

**DIVERSIDADE E EFICIÊNCIA DE
BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS DE
DIFERENTES LEGUMINOSAS DA REGIÃO
DO ALTO SOLIMÕES, AM**

MICHELE APARECIDA PEREIRA DA SILVA

2010

MICHELE APARECIDA PEREIRA DA SILVA

**DIVERSIDADE E EFICIÊNCIA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE
NÓDULOS DE DIFERENTES LEGUMINOSAS DA REGIÃO DO ALTO
SOLIMÕES, AM**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Profª. Dra. Fatima Maria de Souza Moreira

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Silva, Michele Aparecida Pereira da.

Diversidade e eficiência de bactérias isoladas de nódulos de diferentes leguminosas da região do Alto Solimões, AM / Michele Aparecida Pereira da Silva. – Lavras : UFLA, 2010.

82 p. : il.

Dissertação(mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Fátima Maria de Souza Moreira.

Bibliografia.

1. Fixação biológica do nitrogênio. 2. Sistemas de uso da terra.
3. Rizóbio. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.46

MICHELE APARECIDA PEREIRA DA SILVA

**DIVERSIDADE E EFICIÊNCIA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE
NÓDULOS DE DIFERENTES LEGUMINOSAS DA REGIÃO DO ALTO
SOLIMÕES, AM**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 18 de fevereiro de 2010.

Profa. Dra. Adriana Silva Lima

UFCG

Prof. Dr. Sérgio Miana de Faria

EMBRAPA AGROBIOLOGIA

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

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

Aos meus pais, Enio e Trindade, que torceram pelo meu sucesso acadêmico, além de suportar com ânimo toda barreira. Aos irmãos, Elaine e Everton, pelo carinho e companheirismo prestados durante este tempo.

Ofereço

A **Deus**, que proporcionou-me a oportunidade de desfrutar do conhecimento e fazer dele a fonte maior de toda minha vida!

Ao meu noivo, **Sandro**, meu grande companheiro, pelo amor a mim dedicado em mais uma etapa vencida!

Dedico

AGRADECIMENTOS

Tornar público os agradecimentos sobre um trabalho para a elaboração de uma dissertação de mestrado implica em considerar o desagradável perigo da omissão, por esquecimento ou descuido, de nomes de pessoas que, por meio de uma simples palavra ou gesto, estendendo a mão ou acenando nos momentos mais difíceis, contribuíram para o sucesso, não só do trabalho acadêmico, mas de uma contribuição científica em benefício do nosso país. Assim, desde já, antecipo minhas desculpas àquelas pessoas que, porventura, sejam aqui omitidas.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade de realização do curso.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Fatima Maria de Souza Moreira, pela valiosa oportunidade de ingressar na iniciação científica em 2004, no setor de Microbiologia do Solo do DCS/UFLA e pelo grande exemplo de profissionalismo.

Ao projeto GEF/UNEP-GF2715-02 (CSM-BGBD) pelo apoio financeiro. Este trabalho faz parte do projeto internacional: *Conservation and Sustainable Management of Below Ground Biodiversity*, implementado em sete países- Brasil, Costa do Marfim, Índia, Indonésia, Quênia, México e Uganda. Este projeto é coordenado pelo Tropical Soil Biology and Fertility Institute of CIAT (TSBF-CIAT) com financiamento do “Global Environmental Facility” (GEF) e apoio de implementação do “United Nations Environment Program” (UNEP).

Aos membros da banca: Adriana Silva Lima, Sérgio Miana de Faria e Ligiane Aparecida Florentino, pela atenção e disponibilidade.

Às comunidades ribeirinhas Nova Aliança e Guanabara II, por me receberem e permitirem as atividades de campo, além do apoio, empenho e espírito de equipe tão importantes para concretização do trabalho... Experiência ímpar que marcou a minha vida. Também a Acácio, Lucas, professor Juvenil, Jansen, Élson e Andson, pelo companheirismo no trabalho em campo em Benjamin Constant. Também a Rina (Manaus), pelo auxílio no envio das fotos do herbário do INPA.

Ao professor Alfredo Scheid Lopez, com quem aprendi que a vida é muito mais simples do que a gente imagina.

A todos os funcionários Departamento de Ciência do Solo, pelo apoio em todos os momentos.

Aos funcionários Marlene Aparecida de Souza e Manuel Aparecido da Silva, pela valiosa contribuição na execução das análises, além do laço amigo que foi construído nestes cinco anos de convivência!

A Ederson que, mesmo distante, sempre me deu apoio em vários momentos! Obrigada pela disponibilidade para discussões e esclarecimentos.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia do Solo (alguns hoje ausentes no setor), que fizeram parte desta jornada de cinco anos: Adriana, Alexandre, Ana Luiza, Rafaela, Alice, Amanda Azarias, André, Bruno, Cândido, Cláudio, Cleide, Gláucia, Jessé, José Geraldo, Jaqueline, Jerusa, João Paulo, Karina, Krisle, Leandro, Laise, Ligiane, Maryeimy, Maurício, Meire, Michele Rocha, Noelly, Paula, Patrícia, Pedro, Plínio, Priscila Rogério, Romildo, Silvana, Sílvia, Teotônio, Thiago e Wesley. Em especial, a Fernanda Carvalho, Márcia Rufini e Paulo Ademar, que me auxiliaram em algumas etapas do trabalho.

A todos os amigos que conquistei em Lavras.

A todos muito obrigada!!!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO GERAL.....	i
GENERAL ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1.....	1
1 Introdução Geral.....	1
2 Referencial teórico.....	4
2.1 Amazônia: ecossistema biodiverso em risco	4
2.2 Leguminosae: atributos marcantes da família.....	5
2.3 Fixação biológica de nitrogênio: processo mediado por bactérias diazotróficas que nodulam	7
2.4 Diversidade microbiana	9
2.5 Bactérias endofíticas promotoras de crescimento em nódulos de leguminosas.....	14
3 Referências bibliográficas.....	18
CAPÍTULO 2 Diversidade e Eficiência de Bactérias Isoladas de Nódulos de Diferentes Leguminosas da Região do Alto Solimões, Am.....	26
1 Resumo.....	27
2 Abstract.....	28
3 Introdução.....	29
4 Material e métodos.....	32
4.1 Área de estudo e coleta	32
4.2 Isolamento e caracterização cultural.....	35
4.3 Autenticação e eficiência dos isolados.....	39
4.4 Extração , amplificação e sequenciamento de DNA.....	42
4.5 Avaliação da produção de substâncias reguladoras- AIA.....	44
5 Resultados e discussão.....	46
5.1 Isolamento e caracterização cultural.....	46

5.2 Autenticação e eficiência dos isolados.....	55
5.3 Extração, amplificação e sequenciamento do gene 16S rDNA	60
5.4 Avaliação da produção de substâncias reguladoras- AIA.....	67
6 Conclusões.....	70
7 Referências bibliográficas	71
ANEXO.....	78

RESUMO GERAL

SILVA, Michele Aparecida Pereira da. **Diversidade e eficiência de bactérias isoladas de nódulos de diferentes leguminosas da região do Alto Solimões, AM.** 2010. 82 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar fenotipicamente e genotipicamente bactérias isoladas de nódulos coletados de 16 espécies de leguminosas: *Acacia multipinnata*, *Calopogonium mucunoides*, *Desmodium adscendens*, *Dalbergia inundata*, *Entada sp*, *Inga caynnensis*, *Inga edulis*, *Inga heterophylla*, *Inga umbellifera*, *Inga venusta*, *Machaerium floribundum*, *Mimosa pudica*, *Mimosa quadrivalvis*, *Pueraria phaseoloides*, *Piptadenia suaveolens* and *Pitryocarpa pteroclada*. Para isto, coletas foram feitas em vários pontos amostrais alocados em 5 diferentes sistemas de uso da terra (SUTs) na região do Alto Solimões, AM: capoeira nova, capoeira velha, agrofloresta, agricultura e pastagem. Três nódulos de cada espécie em cada SUT foram selecionados para isolamento, onde todos os morfotipos obtidos em placas foram isolados e caracterizados culturalmente. Além disso, avaliou-se a eficiência desses isolados na fixação de nitrogênio em simbiose com *Macropodium atropurpureum* para isolados representantes dos grupos culturais. Os isolados que não nodularam siratro e estimularam o crescimento da planta estatisticamente maior que controle absoluto foram avaliados considerando a produção de ácido indol-3-acético. O gene 16S rDNA foi parcialmente seqüenciado para isolados representantes e submetidos à análise filogenética.

*Orientadora: Fatima Maria de Souza Moreira – UFLA.

GENERAL ABSTRACT

SILVA, Michele Aparecida Pereira da. **Diversity and efficiency of bacteria isolated from nodules of different leguminosae species from Alto Solimões, AM region.** 2010. 82 p. Dissertation (Master in Agricultural Microbiology) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

This work aimed to isolate and characterize phenotypically and genotypically bacterial isolates from nodules collected from 16 leguminous species: *Acacia multipinnata*, *Calopogonium mucunoides*, *Desmodium adscendens*, *Dalbergia inundata*, *Entada sp*, *Inga caynnensis*, *Inga edulis*, *Inga heterophylla*, *Inga umbellifera*, *Inga venusta*, *Machaerium floribundum*, *Mimosa pudica*, *Mimosa quadrivalvis*, *Pueraria phaseoloides*, *Piptadenia suaveolens* and *Pitryocarpa pteroclada*. For this, collections were made in several sampling points allocated in 5 different land use systems (LUSs) in Alto Solimões, AM region: young secondary forest, old secondary forest, agroforest, agriculture and pasture. Three nodules of each species in each LUS were selected for isolation, from which all morphotypes obtained in plates were isolated and characterized culturally. Besides that the nitrogen fixing efficiency in symbiosis with *Macropitilium atropurpureum* were evaluated for representative isolates of cultural groups. Isolates which did not nodulate siratro and stimulate plant growth statistically higher than the absolute control were assessed regarding the production of ndole-3-acetic acid. 16S rDNA gene were partially sequenced for representative isolates and submitted to phylogenetic analysis.

