4. Do total, apenas 16 isolados testados não nodularam.

Ocorreu predominância de 62% de isolados do grupo 01, entre os isolados de maior eficiência relativa. Entre os de baixa eficiência, esta predominância foi menor (37%).

TABELA 4 Valores médios de número de nódulos (N° N), matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA) e eficiência relativa (ER) para os diferentes isolados que obtiveram ER similar á da testemunha inoculada com estirpe CIAT899, obtidos dos solos da Amazônia Ocidental.

Isolados	**N° N**	**MSN**	**MSPA**	**ER**
Unidades	**un**	**mg**	**mg**	**%**
04IIIF1II	57,00 b	28,00 b	237,33 a	52,86 a
04IIIF2II	32,00 b	8,67 c	235,67 a	52,49 a
04IIIF7II	274,33 a	75,67 a	270,33 a	60,21 a
04IIIF8II	111,67 a	55,00 a	268,00 a	59,69 a
08IIF11	191,00 a	54,00 a	232,67 a	51,82 a
17IF4II	70,00 b	46,67 a	220,33 a	49,07 a
18IF7	153,00 a	67,67 a	300,67 a	66,96 a
18IIIF6I	55,33 b	32,00 b	253,00 a	56,35 a
21IF2I	62,67 b	38,33 b	234,00 a	52,12 a

… continua …

TABELA 4, Cont.

Isolados	N° N	MSN	MSPA	ER
Unidades	um	mg	mg	%
22IIF5II	80,67 b	47,33 a	249,33 a	55,53 a
22IIF8II	77,67 b	26,33 b	249,00 a	55,46 a
24AIF12	97,67 a	39,67 a	226,67 a	50,48 a
24AIIF3	95,67 a	51,33 a	306,00 a	68,15 a
24IIF2II	77,00 b	35,67 b	225,00 a	50,11 a
27IF12	60,67 b	44,00 a	221,00 a	49,22 a
27IF6	76,00 b	46,33 a	259,00 a	57,68 a
27IF9	119,33 a	19,00 b	266,67 a	59,39 a
27IIF2	92,67 a	59,33 a	274,33 a	61,10 a
27IIF3	86,33 a	44,33 a	318,00 a	70,82 a
29IF5	95,67 a	47,33 a	278,67 a	62,06 a
29IF6I	65,67 b	48,67 a	257,33 a	57,31 a
29IIF12II	76,67 b	30,67 b	347,00 a	77,28 a
29IIIF6I	110,33 a	46,67 a	238,33 a	53,08 a
30IIF10	77,00 b	47,67 a	246,33 a	54,86 a
31IF10I	61,33 b	42,67 a	284,67 a	63,40 a
31IIIF2I	121,33 a	51,67 a	300,00 a	66,82 a
32IIF3II	91,00 a	38,33 a	249,00 a	55,46 a
32IIF4II	73,00 b	33,67 b	232,00 a	51,67 a
32IIF5	88,67 a	48,00 a	282,67 a	62,96 a
32IIF7	108,67 a	35,67 b	263,00 a	58,57 a
32IIF8	78,33 b	45,33 a	298,33 a	66,44 a
49IIF7II	95,00 a	53,67 a	237,67 a	52,93 a
63IIF4II	59,00 b	42,67 a	286,67 a	63,85 a
70IIIF3	105,00 a	44,33 a	265,33 a	59,09 a
71AIF5	63,33 b	38,00 a	241,33 a	53,75 a
71AIIF6	75,67 b	50,00 a	222,33 a	49,52 a
80IIF4	111,00 a	49,67 a	251,67 a	56,05 a
81IIF10II	74,00 b	48,00 a	278,33 a	61,99 a
81IIF9II	88,00 a	47,00 a	313,33 a	69,78 a
85IIF10II	101,67 a	46,33 a	262,00 a	58,35 a

... continua ...

TABELA 4, Cont.