* Advisor: Fatima Maria de Souza Moreira – UFLA.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO GERAL

As florestas tropicais são ecossistemas que abrigam alta biodiversidade, abrangendo desde animais superiores até microrganismos. Essa variabilidade genética tem grande contribuição para a manutenção do equilíbrio do ecossistema e sua redução é objeto de preocupação atualmente. À exceção de animais e plantas superiores, o conhecimento da diversidade microbiológica em termos de riqueza de espécies, distribuição local e global e função no ecossistema, permanece ainda bastante incompleto (Lewinsohn, 2006).

Na Amazônia, essa redução na biodiversidade de microrganismos está ligada ao fato da transição de áreas naturais para paisagens antrópicas que vão selecionando a predominância de grupos específicos e que afetam a estabilidade e a resiliência funcional dos ecossistemas (Moreira & Siqueira, 2006). Os efeitos das mudanças no uso do solo afetam drasticamente esses procariotos que estão presentes no solo e também sua relação com os outros fatores bióticos do ecossistema, demonstrando claramente a interdependência da biodiversidade acima e abaixo do solo (Jesus et al., 2005; Jesus et al., 2009; Lima et al., 2009).

Na Amazônia, há ampla distribuição geográfica das leguminosas, representadas por diversas espécies (Silva et al., 1989) e a investigação de bactérias fixadoras de nitrogênio que formam simbiose com leguminosas é tarefa indispensável, principalmente no que diz respeito à diversidade, já que esta desempenha papel importantíssimo na entrada de nitrogênio no sistema. O nitrogênio participa da formação de moléculas fundamentais em diversos processos biológicos, tais como a produção de ácidos nucleicos e proteínas. Por ser elemento essencial, seu balanço afeta a formação de raízes, a fotossíntese, a produção e a translocação de fotoassimilados entre folhas e raízes, sendo o

crescimento foliar primeiramente afetado. E, para esta busca, a utilização das metodologias moleculares tem levado a uma grande mudança na perspectiva da diversidade microbiana, porém, não dispensa o uso dos dados fenotípicos e assim tem se adotado uma taxonomia polifásica (integração de dados fenotípicos e genotípicos) para a identificação de novos microrganismos.

Os benefícios científicos esperados de um maior conhecimento sobre a diversidade microbiana são extensos (Hunter-Cevera, 1998). Entre eles, destacam-se a melhor compreensão das funções exercidas pelas comunidades microbianas nos ambientes e o conhecimento das suas interações com outros componentes da biodiversidade.

Estudos recentes de diversidade de bactérias isoladas de nódulos por meio da análise filogenética do gene 16SrRNA têm identificado gêneros de bactérias diferentes daqueles que nodulam leguminosas (Li et al., 2008). Aparentemente, essas bactérias não causaram nenhum efeito prejudicial para a planta, mas revelaram potencialidade na produção de AIA (ácido indol-3-acético), mesmo não tendo efeito significativo no crescimento e nodulação de soja.

Estudos que visem identificar a ocorrência, a diversidade e a eficiência de bactérias que nodulam leguminosas, assim como o de bactérias endofíticas desses nódulos podem fornecer informações importantes sobre a ecologia desses microrganismos na região amazônica.

Este trabalho faz parte da segunda fase do projeto *Conservation and Sustainable Management of Below-Ground Biodiversity*, financiado pelo GEF e implementado pelo United Nations Environmental Programme (UNEP) que está sendo executado em sete países: Brasil, Costa do Marfim, Índia, Indonésia, Kênia, México e Uganda e visa despertar a consciência e a compreensão sobre a biodiversidade do solo (Projeto GF/2715-02). Assim, este trabalho foi realizado com os objetivos específicos de: isolar e caracterizar fenotípica e

genotipicamente bactérias presentes em nódulos de diferentes leguminosas. Além disso, buscou-se verificar a eficiência de populações dessas bactérias, noduladas ou não por siratro (*Macropodium atropurpureum*), verificando se a produção de ácidoindolacético contribuiu para o incremento da parte aérea desta leguminosa e se os sistemas de uso da terra na região do Alto Solimões, AM, alteram a comunidade de bactérias isoladas desses nódulos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Amazônia: ecossistema biodiverso em risco

A Amazônia revela ser uma das maiores florestas tropicais do planeta, ocupando uma área equivalente a 5 000 000 km², que corresponde a 60% do território nacional (Fearnside, 2002). Além disso, é o maior bioma da América do Sul e do Brasil, abrigando alta diversidade biológica.

A floresta tropical densa de terra firme que cobre a maior parte da região se situa predominantemente em solos de baixa fertilidade natural e sua produtividade se deve à alta diversidade vegetal, composta por espécies nativas adaptadas às condições climáticas e nutricionais do solo (Luizão, 2007). A liberação dos nutrientes minerais e nutricionais contidos na serrapilheira e na matéria orgânica do solo é essencialmente controlada pela biota do solo. Porém, o desmatamento vem aumentando em função dos cultivos agrícolas que, na maioria, são monoculturas, ou pastagens, representando impactos severos na cobertura vegetal (Nepstad et al., 1999). A Amazônia será drasticamente alterada nos próximos 20-25 anos; poucas áreas manterão florestas intactas, exceto aquelas que se situam na região oeste da Amazônia (Fearnside, 2002).

Diferentes sistemas de uso da terra exercem grande influência sobre os microrganismos e seus processos. Os efeitos das mudanças do uso do solo, como a remoção da vegetação nativa para a introdução de florestas plantadas, o cultivo de subsistência, o cultivo comercial ou a formação de pastagens, sobre a diversidade microbiana têm sido demonstrados sistematicamente para microrganismos do solo na região amazônica (Jesus et al., 2005; Jesus et al., 2009; Lima et al., 2005; Lima et al., 2009). As mudanças que vêm ocorrendo neste bioma trarão implicações importantes quanto à perda da biodiversidade e outros serviços ambientais, sendo essa perspectiva um desafio para toda a comunidade científica. A transição de área natural para paisagens antrópicas

induzirá a perdas significativas da diversidade como um todo (Soares-Filho et al., 2005).

Os conhecimentos do uso da terra e da cobertura do solo possibilitam de forma eficaz correlacionar e interpretar a variabilidade espacial da biodiversidade (Medonça-Santos et al., 2008). Reconhecer esses parâmetros é um passo importante para verificar como as modificações nos ecossistemas afetam a diversidade e as atividades dos organismos no solo. Estes não são apenas seus habitantes, mas também seus componentes. A biodiversidade e a atividade biológica estão estreitamente e diretamente relacionadas a funções e a características essenciais para a manutenção da capacidade produtiva dos solos.

A Amazônia, em escala global, tem sido desvalorizada em projetos de priorização para conservação global. Myers et al. (2000) não a incluem na lista dos hotspots, justificando que esse ecossistema tem áreas com alta diversidade e habitats intactos. Porém, não se atentou para o fato de que a alteração da paisagem continua e que, quando o bioma, for apontado como uma área prioritária para conservação, muitas das espécies já poderão estar extintas.

Assim como as Florestas Atlânticas e o Cerrado, a Amazônia merece prioridade de conservação (Bates & Demos, 2001).

2.2 Leguminosae: atributos marcantes da família

A família Leguminosae possui distribuição cosmopolita, incluindo cerca de 19.327 espécies em 727 gêneros. É subdividida em 3 subfamílias: Papilionoideae, Caesalpinoidea e Mimosoideae (Lewis et al., 2005). Esta questão da classificação das leguminosas tem sido alvo de divergência entre estudiosos de leguminosas. A maioria deles que se baseia em dados macromoleculares e cladísticos consideram as leguminosas em uma única família - Leguminosae - e não aceitam o posicionamento de Cronquist (1988) que as consideram em três famílias distintas (Fabaceae, Caesalpiniaceae e

Mimosaceae). Outros autores, mesmo considerando as leguminosas em uma única família e os parâmetros evolutivos, as denominam de Fabaceae.

A subfamília Caesalpinoideae compreende 2.250 espécies; Mimosoideae, 3.270 espécies e Papilionoideae, 13.800 espécies, abrangendo árvores, lianas, ervas e arbustos (Lewis et al., 2005). Cada uma dessas famílias apresenta características peculiares que facilitam sua identificação no campo (Souza & Lorenzi, 2005).

O destaque no cenário brasileiro é notório, pois a família Leguminosae representa uma das maiores famílias de angiospermas, cerca de 10% do número total existente e sua importância é relevante, tanto no setor ecológico quanto no setor econômico. Economicamente, as leguminosas se destacam, pois são produtoras de óleos e resinas, frutos e sementes, que são utilizados como alimentos e as madeiras estão entre as mais valiosas do mundo (Graham & Vance, 2003). Ecologicamente falando, essas leguminosas são capazes de se associarem a bactérias diazotróficas, comumente chamadas de “rizóbio”, fixando o nitrogênio do ar, elemento importante no desenvolvimento das plantas.

Na Amazônia, há ampla distribuição geográfica das leguminosas, representada por diversas espécies (Silva et al., 1989). Esta família tem se evidenciado na maioria dos inventários florísticos desenvolvidos, apresentando abundância em matas primárias de terra firme (Moreira et al., 1992; Oliveira et al., 2008; Oliveira & Amaral., 2004).

Ressalta-se que os inventários florísticos na Amazônia representam uma tarefa árdua nas investigações científicas. Alguns problemas são muito complexos neste bioma, como a extensão territorial, a diversidade florística, o acesso às áreas, a altura de árvores e a escassez de taxonomistas. Tudo isso indica que muito ainda se tem por descobrir e que a pesquisa deve continuar, visto quão amplo e diverso se apresenta este ecossistema.

2.3 Fixação biológica de nitrogênio: processo mediado por bactérias diazotróficas

Bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas (BFNNL) são microrganismos abundantes nos solos de muitos ecossistemas e desempenham papel importante quanto à entrada de nitrogênio no sistema. Essas bactérias apresentam elevada diversidade e ampla variabilidade quanto à eficiência simbiótica e formam estruturas altamente específicas, os nódulos, onde ocorre a conversão do N₂ atmosférico a amônia, que é, então, incorporada em diversas formas de N orgânico para a utilização por algumas plantas, principalmente da família Leguminosae.

Em 2001, isolados capazes de induzir nódulos em leguminosas e fixar nitrogênio foram identificados como pertencentes à subdivisão beta do filo Proteobactéria (Moulin et al., 2001). Essa descoberta ampliou ainda mais a distribuição de bactérias capazes de induzir nódulos em leguminosas, já que eram identificadas todas como sendo pertencentes à subdivisão alfa de Proteobactéria. Atualmente, portanto, têm-se conhecidos os seguintes gêneros: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*, *Burkholderia*, *Methylobacterium*, *Bastobacter*, *Devosia*, *Ralstonia* e *Ochrobactrum* (Moreira & Siqueira, 2006). Aliado ao fato da existência de um grande número de espécies de leguminosas e que nem todas foram analisadas quanto à diversidade dos microssimbiontes associados, é plausível imaginar que a diversidade de grupos de microrganismos seja superior ao identificado até o presente momento.

As leguminosas evoluíram há a, aproximadamente, 60 milhões de anos e a nodulação, há 58 milhões de anos, não sendo esta última característica na família Leguminosae constatada em todas as subfamílias. Papilionoideae é a que apresenta maior número de espécies nodulíferas, seguida de Mimosoideae e Caesalpinoideae (Barberi et al., 1998; Faria et al., 1999; Sprent, 2006). Levantamentos sobre a capacidade de nodulação na região Amazônia foram realizados, tendo o primeiro relato sobre esta característica em várias espécies

florestais (Moreira et al., 1993a; Moreira et al., 1993b; Moreira et al., 1993c). Além disso, foram também consideradas condições de viveiro, uma questão importante a ser relevada quando se faz este tipo de trabalho, pois, no campo, alguns fatores podem impedir o estabelecimento da simbiose, que passa a não existir em condições mais controladas para a expressão da nodulação.

Depois do carbono (C) e do hidrogênio (H), o nitrogênio (N) é o elemento mais importante na constituição da matéria orgânica, representando de 8% a 16% do total. O nitrogênio participa da formação de moléculas fundamentais em diversos processos biológicos, tais como a produção de ácidos nucleicos e proteínas. Por ser elemento essencial, seu balanço afeta a formação de raízes, a fotossíntese, a produção e a translocação de fotoassimilados entre folhas e raízes, sendo o crescimento foliar primeiramente afetado. Apesar de sua abundância na atmosfera na forma de N_2 (78%), o nitrogênio constitui, junto com água, o principal fator limitante da produção agrícola mundial, pois nenhum animal ou planta é capaz de utilizá-lo diretamente, devido à tripla ligação que existe entre os dois átomos do N_2 , que é uma das mais fortes de que se tem conhecimento na natureza.

A fixação do nitrogênio, parte do ciclo biogeoquímico deste elemento, pode ser realizada por processos industriais que contribuem com 25% do total de nitrogênio fixado e por processos físicos como relâmpagos, combustão e vulcanismo, cuja contribuição com o total de nitrogênio fixado é de 10%. Porém, a maior contribuição está na fixação biológica de nitrogênio, responsável por 65% do total de nitrogênio fixado anualmente (Moreira & Siqueira, 2006).

Nos nódulos, as bactérias fixadoras de nitrogênio precisam de ATP para consolidar o processo. Nessas estruturas, existem substâncias, chamadas leg-hemoglobinas, que transportam oxigênio (essencial no processo) em taxas adequadas ao microsimbionte (Ott et al., 2005), o qual consegue quebrar a tripla ligação do N_2 pela ação de um complexo enzimático e fixar o nitrogênio

biologicamente. Com esse mecanismo alternativo é possível economizar milhões de dólares de petróleo e gás natural (fontes energéticas não renováveis), contribuindo para reverter o quadro de queda de produtividade do país e assim aumentar a média nacional de produção sem o uso de adubos nitrogenados.

Uma consideração importante a ser tratada são os fatores estressantes que afetam a planta. Estes refletem na simbiose estabelecida pelas bactérias diazotróficas. Dessa forma, fatores externos, como extremos de temperatura, déficit hídrico, acidez e contaminação dos solos com metais pesados, podem afetar o vigor da planta, afetando, conseqüentemente, a fixação de nitrogênio pelos “rizóbios”. Este processo é um mecanismo de nutrição de nitrogênio que gasta muita energia.

As leguminosas precisam investir carbono fixado para manter as bactérias nodulíferas. Por isso, a FBN é suprimida quando a disponibilidade de N no solo é suficiente (Jacob Neto et al., 1998). Além disso, a carência de nutrientes, como o fósforo, pode limitar a FBN e também a produção de biomassa nos sistemas naturais tropicais, em que é pouco disponível na maioria dos solos (Peoples & Craswell, 1992; Krolow et al., 2004).

Definitivamente, a fixação biológica de nitrogênio é imprescindível. Daí a importância da investigação científica nesses procariotos diazotróficos, organismos responsáveis pela sustentabilidade do ecossistema.

2.4 Diversidade microbiana

Quando se fala em biodiversidade, desmatamento ou extinção de espécies em florestas tropicais, somente as espécies vegetais ou animais são apontadas, como, por exemplo, *Cedrela fissilis* ou o mico-leão-dourado, respectivamente. São bem-vindas todas as lutas em prol da preservação desses animais, porém, se esquece que seres importantíssimos, como os microrganismos estão sendo dizimados.

Assim, quando alguma catástrofe ambiental acontece, não só animais e vegetais, mas também os microrganismos são afetados e muitos deles não têm habilidades locomotoras, como outros seres vivos (Azevedo, 1998). Mas, por um lado, os pesquisadores se deparam com alguns empecilhos, no que diz respeito à autorização do governo federal, nos estudos da diversidade. Assim, espera-se que, no Brasil, possa haver uma simplificação na regulamentação de acesso para a pesquisa, pois só dessa forma o conhecimento da biodiversidade, que é o “ouro verde” para os brasileiros, poderá contribuir para o desenvolvimento do país (Clement, 2007).

Por definição, a diversidade biológica consiste na variabilidade entre organismos vivos de qualquer origem, incluindo, entre outros, ecossistemas terrestres, marinhos e outros ecossistemas aquáticos, e os complexos ecológicos de que fazem parte. Isso inclui diversidade dentro de espécies, entre espécies e de ecossistemas), um termo amplo que abrange desde microrganismos até organismos superiores, como os animais (Lewinsohn, 2006).

Nos estudos de diversidade envolvendo a captura de bactérias por meio do uso de métodos indiretos, plantas iscas são consideradas variáveis importantes, uma vez que a diversidade do solo pode ser retratada tal como ocorre no mesmo. Mas, pode ser que essas leguminosas consideradas promíscuas não nodulem com todos os gêneros ou espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio presentes no local da coleta deste solo e, assim, o uso de mais de uma planta isca é indicado nesse tipo de estudo. Já os métodos diretos envolvendo ferramentas moleculares são recomendáveis e úteis quando aplicados nos estudos de diversidade, porém, são onerosos e devem ser usados com cautela para que não haja desperdício de tempo e dinheiro (Moreira & Siqueira, 2006).

A diversidade biológica pode ser medida em vários níveis taxonômicos (família, gênero, intraespécie, etc.) ou, ainda, em termos de determinadas

características genéticas ou fenotípicas (morfológicas, bioquímicas, fisiológicas e simbióticas). Por outro lado, em termos moleculares, a diversidade é caracterizada pelo número de diferentes tipos de sequências de DNA encontradas no ambiente. À exceção de animais e plantas superiores, o conhecimento da diversidade microbiológica, em termos de riqueza de espécies, distribuição local e global, e função no ecossistema, permanece ainda bastante incompleto (Azevedo, 1998).

Os benefícios científicos esperados de um maior conhecimento sobre a diversidade microbiana são extensos (Hunter-Cevera, 1998). Entre eles, destaca-se a melhor compreensão das funções exercidas pelas comunidades microbianas nos ambientes e o conhecimento das suas interações com outros componentes da biodiversidade. E a principal razão para o baixo número de espécies formalmente descritas é a necessidade de cultivo celular no processo de identificação dos microrganismos, o que, na grande maioria das vezes, não é possível pelo fato de apenas uma pequena fração dos microrganismos (<10% em solos e <1% em ambientes aquáticos) ser usualmente recuperada em estudos baseados em isolamento e cultivo. A utilização das metodologias moleculares levou, portanto, a uma drástica mudança na perspectiva da diversidade microbiana, porém, não dispensa o uso dos dados fenotípicos e adota-se uma taxonomia polifásica (integração de dados fenotípicos e genotípicos) para a identificação de novos microrganismos. Dentre esses dados fenotípicos, características simbióticas, culturais, morfológicas, bioquímicas e fisiológicas, destaca-se a caracterização cultural de colônias em que são avaliadas a produção de expolissacarídeos, o tamanho, a forma, a cor, o tempo de aparecimento de colônias e a alteração do pH do meio de cultura (Moreira, 1991; Jordan, 1984).

As características culturais podem ser o passo primordial para classificar novos microrganismos e auxiliar nos estudos de diversidade. Jesus et al. (2005), por meio da caracterização cultural de isolados, encontraram ampla diversidade

de grupos culturais de BFNNL em solos cultivados com pupunha, mandioca e floresta primária na região do Alto Solimões na Amazônia. Estes autores constataram que a maioria dos isolados que acidificaram o meio de cultura apresentou características culturais dos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium*. Já aqueles que alcalinizaram o meio de cultura apresentaram características culturais de *Bradyrhizobium*. Dos sistemas de uso trabalhados, nas áreas cultivadas com mandioca foi registrada maior diversidade e esse resultado indicou que os sistemas de uso alteraram as comunidades de BFNNL.

As características culturais, no entanto, não geram informações sobre as relações evolutivas entre os organismos e as técnicas moleculares vieram para suprir essa deficiência dos métodos tradicionais. Mas, mesmo assim, por meio dessas características, os gêneros de rizóbio descritos até o momento podem ser diferenciados em meio de cultura 79 (Fred & Waksman, 1928).