Isolados	N° N	MSN	MSPA	ER
Unidades	um	mg	mg	%
85IIF5	87,00 a	48,33 a	261,00 a	58,13 a
85IIF8	87,67 a	36,00 b	246,00 a	54,79 a
85IIF9I	109,33 a	46,33 a	255,00 a	56,79 a
88AIIF4	63,67 b	36,33 b	221,67 a	49,37 a
88AIIF6	45,67 b	33,00 b	311,00 a	69,27 a
88AIIF8	76,67 b	25,00 b	250,33 a	55,75 a
88AIIIF10	70,67 b	33,67 b	247,33 a	55,08 a
89IIF3I	63,33 b	39,00 a	258,67 a	57,61 a
89IIF3II	67,00 b	29,33 b	237,00 a	52,78 a
93IIIF6	63,67 b	47,00 a	265,00 a	59,02 a
95IF2	74,00 b	42,33 a	242,00 a	53,90 a
95IIF12	62,33 b	30,00 b	306,00 a	68,15 a
96IF11I	67,33 b	40,67 a	272,67 a	60,73 a
96IF11II	96,33 a	40,67 a	275,67 a	61,40 a
96IF1II	86,33 a	44,00 a	250,33 a	55,75 a
96IF2I	96,33 a	44,67 a	302,00 a	67,26 a
96IF4I	71,67 b	48,00 a	231,00 a	51,45 a
96IF5I	62,33 b	44,67 a	248,67 a	55,38 a
96IF6I	121,00 a	43,00 a	333,33 a	74,24 a
96IF7II	82,33 a	48,33 a	224,67 a	50,04 a
96IF8I	47,00 b	32,00 b	284,67 a	63,40 a
96IIF4I	54,00 b	41,00 a	227,00 a	50,56 a
96IIF4II	95,33 a	45,00 a	246,00 a	54,79 a
96IIF5II	102,33 a	34,33 b	242,00 a	53,90 a
96IIF6II	81,00 b	33,67 b	289,67 a	64,51 a
96IIF7II	103,67 a	54,00 a	285,67 a	63,62 a
96IIIF10II	97,00 a	49,33 a	237,67 a	52,93 a
96IIIF11	91,00 a	36,67 a	220,33 a	49,07 a
96IIIF2II	105,00 a	27,00 b	223,67 a	49,82 a
96IIIF6II	55,67 b	36,67 a	275,00 a	61,25 a

... continua ...

TABELA 4, Cont.

Isolados	**N° N**	**MSN**	**MSPA**	**ER**
Unidades	**un**	**mg**	**mg**	**%**
96IIIF7I	84,67 a	49,67 a	328,67 a	73,20 a
96IIIF7II	68,00 b	42,33 a	271,33 a	60,43 a
96IIIF9II	58,00 b	40,33 a	297,67 a	66,30 a
T02100[1]	61,33 b	25,33 b	188,67 b	42,02 b
T899[2]	69,67 b	35,97 b	261,17 a	58,17 a
Tabsol[3]	0,00 d	0,00 d	112,00 b	24,94 b
Tnitro[4]	0,00 d	0,00 d	449,00 a	100,00 a
MÉDIA[5]	70,74	32,04	212,56	47,34
CV[6] (%)	24,53*	21,60*	34,06*	34,06*

T02100[1] testemunha inoculada com estirpe UFLA02100; T899[2] testemunha inoculada com estirpe CIAT899; Tabsol[3] Testemunha absoluta Tnitro[4] Testemunha com nitrogênio dose 140 mg de N; MÉDIA[5] Média geral; CV[6] Coeficiente de variação pela ANAVA. Letras diferentes na coluna diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p<0,05$) * Significância estatística análise de variância ($\alpha = 0.01$).

Na Tabela 5 são apresentados os valores médios, em função dos grupos culturais dos isolados testados. Verificou-se que apenas quatro grupos culturais com isolados testados (02, 05, 22 e 25) tiveram médias de crescimento das plantas (matéria seca da parte aérea e eficiência relativa) similares às do tratamento com a estirpe CIAT899; os outros tratamentos apresentaram resultados similares ao tratamento testemunha absoluta.

TABELA 05 Valores médios de número de nódulos (N° N), matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA) e eficiência relativa (ER), para os diferentes grupos culturais de isolados de BNL da coleta, obtidos dos solos da Amazônia Ocidental.

Grupos	**N° N**	**MSN**	**MSPA**	**ER**
Unidades	**un**	**mg**	**mg**	**%**
G01	74,71 a	36,11 a	223,84 c	49,85 c
G02	111,67 a	55,00 a	268,00 b	59,69 b
G03	73,25 a	25,00 a	206,19 c	45,92 c
G04	57,61 a	29,22 a	217,39 c	48,42 c
G05	76,50 a	38,50 a	252,58 b	56,25 b
G06	53,87 a	23,60 a	183,27 c	40,82 c
G07	61,37 a	28,67 a	195,73 c	43,59 c
G08	121,00 a	38,67 a	217,40 c	48,42 c
G09	65,81 a	31,86 a	186,24 c	41,48 c
G10	75,12 a	31,24 a	203,29 c	45,28 c
G11	68,02 a	30,43 a	189,05 c	42,10 c
G12	0,00 b	0,00 b	126,17 c	28,10 c
G14	65,50 a	36,00 a	200,33 c	44,62 c
G16	85,00 a	36,67 a	194,00 c	43,21 c
G18	43,00 a	21,00 a	112,00 c	24,94 c
G22	95,67 a	51,33 a	306,00 b	68,15 b
G24	66,00 a	24,33 a	163,00 c	36,30 c
G25	119,33 a	19,00 a	266,67 b	59,39 b
G32	61,67 a	12,33 a	158,33 c	35,26 c
G33	0,00 b	0,00 b	159,67 c	35,56 c
G35	90,83 a	31,75 a	205,67 c	45,81 c
G39	83,33 a	55,33 a	186,00 c	41,43 c
T02100[1]	61,33 a	25,33 a	188,67 c	42,02 c
T899[2]	69,67 a	35,97 a	261,17 b	58,17 b
Tabsol[3]	0,00 b	0,00 b	112,00 c	24,94 c
Tnitro[4]	0,00 b	0,00 b	449,00 a	100,00 a
MÉDIA[5]	70,74	32,04	212,56	47,34
CV[6] (%)	38,70*	37,50*	37,08*	37,08*