Com o advento das técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) (Saiki et al., 1988) e sequenciamento de DNA (Sanger et al., 1977), os métodos moleculares, especialmente aqueles baseados no estudo da sequência do 16S rDNA, têm sido muito úteis na descoberta de novos microrganismos. É uma das técnicas mais utilizadas na detecção e identificação de microrganismos em ambientes naturais e que ganhou grande impulso nos últimos anos.

Esta técnica permite amplificar segmentos pequenos e específicos do DNA, pela qual se obtêm, “in vitro”, várias cópias de um segmento de DNA, previamente conhecido. Para se fazer a amplificação de certa sequência de DNA, é necessário fazer, em primeiro lugar, a extração do DNA, depois sua amplificação (PCR) com algum “primer” (oligonucleotídeo iniciador) em um termociclador (Fungaro & Vieira, 1998). Comparações entre as sequências de nucleotídeos completas ou parciais do 16S rRNA têm sido amplamente utilizadas para avaliar relações filogenéticas entre muitas espécies de bactérias fixadoras de nitrogênio (Moulin et al., 2001, Moreira et al., 2006; Lima et al.,

2009). Em estudos de diversidade de microrganismos, a técnica de PCR é utilizada em várias metodologias, como, por exemplo, na análise de restrição do rDNA amplificado (ARDRA), no polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição terminal (TRFLP), na amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD), na análise do espaço ribossomal intergênico (RISA), na eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), na eletroforese em gel de gradiente de temperatura (TGGE) e no polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP) (Kirk et al., 2004).

O uso de marcadores moleculares para investigar a estrutura e a diversidade de comunidades microbianas tem possibilitado o desenvolvimento de uma nova metodologia no estudo dos aspectos característicos da ecologia desses organismos (Jesus & Moreira, 2008). Um marcador molecular confiável para análises filogenéticas deve possuir as características seguintes: ser distribuído universalmente, ser estrutural e funcionalmente homólogo, permitir o alinhamento das sequências e as mudanças nas sequências devem ocorrer proporcionalmente à distância evolucionária. Desse modo, os marcadores moleculares atuam como relógios moleculares.

Um relógio molecular pode ser definido como uma molécula cuja sequência muda aleatoriamente com o tempo, segundo uma velocidade constante de mudança (nucleotídeos por milhão de anos). Com base no produto tempo vezes velocidade de mudança, pode-se determinar a relação filogenética entre duas sequências de organismos diferentes provindas de um ancestral comum (Woese, 1987).

As sequências de 16S rDNA se tornaram padrão na determinação de relações filogenéticas, na avaliação da diversidade em amostras ambientais e na detecção e quantificação de populações específicas (Woese, 1987). A escolha do 16S rDNA decorreu do fato de apresentar todas as características necessárias a um marcador molecular ideal: possui distribuição universal, estrutura e função

conservadas entre os taxa e tamanho grande o suficiente que permita o aparecimento de divergências na sequência. Por fim, o grande número de sequências de 16S rDNA disponíveis atualmente no Genbank, banco de sequências público National Center for Biotechnology Information – NCBI (2009), favorece ainda mais o uso desse gene como marcador molecular filogenético por permitir uma vasta gama de comparações.

Estudos de diversidade genética em diferentes sistemas de uso na Amazônia Ocidental demonstraram que os isolados capturados por siratro, quando comparados ao banco de dados, foram filogeneticamente relatados como bactérias nodulíferas de leguminosas pertencentes aos filos α e β proteobactéria (Lima et al., 2009). Além disso, o siratro, espécie leguminosa promíscua, mostrou-se eficiente na captura de diferentes gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio.

Estudos que visem identificar a ocorrência, a diversidade e a eficiência de BFNNL podem fornecer informações importantes sobre a ecologia desses microrganismos, principalmente na região Amazônica, onde poucos trabalhos foram realizados com BFNNL (Magalhães et al., 1982; Moreira et al., 1992; Pereira, 2000; Jesus et al. 2005, Nóbrega, 2006; Barberi, 2007; Neves, 2007; Lima et al., 2009; Guimarães, 2009; Jaramillo; 2010).

2.5 Bactérias endofíticas promotoras de crescimento em nódulos de leguminosas

As bactérias estão entre os organismos vivos mais diversos na Terra e podem compreender mais de um milhão de espécies. Apesar dessa grande diversidade, estima-se que se tenha conhecimento de apenas uma pequena fração das bactérias existentes (Torsvik et al., 2002). Estão presentes em todos os ambientes terrestres e, por meio de sua atividade metabólica, afetam as propriedades químicas e físicas de todo o ambiente à sua volta (Newman &

Banfield, 2002), ocupando e colonizando todos os nichos possíveis, como o sistema digestório de animais superiores e materiais mortos, água doce e salgada, interior de rochas e geleiras, fontes termais submarinas e até a superfície e o interior de plantas, como é o caso de bactérias endofíticas.

Bactérias endofíticas são assim denominadas por viverem no interior das plantas sem causar danos visíveis (Hallmann et al., 1998), mas, dependendo da situação, podem agir na planta como um patógeno (Sabaratnam & Beattie, 2003). Em colmo, folhas e nódulos de trevo vermelho, Sturz et al. (1997) mostraram colonização pelos endofíticos *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter agglomerans*, *Rhizobium* spp., *Agrobacterium* spp., *Curtobacterium* spp., *Bacillus* spp., *Bordetella* spp., *E. coli*, *Pasteurella* spp., *Pseudomonas* spp. e *Xanthomonas*. Recentes trabalhos identificaram bactérias endofíticas dos gêneros *Pantoea*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Agrobacterium* e *Burkholderia*, em nódulos de leguminosas, por meio da análise filogenética do gene 16SrRNA (Li et al., 2008). Os mesmos autores verificaram que essas bactérias não causaram nenhum efeito prejudicial para a planta, mas revelaram grande potencial na promoção de crescimento da planta pela produção de AIA (ácido indol-3-acético). A maioria dos endofíticos dos nódulos é de *Agrobacterium tumefaciens*, mas *Bacillus* e *Pseudomonas* também podem ser isoladas de nódulos (Mrabet et al., 2006). Lima et al. (2009) também verificaram alguns gêneros incomuns em nódulos de siratro que, provavelmente, também poderiam ser bactérias endofíticas, mas precisariam ser mais bem estudadas para a confirmação de que estas bactérias endofíticas de leguminosas seriam realmente bactérias nodulíferas.

Quanto à promoção de crescimento vegetal pelas bactérias endofíticas, este se dá principalmente pela produção de fitormônios, como auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno pelas bactérias endofíticas. A produção desses fitormônios já foi relatada em várias bactérias, como

Gluconoacetobacter, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Erwinia*, *Pantoea* e *Pseudomonas* (Lee, 2004; Zakrahova et al., 1999; Kuklinsky-Sobral, 2004). O ácido indol-3-acético é uma auxina importante de ocorrência natural que provoca efeitos fisiológicos na planta e que pode ter três vias metabólicas: indole-3-acetamida (IAM), indole-3-piruvato (IpyA) e triptamina (TAM) (Theunis et al., 2004). Além disso, esta substância afeta consideravelmente a morfologia da raiz, o que possibilita maior entrada de nutrientes e exsudação radicular. Em 34% dos isolados de soja identificados como *Pseudomonas*, *Bukholderia* e *Enterobacter* foi verificado o potencial para a promoção do crescimento vegetal pela produção do fitormônio AIA (Kuklinsky-Sobral et al., 2004).

Os mecanismos para explicar a existência dessas bactérias em nódulos ainda não estão claros e precisam ser aprimorados por meio de pesquisa para esclarecer essas evidências e assim haver maior exploração do potencial que as mesmas têm para o crescimento vegetal.

As bactérias diazotróficas ocupam nichos distintos, podendo ser de vida livre, associativos e simbióticos. Um grupo de bactérias endofíticas presentes em diferentes espécies vegetais também é composto pelas bactérias diazotróficas, capazes de fixar nitrogênio. Esse processo biológico foi inicialmente descrito em bactérias diazotróficas da rizosfera e do rizoplane de uma grande variedade de plantas não-leguminosas (Döbereiner, 1992). Porém, evidências recentes mostram que algumas bactérias diazotróficas colonizam o interior da planta e são conhecidas como bactérias endofíticas fixadoras de nitrogênio (Olivares et al., 1996).

Gramíneas de importância econômica, tais como cana-de-açúcar, já foram identificadas como hospedeiras de diversas espécies de bactérias endofíticas diazotróficas (Boddey et al., 2003). Esses endofíticos colonizam seus hospedeiros em grande número e causam um aumento na produção das culturas,

havendo a possibilidade de substituição do nitrogênio mineral pela fixação biológica de nitrogênio que, além de econômica, é ambientalmente vantajosa.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, J. L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: **Ecologia microbiana**. In: (Ed.). MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Jaguariúna: Embrapa/CNPMA, p.445-461, 1998.
- BARBERI, A. **Diversidade e eficiência de bactérias que nodulam feijoeiro de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental**. 2007. 121p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- BARBERI, A.; CARNEIRO, M. A. C.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Nodulação em leguminosas florestais em viveiros no sul de Minas Gerais. **Cerne**, Lavras, v. 4, n. 1, p. 145-153, 1998.
- BATES, J. M.; DEMOS, T. C. Do you need to devalue Amazônia and other large tropical forests? **Diversity and Distributions**, London, v. 7, n. 6, 249-255, Sept. 2001.
- BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 252, n. 1, p. 139-149, May 2003.
- CHEN, W. M.; MOULIN, L.; BONTEMPS, C.; VANDAMME, P.; BÉNA, G.; BOIVIN-MASSON, C. Legume symbiotic nitrogen fixation by B-Proteobacteria is widespread in nature. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 185, n. 24, p.7266-7272, Dec. 2003.
- CLEMENT, C. R. Um pote de ouro no fim do arco-íris? O valor da biodiversidade e do conhecimento tradicional associado, e as mazelas da lei de acesso uma visão e proposta a partir da Amazônia. **Amazônia: ciência e desenvolvimento**, Belém, v. 3, n. 5, p. 7-28, jul./dez. 2007.
- CRONQUIST, A. **Evolution and classification of flowering plants**. New York. Columbia University, 1988.
- DÖBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions, endophytic N₂ fixing bacteria. **Ciência e cultura**, Campinas, v. 44, n. 5, p. 310-3113, maio 1992.

FARIA, S. M.; LIMA, H. C.; OLIVARES, F. L.; MELO, R. B.; XAVIER, R. P. Nodulação em espécies florestais: especificidade hospedeira e implicações na sistemática de Leguminosae. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. (Ed.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Lavras: SBCS/UFLA/DCS, 1999. p. 667-686.

FEARNSIDE, P.M. Avança Brasil: Environmental and social consequences of Brazil's planned infrastructure in Amazônia. **Environmental Management**, New York, v. 30, n. 6, p. 735-747, Dec. 2002.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology**: with special reference to the microorganisms of the soil. New York: McGraw-Hill, 1928. 145p.

FUNGARO, M. H. P.; VIEIRA, M. L. C. Aplicações da PCR em ecologia molecular. In: MELO, I. S. AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa/CNPMA, p.205-225,1998.

GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, n. 2, p. 93-106, Mar. 2000.

GUIMARÃES, A. A. **Diversidade genética e eficiência simbiótica de estirpes de bactérias que nodulam feijão-caupi isoladas de solos sob cultivo agrícola na Amazônia ocidental**. 2009. 54 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

HALMMAN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; RODIGUEZ-RABANA, L.; KLOEPPER, J. Interaction between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 30, n. 7, p. 925-937, July 1998.

HUNTER-CEVERA, J. C. The value of microbial diversity. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 1, n. 3, p. 278-285, June 1998.

JACOB NETO, J.; GOI, S. R.; SPRENT, J. I. Efeito de diferentes formas de nitrogênio na nodulação e crescimento de *Acacia Mangium*. **Floresta e Ambiente**, Seropédica, v. 5, n. 1, p. 104-110, jan./dez. 1998.

JESUS, E. C.; MARSH, T. L.; TIEDJE, J. M.; MOREIRA, F. M. S. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **International Society for Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 3, n. 9, p. 1004-1011, Sept. 2009.

JESUS, E. C.; MOREIRA, F. M. S. Métodos moleculares para o estudo de comunidades de bactérias do solo. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. BRUSSAARD, L. **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: UFLA, p. 681-738, 2008.

JESUS, E. C.; MOREIRA, F. M. S.; FLORENTINO, L. A.; RODRIGUES, M. J. 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, D. C. Rhizobiaceae Conn 1938. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.D. BERGEY'S. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. London: Williams and Wilkins, 1984. p. 234-244.

KIRK, J. L.; BEAUDETTE, L. A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J. N.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 58, n. 2, p. 169-188, Aug. 2004.

KROLOW, R. H.; MISTURA, C.; COELHO, R. W.; SIEWERDT, L.; ZONTA, E. P. Efeito do Fósforo e do Potássio sobre o Desenvolvimento e a Nodulação de Três Leguminosas Anuais de Estação Fria. **Revista Brasileira Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 2224-2230, maio 2004.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAUJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 6, n. 12, p. 1244-1251, June 2004.

LEE, S. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome c biogenesis genes. **Journal of Bacteriology**, Oxford, v. 186, n. 16, p. 5384-91, Aug. 2004.

LEWINSOHN, T. M. **Avaliação do estado do conhecimento da biodiversidade brasileira**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2006. 1/2. (Série Biodiversidade, 15).

LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. (Ed.). **Legumes of the world**. Kew: Royal Botanic Gardens, 2005. 577p.

LI, J. H.; WANG, E. T.; CHEN, W. F.; CHEN, W. X. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 238-246, Jan. 2008.

LIMA, A. S.; NÓBREGA, R. S. A.; BARBERI, A.; SILVA, K.; FERREIRA, D. F.; MOREIRA, F. M. S. Nitrogen fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 319, n. 1/2, p. 127-145, June 2009.

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

LUIZÃO, F. Ciclos de nutrientes na amazônia: respostas às mudanças ambientais e climáticas. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 59, n. 3, p. 31-36, jul. 2007.

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, jul. 1982.

MENDONÇA-SANTOS, M. L.; SANTOS, H. G.; COELHO, M. R.; BERNARDI, A. C. C.; MACHADO, P. L. O. A.; MANZATTO, C. V.; FIDALGO, E. C. C. Solos e ocupação de terras na Amazônia Brasileira In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. **Biodiversidade do Solo em Ecossistemas Brasileiros**. Lavras: UFLA, p.66-116, 2008.

MOREIRA, F. M. S. **Caracterização de estirpes de rizóbio isoladas de espécies florestais pertencentes a diversos grupos de divergência de Leguminosae introduzidas ou nativas da Amazônia e Mata Atlântica**. 1991. 158p. Tese (Doutorado em Ciências do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí.

MOREIRA, F. M. S.; CRUZ, L.; FARIA, S. M.; MARSH, T.; ROMERO, E. M.; PEDROSA, F. O.; PITARD, R. M.; YOUNG, J. P.W. *Azorhizobium doebereineriae* sp. Nov. Microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz). Per. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 29, n. 3, p. 197-206, Apr. 2006.

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, M. F. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi I**. Belém: Associação Rizóbio-leguminosas na Amazônia, 1993. v. 1. (Série Botânica, 9).

MOREIRA, F. M. S.; MAGALHÃES, L. M. S.; SILVA, M. F.; MOREIRA, F. W.; SCARCELLO, J. A. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi II**. Belém: Associação Rizóbio-leguminosas na Amazônia, 1993b. v. 2. (Série Botânica, 9).

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

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, M. F.; MOREIRA, F. W.; SOUZA, L. A. G. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi III**. Belém: Associação Rizóbio-leguminosas na Amazônia, 1993c. v. 2. (Série Botânica, 9).

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

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the b-subclass of Proteobacteria. **Nature**, London, v. 411, p. 948-950, June 2001.

MRABET, M.; MNASRI, B.; ROMDHANE, S.B.; LAGUERRE, G.; AOUANI, M. E.; MHAMDI, R. *Agrobacterium* strains isolated from root nodules of common bean specifically reduce nodulation by *Rhizobium gallicum*. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 56, n. 2, p. 304-309, May 2006.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G. A.B.; KENT; J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, London, v. 403, p. 853-858, Feb. 2000.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Rockville, 2009. Disponível em:< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 17 nov. 2009

NEPSTAD, D. C.; VERRÍSSIMO, A.; ALENCAR, A.; NOBRE, C.; LIMA, E.; LEFEBVRE, P.; SCHLESINGER, P.; POTTER, C.; MOUTINHO, P.; MENDOZA, E.; COCHRANE, M.; BROOKS, V. Large-scale impoverishment of Amazonian Forest by logging and fire. **Nature**, London, v. 398, p. 505-508, Apr. 1999.

NEVES, A. A. O. **Eficiência e diversidade de bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio isoladas de solos sob floresta secundária e pastagem na Amazônia Ocidental**. 2007. 92 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

NEWMAN, D. K.; BANFIELD, J. F. Geomicrobiology: how molecular-scale interactions underpin biogeochemical systems. **Science**, Washington, v. 296, n. 5570, p.1071-7, May 2002.

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]**. 2006. 195p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Ocurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominatly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 21, n. 3, p. 197-200, Feb. 1996.

OLIVEIRA, A. N.; AMARAL, I. L. Florística e fitossociologia de uma floresta de vertente na Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 34, n. 1, p. 21-34, jan. 2004.

OLIVEIRA, A. N.; AMARAL, I. L.; RAMOS, M. B. P.; NOBRE, A. D.; COUTO, L. B.; SAHDO, R. M. Composição e diversidade florístico-estrutural de um hectare de floresta densa de terra firme na Amazônia Central, Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 38, n. 4, p. 627-642, dez. 2008.

OTT, T.; VAN DONGEN, J.T.; GUNTHER, C.; KRUSELL, L.;
DESBROSSES, G.; VIGEOLAS, H.; BOCK, V.; Czechowski, T.;
Geigenberger, P.; UDVARDI, M.K. Symbiotic leghemoglobins are crucial for
nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and
development. **Current Biology**, London, v. 15, n. 6, p. 531-535, Mar. 2005.

PEOPLES, M. B.; CRASWELL, E. T. Biological nitrogen fixation: Investments,
expectations and actual contributions to agriculture. **Plant and Soil**, Dordrecht,
v. 141, n. 1/2, p.13-39, Mar. 1992.

PEREIRA, E.G. **Diversidade de rizóbios isolados de diferentes sistemas de
uso da terra na Amazônia**. 2000.93p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) -
Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SABARATNAM, S.; BEATTIE, G. A. Differences between *Pseudomonas
syringae* pv. *syringae* B728a and *Pantoea agglomerans* BRT98 in epiphytic and
endophytic colonization of leaves. **Applied and Environmental Microbiology**,
Washington, v. 69, n. 2, p. 1220-1228, Feb. 2003.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SHARF, S. J.; HIGUCHI, R.;
HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic
amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**,
Washington, v. 239, n. 4839, p. 487-491, Jan. 1988.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain
terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences, of
the Sciences of the United States of America**, Washington, v. 74, n. 12, p.
5463-5467, Dec. 1977.

SILVA, M. F.; CARREIRA, L. M. M.; TAVARES, A. S.; RIBEIRO, I. C.;
JARDIM, M. A. G.; LOBO, M. G. A.; OLIVEIRA, J. Leguminosas na
Amazônia. brasileira: Lista prévia. In: CONGRESSO NACIONAL DE
BOTÂNICA, 39., 1988, Belém. **Anais...** Belém: SBB, 1989. p. 193-237.

SOARES-FILHO, B.; NEPSTAD, D. C.; CURRAN, L.; CERQUEIRA, G. C.;
GARCIA, R. A.; RAMOS, C. A.; VOLL, E.; MCDONALD, A.; LEFEBRE, P.;
SCHLESINGER, P.; MCGRATH, D. Cenários de desmatamento para a
Amazônia. **Estudos avançados**, São Paulo, v. 19, n. 54, p. 137-152, maio/ago.
2005.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII, Nova Odessa. São Paulo: Instituto Plantarum, 2005.