T02100[1] testemunha inoculada com estirpe UFLA02100; T899[2] testemunha inoculada com estirpe CIAT899; Tabsol[3] Testemunha absoluta Tnitro[4] Testemunha com nitrogênio dose 140 mg de N; MÉDIA[5] Média geral; CV[6] Coeficiente de variação pela ANAVA. Letras diferentes na coluna diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p<0,05$) * Significância estatística análise de variância ($\alpha = 0,01$).

Pelos dados da Tabela 6 pode-se verificar que todos os sistema de uso da terra apresentaram valores médios similares, tanto para nodulação (número de nódulos e matéria seca de nódulos) quanto para crescimento das plantas (matéria seca da parte aérea e eficiência relativa), que, neste caso, foram similares às médias das testemunhas inoculadas.

TABELA 6 Valores médios de número de nódulos (N° N), matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA) e eficiência relativa (ER), para os diferentes sistemas de uso da terra (SUT), obtidos dos solos na Amazônia Ocidental.

SUTS	**N° N**	**MSN**	**MSPA**	**ER**
Unidades	**uni**	**mg**	**mg**	**%**
AF[1]	67,81 a	28,39 a	196,85 b	43,84 b
CN[2]	72,23 a	31,77 a	206,52 b	46,00 b
CV[3]	61,93 a	32,07 a	229,44 b	51,10 b
FP[4]	90,00 a	34,72 a	198,42 b	44,19 b
P[5]	76,27 a	37,14 a	225,45 b	50,21 b
AG[6]	65,33 a	29,02 a	204,88 b	45,63 b
T02100[7]	61,33 a	25,33 a	188,67 b	42,02 b
T899[8]	69,67 a	35,97 a	261,17 b	58,17 b
Tabsol[9]	0,00 b	0,00 b	112,00 c	24,94 c
Tnitro[10]	0,00 b	0,00 b	449,00 a	100,00 a
MÉDIA[11]	70,74	32,04	212,56	47,34
CV[12] (%)	40,55*	39,28*	37,57*	37,57*

AF[1] Agrofloresta CN[2] Capoeira Nova;CV[3] Capoeira Velha F[4] Floresta P[5] Pastagem; AG[6] Agricultura; T02100[7] testemunha inoculada com estirpe UFLA02100; T899[8] testemunha inoculada com estirpe CIAT899; Tabsol[9] Testemunha absoluta Tnitro[10] Testemunha com nitrogênio dose de 140 mg de N; MÉDIA[11] Média geral; CV[12] Coeficiente de variação pela ANAVA Letras diferentes na coluna diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p<0,05$) * Significância estatística da análise de variância ($\alpha = 0,01$)

Estes resultados corroboram os encontrados no primeiro experimento e também contradizem os encontrados no experimento de populações do segundo capítulo desta tese, em que as médias das ER das populações foram iguais à média da testemunha absoluta. Este aumento de eficiência, como dito anteriormente, pode ter ocorrido pelo aumento da densidade inoculada dos

isolados neste experimento ou pela existência de organismos antagônicos à simbiose nas soluções do solos utilizados no segundo capítulo.

4.3.2 Amplificação e seqüenciamento do gene 16S do DNA ribossomal

De um total de 60 isolados de BNL, selecionados para amplificação parcial do gene 16S rDNA, 31 isolados foram amplificados com sucesso. Os resultados do número de pares de bases para os isolados representantes dos grupos, os respectivos gêneros, a porcentagem de similaridade e o número do acesso encontram-se na Tabela 7.

Pode-se verificar coerência entre os dados obtidos, pois existe repetição de gêneros dentro dos grupos separados por características fenotípicas.

De acordo com sugestões de classificação de procariotos atuais, a linha de corte para similaridade genética entre espécies é de 97,5% (Stackebrandt & Goebel, 1994), assim, os isolados 25IIF10, 30IIF12, 81IIF10I, 71AIIF5, 04IIIF7I, 04IIIF6, 17AIIIF3II, 95IIF12, 70IF7, 96IIF1II e 04IIIF8II devem ser desconsideradas quanto à sua similaridade com os gêneros/espécies encontrados no GeneBank, sendo, possivelmente, de espécies que ainda não foram inseridas no mesmo.

Seis isolados foram geneticamente similares às espécies do gênero *Burkholderia;* cinco, ao gênero *Pseudomonas* e três, ao gênero *Paenibacillus.* Resultados similares foram encontrados por outros pesquisadores em isolados de feijão do sul de MG (Moreira, comunicação pessoal).

TABELA 7 Seqüenciamento encontrados no GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) do gene 16 s rDNA mais similar a cada isolado representante dos grupos culturais (G) com seus respectivos: SUT, tipo cultural, números de pares de bases (pb), gêneros/ssp, % de similaridade e o número do acesso (NA).