SPRENT, J. I. Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. **New Phytologist**, Cambridge, v. 174, n. 1, p. 11-25, Apr. 2006.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; MATHESON, B. G.; NOWAK, J. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 25, n. 3, p. 13-19, Oct. 1997.

THEUNIS, M.; KOBAYASHI, H.; BROUGHTON, W. J.; PRINSEN, E. Flavonoids, NodD1, NodD2 and nod-box NB15 modulate expression of the y4wEFG locus that is required for indole-3-acetic acid synthesis in *Rhizobium* sp. strain NGR234. **Molecular Plant-Microbes Interactions**, Saint Paulo, v. 17, n. 10, p. 1153-1161, 2004.

TORSVIK, V.; OVREAS, L.; THINGSTAD, T. F. Prokaryotic diversity--magnitude, dynamics, and controlling factors. **Science**, Washington, v. 10, n. 296, p. 1064-1066, 2002.

VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164p.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbial Review**, Philadelphia, v. 51, n. 2, p. 221-271, June 1987.

ZAKHAROVA, E.; SHCHERBAKOV, A.A.; BRUDNIK, V.V.; SKRIPKO, N.G.; BULKHIN, N.S.; IGNATOV, V.V. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. Insights from quantum chemistry. **European Journal Biochemistry**, Zurich, v. 259, n. 3, p. 572-576, Feb. 1999.

CAPÍTULO 2

DIVERSIDADE E EFICIÊNCIA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS DE DIFERENTES LEGUMINOSAS DA REGIÃO DO ALTO SOLIMÕES, AM

1 RESUMO

O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar fenotipicamente e genotipicamente bactérias isoladas de nódulos coletados de 16 espécies de leguminosas: *Acacia multipinnata*, *Calopogonium mucunoides*, *Desmodium adscendens*, *Dalbergia inundata*, *Entada sp*, *Inga caynnensis*, *Inga edulis*, *Inga heterophylla*, *Inga umbellifera*, *Inga venusta*, *Machaerium floribundum*, *Mimosa pudica*, *Mimosa quadrivalvis*, *Pueraria phaseoloides*, *Piptadenia suaveolens* e *Pitryocarpa pteroclada*. Para isto, coletas foram feitas em vários pontos amostrais alocados em 5 diferentes sistemas de uso da terra (SUTs) na região do Alto Solimões, AM: capoeira nova, capoeira velha, agrofloresta, agricultura e pastagem. Três nódulos de cada espécie em cada SUT foram selecionados para isolamento, onde todos os morfotipos obtidos em placas foram isolados e caracterizados culturalmente. Além disso, avaliou-se a eficiência desses isolados na fixação de nitrogênio em simbiose com *Macropodium atropurpureum* para isolados representantes dos grupos culturais. Os isolados que não nodularam siratro e estimularam o crescimento da planta estatisticamente maior que controle absoluto foram avaliados considerando a produção de ácido indol-3-acético. O gene 16S rDNA foi parcialmente sequenciado para isolados representantes e submetidos à análise filogenética. Foram obtidos 442 isolados distribuídos em 5 SUTs. A partir da caracterização dos mesmos, 105 grupos foram formados e um representante de cada grupo foi inoculado em siratro sob condições axênicas para autenticação de bactérias nodulíferas fixadoras de nitrogênio. 52 destes isolados tiveram, com sucesso, o gene 16S rDNA parcialmente sequenciado e suas sequências submetidas a análise filogenética. No experimento de autenticação, 7 isolados nodularam siratro e 98 não induziram a nodulação. Foi verificado que embora os 19 isolados testados produzissem ácido indol-3-acético, isto não estava relacionado com o aumento da matéria seca da parte aérea em siratro. Os isolados que nodularam *Pueraria phaseoloides*, *Pitryocarpa pteroclada*, *Inga edulis* e *Mimosa quadrivalvis*, foram identificados como pertencentes ao gênero *Rhizobium*. Diversos isolados foram identificados como espécies e gêneros não reconhecidos com BFNNL, corroborando a possibilidade de sua coexistência com nódulos de bactérias fixadoras de nitrogênio em leguminosas. Em relação aos SUTs foi verificado que estes alteraram a diversidade das bactérias nos nódulos de diferentes espécies de leguminosas.

2 ABSTRACT

This work aimed to isolate and characterize phenotypically and genotypically bacterial isolates from nodules collected from 16 leguminous species: *Acacia*, *Calopogonium mucunoides*, *Desmodium adscendens*, *Dalbergia inundata*, *Entada sp*, *Inga caynensis*, *Inga edulis*, *Inga heterophylla*, *Inga umbellifera*, *Inga venusta*, *Machaerium floribundum*, *Mimosa pudica*, *Mimosa quadrivalvis*, *Pueraria phaseoloides*, *Piptadenia suaveolens* and *Pitryocarpa pteroclada*. For this, collections were made in several sampling points allocated in 5 different land use systems (LUSs) in Alto Solimões, AM region: young secondary forest, old secondary forest, agroforest, agriculture and pasture. Three nodules of each species in each LUS were selected for isolation, from which all morphotypes obtained in plates were isolated and characterized culturally. Besides that the nitrogen fixing efficiency in symbiosis with *Macropitium atropurpureum* were evaluated for representative isolates of cultural groups. Isolates which did not nodulate siratro and stimulate plant growth statistically higher than the absolute control were assessed regarding the production of indole-3-acetic acid. 16S rDNA gene were partially sequenced for representative isolates and submitted to phylogenetic analysis. 442 isolates distributed in 5 LUS were obtained. From their characterization, 105 groups were formed and one representative of each group was inoculated in siratro under axenic conditions for authentication of nitrogen fixing nodulating bacteria. 52 of these isolates were successfully partially sequenced for 16S rDNA gene and their sequences submitted to phylogenetic analysis. In authentication experiment, 7 isolates nodulated siratro and 98 did not induced nodulation. produced acid indol-3-acetic, this was not related to the siratro shoot dry matter increase. Isolates which nodulated *Pueraria phaseoloides*, *Pitryocarpa pteroclada*, *Inga edulis* and *Mimosa quadrivalvis*, were identified as belonging to genus *Rhizobium*. Several isolates were identified as species and genera not recognized as BFNNL, corroborating the possibility of their coexistence with nitrogen fixing bacteria in legume nodules. In relation to LUSs it was verified that these ones changed the diversity of bacteria in nodules of the different legume species.

3 INTRODUÇÃO

O ecossistema amazônico corresponde a 60% do território nacional e é o maior bioma do Brasil. Suas florestas tropicais abrigam alta biodiversidade, desde plantas até animais e microrganismos. Estes últimos são responsáveis pelo equilíbrio e manutenção do ecossistema e, muitas vezes, esquecidos nos estudos de diversidade, seja pelo tamanho microscópico ou importância dada somente a animais superiores em extinção (Moreira et al., 2006; Azevedo, 1998).

É sabido que mudanças drásticas nos ambientes podem levar a uma redução desses procaríotos e comprometer toda a função do ecossistema. Estudos recentes em diferentes sistemas de uso da terra revelaram um efeito considerável destes na diversidade microbiana na região Amazônica (Lima et al., 2009; Jesus et al., 2009). O mosaico de áreas naturais na Amazônia tem dado lugar a paisagens homogêneas, principalmente pela intervenção antrópica, o que afeta a funcionalidade natural do ecossistema, sendo a diversidade de microrganismos do solo extremamente alterada por essas mudanças, já que existe forte ligação entre a biodiversidade abaixo e acima do solo (Jesus et al., 2009).

Dentre esses microrganismos, destacam-se aqueles que se associam a leguminosas formando estruturas hipertróficas nas raízes e que são comumente chamados de “rizóbios”, responsáveis pela entrada de nitrogênio no sistema, elemento importante nos processos biológicos que ocorrem no solo. A família de angiosperma, Leguminosae, apresenta ampla distribuição geográfica na Amazônia, representada por diversas espécies que facilitam os estudos de diversidade de microrganismos presentes nos nódulos (Silva et al., 1989; Moreira et al., 1992; Moreira et al., 1993a; Moreira et al., 1993c; Moreira et al.,

1993d). Para este propósito, o isolamento e a caracterização morfológica das colônias (produção de exopolissacarídeos, o tamanho, a forma, a cor, o tempo de aparecimento de colônias e a alteração do pH do meio de cultura) (Vincent, 1970) são passos primordiais para classificar novos microrganismos e auxiliar nos estudos de diversidade (Jesus et al., 2005). Mas, as características culturais, no entanto, não geram informações sobre as relações evolutivas entre os organismos e as técnicas moleculares vieram para suprir esta deficiência dos métodos tradicionais e, junto a dados fenotípicos, integrar a taxonomia polifásica, tornando mais completa e precisa a identificação de microrganismos.

As técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) (Saiki et al., 1988) e sequenciamento de DNA (Sanger et al., 1977), os métodos moleculares, especialmente aqueles baseados no estudo da sequência do 16S rDNA, têm sido muito úteis na descoberta de novos microrganismos e é uma das técnicas mais utilizadas no auxílio da detecção e da identificação de microrganismos em ambientes naturais e que ganhou grande impulso nos últimos anos. Um exemplo são estudos recentes de diversidade de bactérias por meio da análise filogenética do gene 16SrRNA em nódulos que têm identificado gêneros de bactérias diferentes daqueles que nodulam leguminosas (Li et al., 2008).

O conhecimento da diversidade de microrganismos, em termos de riqueza de espécies, distribuição local e global, e função no ecossistema, permanece ainda bastante incompleto, mas estudos feitos nesse sentido tem revelado o grande potencial da Amazônia (Jesus et al., 2005; Lima et al., 2005; Lima et al., 2009). Identificar a ocorrência, a diversidade e a eficiência de bactérias que nodulam leguminosas pode fornecer informações importantes sobre a ecologia desses microrganismos nesta região.