G	Isolados	SUT[1]	Tipo[2]	pb	Microrganismo	%	NA
1	04IF1	F	RH	849	*Burkholderia* sp.	99	AY568514.1
1	85IIF8	P	RH	849	*Burkholderia* sp.	99	DQ777739.1
1	96IIF1II	P	RH	906	*Uncultured bacterium*	89*	AY568840.1
2	04IIIF8II	F	RH	844	*Pseudomonas mosselii*	97*	DQ073452.1
3	08IIF10I	F	RN	851	*Pseudomonas* sp.	99	AY837753.1
3	30IIF11	CN	RH	855	*Pseudomonas plecoglossicida*	99	DQ140382.1
4	32IIIF2II	AG	RH	851	*Paenibacillus* sp.	99	AB042938.1
4	18IIIF6II	AG	RH	854	*Paenibacillus* sp.	99	AB042938.1
5	95IIF12	P	RN	851	*Enterobacter aerogenes*	88*	AY335554.1
5	70IF7	CN	RN	852	*Bacterium*	97*	AY822522.1
6	31IIF8II	CN	RH	845	*Burkholderia* sp.	100	DQ777739.1
6	95IIF3II	P	RH	854	*Pseudomonas* sp.	100	AY303288.1
7	94IIIF4II	P	RN	853	*Brevibacillus reuszeri*	99	AB112715.1
7	22II5FI	AF	RN	854	*Pseudomonas mosselii*	99	DQ837709.1
7	44AIF12I	AG	RN	853	*Burkholderia* sp.	100	CP000150.1
7	21IF3II	AG	RN	856	*Flexibacter* sp.	98	AY238335.1
8	04IIIF7I	F	RN	848	*Bacterium*	97*	AY822513.1
8	04IIIF6	F	RN	821	*Paenibacillus* sp.	81*	AB042938.1
9	17AIIIF3II	AF	RH	785	*Rhizobium gallicum*	94*	MEQRR16S
10	29IIF12II	CN	RH	844	*Bacterium*	99	AY345398.1
10	29IIF12I	CN	RH	856	*Pseudomonas* sp.	99	AY756059.1
10	49IIF7II	AG	RH	849	*Burkholderia* sp.	99	AY839565.1
11	71AIIF5	CN	RH	954	*Clostridium* sp.	88*	DQ675453.1
12	44AIF9	AG	RN	861	*Burkholderia* sp.	99	CP000150.1
13	37IF1	CN	RN	841	*Bacterium 8-gw1-10*	98	DQ990038.1
14	81IIF10I	CV	RN	841	Uncultured soil bacterium	85*	DQ378194.1
15	24AIIF4	AF	ROH	854	*Ralstonia* sp.	99	D88009.1
16	94IF1	P	RN	851	Uncultured bacterium	99	AB255106.1
17	25IIF10	AF	RN	855	*Pseudomonas* sp.	86*	DQ219370.1
18	30IIF12	CN	RH	793	*Paenibacillus* sp.	85*	AY518676.1
19	30IIF5	CN	RH	857	*Paenibacillus pabuli*	99	DQ412046.1

SUT[1]- Sistema de uso da terra (AG- Agricultura, AF- Agrofloresta, F- Floresta primária, CV Capoeira nova, CV Capoeira velha, P – Pastagem).Tipo[2] - tipo cultural (RH: rápido ácido, ROH: rápido alcalino, RN: rápido neutro) * os isolados com asterisco não devem ser considerados similares aos gêneros/espécies encontradas no GenBank por possuírem similaridade inferior a 97,5%.

Depois do trabalho de Moulin et al. (2001), diversos são os estudos apresentados com nodulação de beta-Proteobacteria em leguminosas, como o gênero *Burkholderia* (Barrett & Parker, 2005; Caballero-Mellado et al, 2004; Moreira et al., 2002; Vandamme et al., 2003) e o gênero *Ralstonia* (Chen et al., 2001; Verma et al., 2004).

Apesar da existência de trabalhos mostrando a existência de genes relacionados com a fixação biológica de nitrogênio nos gêneros *Paenibacillus* (Azevedo et al, 1995; Choo et al., 2003; Ma et al., 2007; Motta et al., 2004; Rodriguez-Diaz et al., 2005; Rosado et al., 1997; Teixeira et al., 2000; Zhao et al., 2006), *Clostridium* (Chen et al., 1986; Kasap & Chen, 2005; Leschine et al., 1988; Tanaka et al., 1977), *Pseudomona*s (Desnoues et al., 2003; Postgate & Kent, 1987), poucos são os estudos encontrados sobre nodulação, sendo restritos a identificarem isolados de *Pseudomonas* como promotores de nodulação de plantas por actinomicetos do gênero *Frankia* (Knowlton & Dawson, 1983) e influenciando a nodulação de feijão (Grimes & Mount, 1984).