Assim, este trabalho foi realizado o objetivo específico de isolar e caracterizar, fenotípica e genotipicamente, bactérias presentes em nódulos de diferentes leguminosas. Além disso, verificar a eficiência de populações dessas

bactérias, noduladas ou não por siratro (*Macropodium atropurpureum*), verificando se a produção de ácido indol-3-acético contribuiu para o incremento da parte aérea desta leguminosa e se os sistemas de uso da terra na região do Alto Solimões, AM alteram a comunidade de bactérias isoladas destes nódulos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de estudo e coleta

Este trabalho faz parte do projeto *Conservation and Sustainable Management of Below-Ground Biodiversity*. As áreas amostradas (janelas) são de, aproximadamente, 9 ha, enumeradas de 1 a 6. As janelas 1 e 2 situam-se na comunidade 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 (Figura 1, Navarrete, 2009). Dentro de cada janela existem vários pontos demarcados e georreferenciados, abordando diferentes sistemas de uso e cobertura da terra que foram caracterizadas por Fidalgo et al. (2005).

Espécies de leguminosas capazes de nodular ou sobre as quais não existam informações disponíveis a respeito dessa característica já foram identificadas nos pontos amostrais da área do projeto em Benjamin Constant. Com base nesse levantamento, selecionando apenas as espécies leguminosas nodulíferas, é que foi possível sua identificação e coleta de nódulos no campo (Nogueira, 2007; Oliveira, 2007).

Para facilitar esta identificação, foi necessário o auxílio de pessoas das comunidades anteriormente citadas, assim como a apresentação do nome vulgar da espécie e fotografias de exsiccatas das espécies do herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Ressalta-se que, entre o ano do levantamento florístico e o da coleta de nódulos, houve alterações nos sistema de uso da terra e, conseqüentemente, mudanças na composição florística da área.

Foram coletados nódulos de raízes de 16 espécies leguminosas em vários pontos amostrais do projeto (Tabela 1): *Acacia multipinnata* (AM), *Calopogonium mucunoides* (CM), *Desmodium adscendens* (DA), *Dalbergia inundata* (DI), *Entada* sp. (E), *Inga caynnensis* (IC), *Inga edulis* (IE), *Inga heterophylla* (IH), *Inga umbellifera* (IU), *Inga venusta* (IV), *Machaerium floribundum* (MF), *Mimosa pudica* (MP), *Mimosa quadrivalvis* (MQ), *Pueraria phaseoloides* (Pp), *Piptadenia suaveolens* (PS) e *Pitryocarpa pteroclada* (Pt) (Tabela 1). Esses nódulos foram coletados em vários pontos amostrais, distribuídos em cinco sistemas de uso da terra: capoeira nova, capoeira velha, agrofloresta, agricultura e pastagem. Uma mesma espécie ocorreu em mais de um sistema de uso da terra (Tabela 2). No sistema de uso floresta primária não foram feitas coletas de nódulos. O nitrogênio neste ecossistema não é um fator limitante e, provavelmente, a condição equilibrada desse ambiente não expressa a nodulação nas leguminosas da área.

Na coleta, sistemas radiculares das espécies de leguminosas foram retirados do solo com o auxílio de um enxadeco, escavando-se cuidadosamente raízes secundárias a partir do tronco até suas raízes mais finas, onde geralmente estão os nódulos, evitando-se que estes se destacassem da raiz (Moreira & Silva, 1993a). Após a coleta, ainda no campo, os nódulos foram armazenados em sacos plásticos, até que fossem lavados em água corrente, usando uma peneira. Após esse procedimento, foram transferidos e armazenados individualmente em frascos de vidro com tampa encaixável contendo um chumaço de algodão na parte inferior e sílica gel na parte superior. Esse armazenamento foi mantido até a próxima etapa do trabalho (isolamento das bactérias dos nódulos no Laboratório de Microbiologia do Solo-DCS/UFLA). Foram coletados, no máximo, 40 nódulos, não tendo este número sido atingido para todas as espécies de leguminosas.

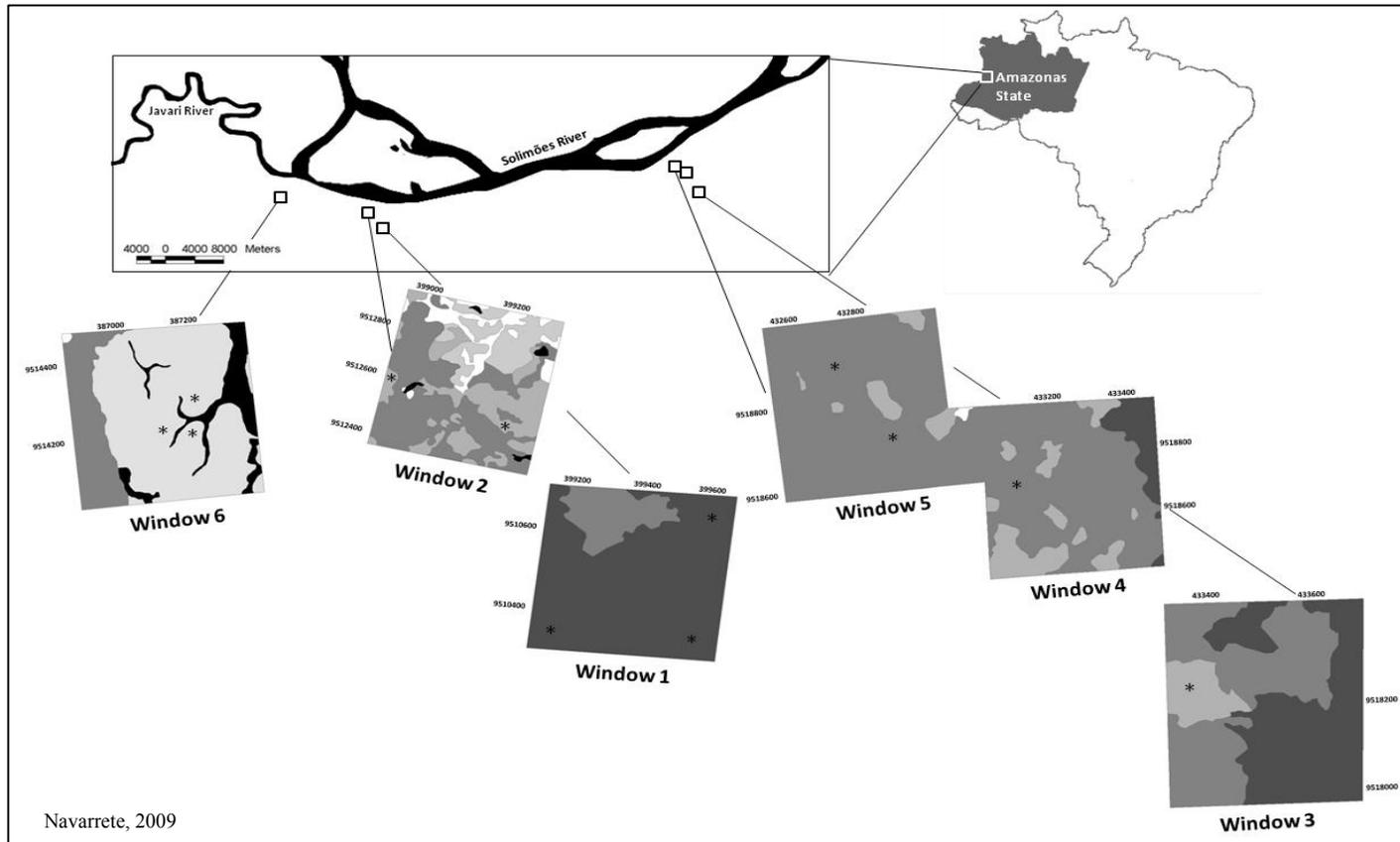


FIGURA 1 Área amostral do projeto *Conservation and Sustainable Management of Below-Ground Biodiversity*.

4.2 Isolamento e caracterização cultural

Para o isolamento das bactérias foram usados três nódulos provenientes de cada espécie de leguminosa. Antes do isolamento das bactérias dos nódulos, estes foram bem lavados e reidratados em água destilada estéril, por 5 minutos. Após esse procedimento, os nódulos foram desinfestados superficialmente, sendo primeiramente imersos em álcool etílico 95%, em seguida em H₂O₂, por 1 minuto e, depois, lavados seis vezes com água destilada estéril. Posteriormente, foram macerados em placas contendo meio de cultura 79 (Fred & Waksman, 1928) e o material foi espalhado em forma de estrias compostas para a obtenção de colônias isoladas.

Após a purificação dos isolados, estes foram transferidos para tubos com meio sólido 79, a 4°C, armazenados em tubos rosqueáveis de plástico e também em meio líquido, acrescidos de glicerol 20% e armazenados a -80°C. As bactérias foram cultivadas sob temperatura de 28°C. Todos os morfotipos observados foram plaqueados para purificação. Após a purificação dos isolados, as seguintes características culturais foram avaliadas: alteração do pH do meio de cultura após o crescimento da bactéria (ácido, neutro ou alcalino); taxa de crescimento, avaliada pelo tempo de formação de colônias isoladas (1 dia, crescimento muito rápido; 2-3 dias, crescimento rápido; 4-5 dias, crescimento intermediário; 6-10 dias, crescimento lento; mais de 10 dias, crescimento muito lento); características das colônias: cor das colônias (creme, branca, amarela ou rosa); diâmetro das colônias (mm); borda (inteira, irregular ou lobada); forma (circular, irregular ou puntiforme); elevação (plana, lenticular, convexa ou pulvinada); detalhes ópticos (translúcida, transparente, brilhante ou opaca) e consistência da colônia (seca, aquosa, gomosa, butírica ou viscosa). O muco produzido pelas células foi avaliado quanto à quantidade (escasso, pouco, moderada ou abundante) (Moreira, 1991).

Para a identificação dos isolados foram utilizadas letras iniciais referentes ao nome da espécie; um primeiro número referente ao ponto de coleta das espécies e um segundo número correspondente ao número do nódulo isolado, seguidos de uma letra que determina o isolado obtido daquele respectivo nódulo. A partir dos dados de caracterização morfológica foi possível construir uma matriz binária e agrupar os isolados por meio dendrograma cultural pelo método da média aritmética não ponderada, ou UPGMA, com a utilização do coeficiente de Jaccard e o programa estatístico Numerical Taxonomic and Multivariate Analysis System (NTSYS), version 2.0, Applied Biostatistics, New York.