Zakhia et al. (2006) relatam que, em um estudo com isolados advindos de nódulos de leguminosas, verificou-se a ocorrência de diversos gêneros de bactérias, porém, quando autenticados em *M. atropurpureum* (Siratro), os gêneros *Paenibacillus, Inquilinus*, *Rhodopseudomonas*, *Paracraurococcus*, *Phyllobacterium*, *Ochrobactrum*, *Starkeya*, *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Agromyces*, *Bosea, Microbacterium*, *Ornithinicoccus* e *Bacillus* não apresentaram nodulação.

A espécie *Rhizobium gallicum* é descrita como BNL em feijão (Amarger et al, 1997). Quanto o gênero *Enterobacter*, alguns isolados deste já foram identificados em superfícies de nódulos de leguminosas e foram responsáveis pelo incremento da nodulação por *Rhizobium huakuii* bv. Renge (Xu et al., 1994). Outros isolados foram identificados, como *Brevibacillus reuszeri* e

Flexibacter sp., gêneros com poucos relatos envolvidos com fixação de nitrogênio.

Estes resultados corroboram os encontrados por Pisa (2006) que, estudando diversidade de BNL em feijão, também encontrou gêneros, como *Burkholderia, Pseudomonas* e *Ralstonia.*

Diante do exposto, constatou-se a alta diversidade de isolados encontrada no presente experimento, confirmando a promiscuidade da espécie *Phaseolus vulgaris* L. em estabelecer simbiose com diferentes espécies de bactérias que nodulam leguminosas. Salienta-se a ocorrência verificada de diversos gêneros de bactérias que ainda não foram relatados como sendo formadores de nódulos em leguminosas. Estes resultados, provavelmente, aconteceram devido aos grandes avanços tecnológicos ocorridos na identificação genética de bactérias nos últimos anos.

4.4 CONCLUSÕES

No total, foram autenticados 260 isolados, dos quais 80% apresentaram nodulação.

Ocorreu diferença entre a eficiência relativa dos isolados, independentemente dos sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental.

As eficiências relativas dos isolados autenticados, quando agrupados pelos sistemas de uso da terra de origem, foram iguais, entre si e superiores à testemunha absoluta.

No seqüenciamento genético, ocorreu predominância de isolados com alta similaridade genética com os gêneros *Burkholderia, Pseudomonas* e *Paenibacillus.*

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris*. **International Journal Systematic Bacteriology**, Washington, v. 47, n. 4, p. 996–1006, Oct. 1997.

ARAÚJO, R. S. Fixação biológica de nitrogênio em feijão. In: ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. (Ed.). **Microrganismos de importância agrícola.** Brasília: EMBRAPA. p. 91-120. 1994

AZEVEDO, F.; ROSADO, A.; SELDIN, L. Analise dos genes nif estruturais de *Paenibacillus azotofixans*. In: JORNADA CIENTIFICA DA UFRJ, 1., 1995, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: UFRJ, 1995.

BARRETT, C. F.; PARKER, M. A. Prevalence of *Burkholderia* sp. nodule symbionts on four mimosoid legumes from Barro Colorado Island, Panama. **Systematic and Applied Microbiology**, Washington, v. 28, n. 1, p. 57-65, Jan. 2005.

BERGENSEN, F. J.; BROCKWELL, J.; GIBSON, A. H.; SCHWINGHAMER, E. A. Studies of natural populations and mutants of *Rhizobium* in the improvement of legume inoculants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 46, p. 3-16, 1971. Supplement.

BONETTI, R.; OLIVEIRA, L. A.; MAGALHÃES, F. M. M. População de *Rhizobium* spp. e ocorrência de micorriza VA em cultivos de essências florestais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 19, p. 139-139, 1984. Edição especial.

BRASIL. Departamento Nacional de Produção Mineral. **Projeto RADAMBRASIL. Folha SB. 19 – Juruá:** geologia, geomorfologia, pedologia, vegetação e uso potencial da terra. Rio de Janeiro, 1977. 436 p (Levantamento de Recursos Minerais, 15).

CABALLERO-MELLADO, J.; MARTINEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P. *Burkholderia unamae* sp. nov., an N2-fixing rhizospheric and endophytic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, n. 4, p. 1165–1172, July 2004.

CASSINI, S. T. A.; FRANCO, M. C. Fixação biológica de nitrogênio. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR, T. J.; BORÉM, A **Feijão:** aspectos gerais e cultura no Estado de Minas Gerais. Viçosa: UFV, 1998. p. 153-180.

CHEN, K. C.; CHEN, J. S.; JOHNSON, J. L. Structural features of multiple nifH-like sequences and very biased codon usage in nitrogenase genes of *Clostridium pasteurianum.* **Journal of Bateriology**, Oxford, v. 166, n. 1, p. 162–172, Apr. 1986.

CHEN, W. M.; LAEVENS, S.; LEE, T. -M.; COENYE, T.; DE VOS, P.; MERGEAY, M.; VANDAMME, P. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov. isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, n. 5, p. 1729-1735, Sept. 2001.