Após a construção do dendrograma cultural, procedeu-se o cálculo do índice de diversidade de Shannon-Weaver (Shannon & Weaver, 1949) tanto para os sistemas de uso quanto para as 16 espécies leguminosas. Para o cálculo desse índice considerou-se k o número de grupos formados com diferentes características culturais e p_i a abundância relativa dos isolados de cada grupo.

TABELA1 Descrição das espécies leguminosas.

ESPÉCIES	Número de registro no herbário (INPA)	N.V ¹	SUBF. ²	H ³
<i>Acacia multipinnata</i> (AM)	88656	Cipó rabo-de-camaleão	Mimosoideae	Cipó herbáceo
<i>Calopogonium mucunoides</i> (CM)	154390	Feijão-de-rato	Papilionoideae	Liana herbácea
<i>Dalbergia inundata</i> (DI)	53921	Envira-tucunaré	Papilionoideae	Liana lenhosa
<i>Desmodium adscendens</i> (DA)	223865	Carapicho-chato	Papilionoideae	Erva
<i>Entada</i> sp. (E)	157771	Pau-de-capoeira	Mimosoideae	Liana herbácea
<i>Inga caynnensis</i> (IC)	215375	Ingá-açu	Mimosoideae	Árvore
<i>Inga edulis</i> (IE)	137161	Ingá-verdadeiro	Mimosoideae	Árvore
<i>Inga heterophylla</i> (IH)	203921	Ingá-xixica	Mimosoideae	Árvore
<i>Inga umbellifera</i> (IU)	147049	ingarana	Mimosoideae	Árvore
<i>Inga venusta</i> (IV)	196582	Ingá-do-mato	Mimosoideae	Árvore
<i>Machaerium floribundum</i> (MF)	209741	Cipó	Mimosoideae	Arbusto
<i>Mimosa pudica</i> (MP)	13963	Sensitiva	Mimosoideae	Arbusto
<i>Mimosa quadrivalvis</i> (MQ)	197184	Dormideira-gigante	Mimosoideae	Erva
<i>Piptadenia suaveolens</i> (PS)	162118	Faveira	Mimosoideae	Liana lenhosa
<i>Pitryocarpa pteroclada</i> (Pt)	-	Jurema	Mimosoideae	Árvore
<i>Pueraria phaseoloides</i> (Pp)	34829	Pueraria	Mimosoideae	Liana herbácea

N.V¹: nome vulgar, SUBF²: subfamília, H³: hábito

TABELA 2 Pontos de coleta de nódulos de espécies leguminosas, nos diferentes sistemas de uso da terra, na região do Alto Solimões, AM.

SUTS	JANELAS	PONTOS	ESPÉCIES LEGUMINOSA
CAPOEIRA NOVA	J2	18	<i>Calopogonium mucunoides, Inga edulis</i>
	J2	21	<i>Dalbergia inundata, Inga edulis, Pueraria phaseoloides</i>
	J2	22	<i>Acacia multipinnata, Inga caynensis,</i>
	J2	23	<i>Inga umbellifera</i>
	J2	26	<i>Inga edulis</i>
	J2	28	<i>Mimosa pudica</i>
	J2	31	<i>Pitryocarpa pteroclada, Pueraria phaseoloides</i>
	J2	32	<i>Pueraria phaseoloides, Pitryocarpa pteroclada, Inga edulis</i>
	J3	34	<i>Desmodium adscendens</i>
	J4	64	<i>Calopogonium mucunoides, Inga edulis</i>
	J5	69	<i>Inga edulis</i>
	J6	81	<i>Inga venusta</i>
J6	81A	<i>Inga venusta</i>	
AGROFLORESTA	J2	17	<i>Desmodium adscendens, Inga edulis</i>
	J5	66	<i>Entada sp., Mimosa quadrivalvis, Pitryocarpa pteroclada</i>
	J5	67	<i>Calopogonium mucunoides</i>
	J5	67A	<i>Calopogonium mucunoides</i>
	J5	68	<i>Acacia multipinnata, Inga caynensis, Machaerium floribundum</i>
J5	68A	<i>Calopogonium mucunoides, Inga caynensis</i>	
CAPOEIRA VELHA	J2	19	<i>Calopogonium mucunoides, Inga edulis</i>
	J4	50	<i>Calopogonium mucunoides</i>
	J4	54	<i>Calopogonium mucunoides, Desmodium adscendens, Inga heterophylla</i>
	J4	59	<i>Calopogonium mucunoides, Desmodium adscendens, Inga edulis, Inga venusta</i>
	J4	60	<i>Calopogonium mucunoides, Inga venusta</i>
	J5	65	<i>Calopogonium mucunoides</i>
	J5	71	<i>Acacia multipinnata, Piptadenia suaveolens</i>
	J5	71A	<i>Inga venusta, Pitryocarpa pteroclada</i>
	J5	76	<i>Inga caynensis</i>
	J5	77	<i>Calopogonium mucunoides</i>
	J5	79	<i>Inga caynensis, Inga venusta,</i>
	J5	80	<i>Calopogonium mucunoides, Inga venusta</i>
AGRICULTURA	J2	24A	<i>Inga venusta</i>
	J2	29	<i>Inga edulis, Pueraria phaseoloides</i>
	J5	70A	<i>Inga caynensis, Calopogonium mucunoides</i>
PASTAGEM	J6	83	<i>Calopogonium mucunoides</i>
	J6	92	<i>Desmodium adscendens</i>

4.3 Autenticação e eficiência dos isolados

A partir de uma avaliação criteriosa dos grupos culturais, foram selecionados isolados representantes que contemplassem todas as espécies encontradas em todos os sistemas de uso da terra. Esses isolados, provenientes de diferentes hospedeiros, foram autenticados em siratro (*Macroptilium atropurpureum*), a fim de verificar a capacidade de induzir nódulos nesta leguminosa.

O siratro é uma leguminosa promíscua e tem sido usado com sucesso nos experimentos de captura de bactérias que nodulam leguminosas, principalmente na Amazônia (Jesus et al., 2005; Lima et al., 2009; Pereira, 2000). Para a autenticação, foram testados 105 representantes contemplando os isolados de todas as espécies em cada um dos sistemas de uso estudados. Para capoeira nova (CN), foram testados 25 isolados, envolvendo 11 espécies de leguminosas; para capoeira velha (CV), 25 isolados referentes a 9 espécies; para a agricultura (AGRI), 18 isolados de 5 espécies e, por último, 9 isolados em pastagem (PAST) de 2 espécies leguminosas (Tabela 3).

TABELA 3 Isolados representes autenticados em siratro (*Macroptilium atropurpureum*).

Capoeira nova	Capoeira velha	Agrofloresta	Agricultura	Pastagem
AM22-01C	AM71-01A	AM68-02A	CM70A-01A	CM83-01A
CM18-01A	CM50-01A	AM68-02C	CM70A-01B	CM83-01B
CM59-01A	CM50-03A	AM68-03A	CM70A-03A	CM83-02A
DI21-01B	CM60-01A	AM68-03B	CM70A-03B	CM83-02B
DI21-02C	CM65-02A	CM68A-01F	IC70A-02A	CM83-02C
DI21-03A	CM80-01B	CM68A-01G	IC70A-03A	CM83-03A
DI21-03B	CM80-03A	CM68A-03C	IE29-01B	DA92-01A
IC22-01A	DA54-02A	CM68A-03D	IV24A-01C	DA92-02A
IC22-02B	DA59-03A	DA17-03B	IV24A-03A	DA92-03A
IC22-03A	IC76-01A	E66-01C	IV24A-03C	

...Continua...

“TABELA 3, Cont.”

IE18-01A	IC79-01B	E66-03B	IV24A-03D
IE21-01B	IC79-02A	IC68-03B	Pp29-01A
IE32-02A	IC79-03D	IC68A-01A	Pp29-01B
IE64-02C	IE19-01A	IC68A-01B	Pp29-01C
IE64-02D	IE59-03A	IC68A-02B	Pp29-01D
IE69-02A	IH54-02A	IE17-02D	Pp29-03A
IU23-01A	IH54-03A	MF68-01A	Pp29-03B
IU23-01B	IV59-02A	MF68-03A	Pp29-03C
IV81A-02A	IV71A-01A	MQ66-02E	
IV81A-03B	IV71A-03A	MQ66-03B	
MP28-01A	PS71-01B	IC76-03A	
Pp21-02C	PS71-01C	Pt66-01B	
Pp31-01A	Pt71A-01B	Pt66-02C	
Pp31-03A	Pt71A-01C	Pt66-03A	
Pp32-02A	Pt71A-03A	Pt66-03B	
Pt31-02C			
Pt32-01B			

O experimento de autenticação foi realizado em casa de vegetação do Laboratório de Microbiologia do Solo (DCS) da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Foram utilizadas garrafas de vidro âmbar de 500 mL, recicláveis, tipo *long neck* contendo no tratamento inoculados e no controle sem inoculação e sem nitrogênio mineral a solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) com uma baixa concentração de nitrogênio (5,25 mg L⁻¹), a qual é considerada uma dose de arranque para o processo de fixação biológica de nitrogênio: NH₄H₂PO₄ 0,1 mL L⁻¹; KNO₃ 0,6 mL L⁻¹; Ca(NO₃)₂.4H₂O 0,4 mL L⁻¹; MgSO₄.7H₂O 2 mL L⁻¹; K₂SO₄ 3 mL L⁻¹; Ca(H₂PO₄)₂.H₂O 10 mL L⁻¹; CaSO₄.2H₂O 200 mL L⁻¹; H₃BO₃ 2,86 mg L⁻¹; MnCl₂.4H₂O 1,81 mg L⁻¹; ZnSO₄.7H₂O 0,22 mg L⁻¹; CuSO₄.5H₂O 0,08 mg L⁻¹; Na₂MoO₄.H₂O 0,09 mg L⁻¹ e FeCl₃ 1mL, diluída quatro vezes.

O experimento constituiu-se de 3 repetições, utilizando um delineamento inteiramente casualizado com 109 tratamentos, sendo 105 isolados, 2 controles positivos (BR29 e UFLA-04