CHOO, Q. C.; SAMIAN, M. R.; NAJIMUDIN, N. Phylogeny and Characterization of Three nifH-Homologous Genes from *Paenibacillus azotofixans*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 6, p. 3658-3662, June 2003.

COCHRANE, T. T.; SANCHEZ, P. Land resources, soils, and their management in the Amazon region. In: HECHT, S. B. (Ed.). **Amazonia:** Agriculture and land-use research. Cali, Columbia: CIAT, 1982. p. 137-209.

DESNOUES, N.; LIN, M.; GUO, X.; MA, L.; CARRENO-LOPEZ, R.; ELMERICH, C. Nitrogen fixation genetics and regulation in a *Pseudomonas stutzeri* strain associated with rice. **Microbiology**, Reading, v. 149, n. 8, p. 2251-2262, Aug. 2003.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4. 0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SICIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos, SP. **Programas e Resumos...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 235.

FIDALGO, E. C.; COELHO, M. R.; ARAÚJO, F. O; MOREIRA, F. M. S.; SANTOS, H. G.; BREFIN, M. L. M. S.; HUISING, J. Levantamento do uso e cobertura da terra de eis áreas amostrais relacionadas ao proeto "Conservation and sustainable management of below-ground biodiversity:phase1", município de Benjamin Constant, (AM). **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento da Embrapa Solos**, Rio de Janeiro, p. 1-47, 2005.

GRIMES, H. D.; MOUNT, M. S. Influence of *Pseudomonas putida* on nodulation of *Phaseolus vulgaris.* **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 16, n. 1, p. 27-30, 1984.

KASAP, M.; CHEN, J. S. *Clostridium pasteurianum* W5 synthesizes two NifH-related polypeptides under nitrogen-fixing conditions. **Microbiology**, Reading, v. 151, n. 7, p. 2353-2362, July 2005.

KNOWLTON, S.; DAWSON, J. O. Effects of *Pseudomonas cepacia* and cultural factors on the nodulation of *Alnus rubra* roots by *Frankia* . **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 61, n. 11, p. 2877-2882, 1983.

LESCHINE, S. B.; HOLWELL, K.; CANALE-PAROLA, E. Nitrogen Fixation by Anaerobic Cellulolytic Bacteria. **Science**, Washington, v. 242, n. 4882, p. 1157-1159, Nov. 1988.

MA, Y.; XIA, Z.; LIU, X.; CHEN, S. *Paenibacillus sabinae sp. nov*., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere soils of shrubs. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 57, n. 1, p. 6-11, Jan. 2007.

MOREIRA, F. M. S. ; MARSH, T. ; TIEDJE, J. *Burkholderia* spp. are among fast growing symbiotic diazotrophs isolated from diverse land use systems in Amazonia and from Brazilian Leguminosae forest species. In: **XXI Reunió Latinoamericana de rhizobiologia**, Cocoyoc. Memorias XXI RELAR. Cuernavaca : UNAM. v. Unico. 2002, p. 45-46.

MOREIRA, F. M. S.; HUISING, J. Methodology for the inventory of Nitrogen-fixing Leguminosae nodulating bacteria. In: **Conservation and sustainable management of below-ground biodiversity:** Annual Meeting Report 04 Embu, Kenya, 2004.

MOREIRA, F. M. S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSTERNS, K. FRANCO, A. A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel eletrophoresis of their total proteins. **Systematic and Applied Microbiology**, New York, n. 1, v. 16, p. 135-146, Apr. 1993.

MOTTA, F. F.; GOMES, E. A.; PAIVA, E.; ROSADO, A. S.; SELDIN, L. Use of rpoB gene analysis for identification of nitrogen-fixing *Paenibacillus* species as an alternative to the 16S rRNA gene. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 34-40, 2004.

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOLVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of beta sub-class of Proteobacteria. **Nature**, London, v. 411, n. 6840, p. 948-950, June 2001.

NCBI (National Center for Biotechnology Information) **Citation databases.** Bethesda: U. S. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike, Disponível em:<http://www. ncbi.nih.gov>. Acesso em: 10 jan. 2007.

PEREIRA, E. G. **Diversidade de rizóbios isolados de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia.** 2000. 93 p. Tese (Doutorado) - Lavras, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PISA, G. **Identificação Molecular de Bactérias de Solo Cultivado de Campo Belo do Sul (SC) Capazes de Nodular Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.).** 2006. 112 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

POSTGATE, J. R.; KENT, H. M. Qualitative evidence for expression of Klebsiella pneumoniae nif in *Pseudomonas putida*. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 133, n. 9, p. 2563-2566, Sept. 1987.

RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. de F. B.; CARNEIRO, J. E. de S.; GONÇALVES, F. M. A.; SANTOS, J. B. dos; DEL PELOSO, M. J.; FARIA, ; CARNEIRO, L. C. de.; PEREIRA FILHO, G. E. de S, I. A. **O 'Talismã' de sua lavoura de feijoeiro.** Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2002. 4 p. (Embrapa Arroz e Feijão. Comunicado Técnico, 36).

RODRÍGUEZ-DÍAZ, M.; LEBBE, L.; RODELAS-GONZÁLEZ, B.; HEYRMAN, J.; DE VOS, P.; LOGAN, N. A. *Paenibacillus wynnii* sp. nov., a new species harbouring the nifH gene, isolated from Alexander Island, Antarctica. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, n. 5, p. 2093-2099, Sept. 2005.

ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F.; SELDIN, L.; ELSAS, J. D. V. Diversidade genética de sequências do gene nifH em estirpes *de Paenibacillus azotofixans* e amostras de solo analisadas por DGGE. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 9., 1997, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: SBM, 1997. p. 215.

STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B. M. A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in

bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 44, n. 4, p. 846-849, Oct. 1994.

TANAKA, M.; HANIU, M.; YASUNOBU, K. T. The amino acid sequence of *Clostridium pasteurianum* iron protein, a component of nitrogenase. I. Tryptic peptides. **Journal of Biological Chemistry,** v. 252, n. 20, p. 7081-7088, Oct. 1977.

TEIXEIRA, R. L. F.; SELDIN, L.; ROSADO, A. S. Análise da expressão de genes de fixação de nitrogênio em *Paenibacillus azotofixans*. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRJ, 21., 2000, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: UFRJ, 2000.

VANDAMME, P.; GORIS, J.; CHEN, W. M.; DE VOS, P.; WILLEMS, A. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. **Systematic Applied Microbiology**, Jena, v. 25, n. 4, p. 507-512, Dec. 2003.

VERMA, S. C.; CHOWDHURY, S. P.; TRIPATHI, A. K. Phylogeny based on 16S rDNA and nifH sequences of *Ralstonia taiwanensis* strains isolated from nitrogen-fixing nodules of *Mimosa pudica*, in India. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 50, n. 5, p. 313–322, May 2004.

WANDER, A. E. **Introdução e Importância Econômica in: Cultivo do Feijão Irrigado na Região Noroeste de Minas Gerais**. 2005. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoIrrigadoNoroesteMG/index.htm.

WATKIN, E. L. J.; O'HARA, G. W.; HOWIESON, J. G.; GLENN, A. R. Identification of tolerance to soil acidity in inoculant strains of *Rhizobium leguminosarum bv. trifolii*. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 32, n. 10, p. 1393-1403, 2000.

WOOD, M. A mechanism of aluminium toxicity to soil bacteria and possible ecological implications. In: DATE, R. A.; GRUNDON, N. J.; RAYMENT, G. E.; PROBERT, M. E. (Ed.). **Plant-soil interactions at low pH:** principles and management. Dordrecht: Kluwer, 1995. p. 173-179.

XU, Y.; YOKOTA, A.; SANADA, H.; HISAMATSU, M.; ARAKI, M.; CHO, H. J.; MORINAGA, T.; MUROOKA, Y. *Enterobacter cloacae* A 105, isolated from the surface of root nodules of *Astragalus sinicus cv. Japan*, stimulates

nodulation by *Rhizobium huakuii bv. renge.* **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 77, n. 6, p. 630-635, 1994.

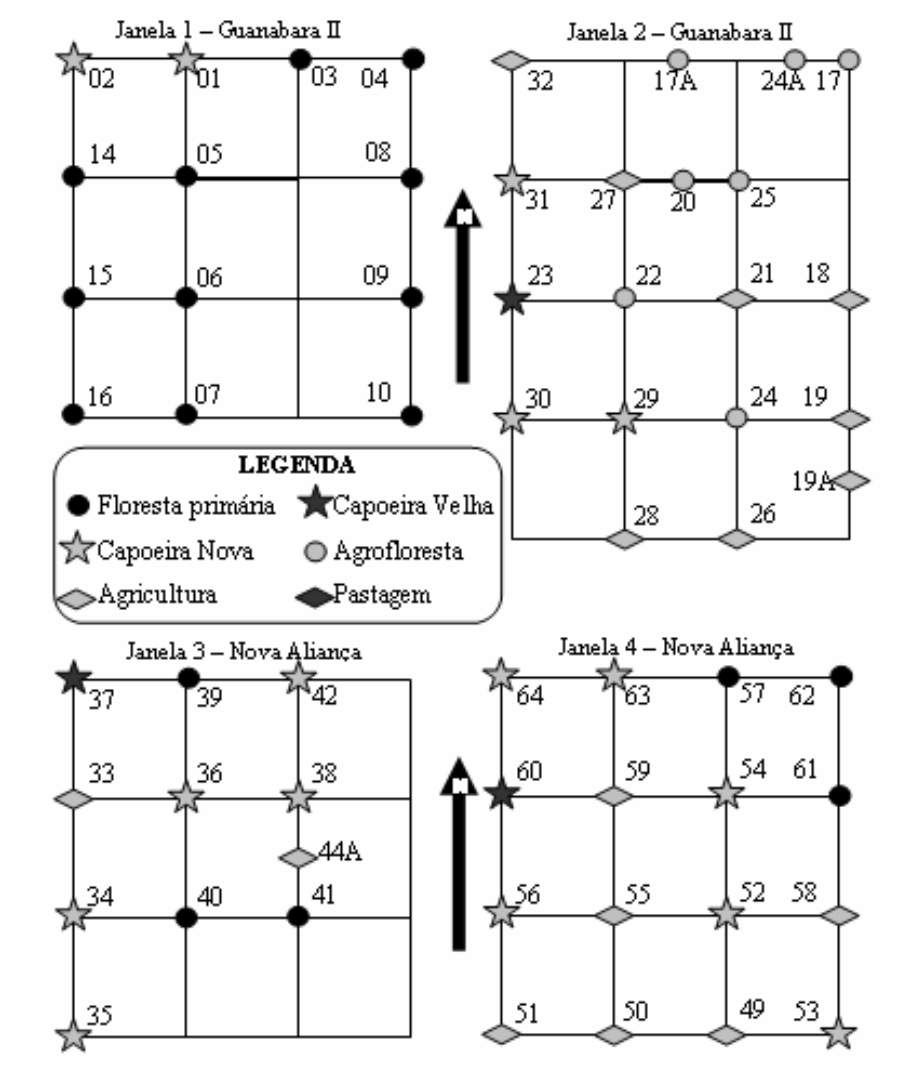
ZAKHIA, F.; JEDER, H.; WILLEMS, A.; GILLIS, M.; DREYFUS, B.; DE LAJUDIE, P. Diverse Bacteria Associated with Root Nodules of Spontaneous Legumes in Tunisia and First Report for *nifH*-like Gene within the Genera *Microbacterium* and *Starkeya.* **Microbial Ecology**, New York, v. 51, n. 3, p. 375-393, Apr. 2006.

ZHAO, H.; XIE, B.; CHEN, S. Cloning and sequencing of nifBHDKENX genes of *Paenibacillus massiliensis* T7 and its nif promoter analysis. **Science in China Serie C – Life Science**, Beijing, v. 49, n. 2, p. 115-22, 2006.

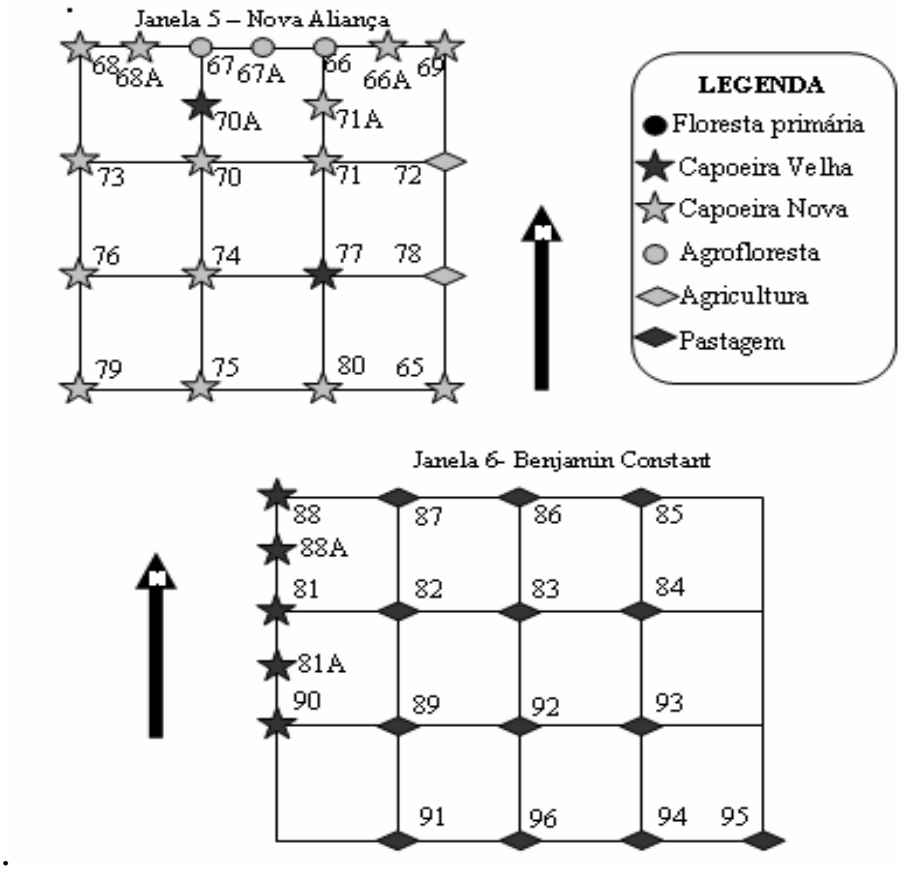
ANEXOS

ANEXO		Página
01	Croqui de campo das áreas amostradas	122

ANEXO 01 Croqui de campo das pontos amostradas.



ANEXO 01 Croqui de campo das pontos amostradas (continuação).



Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo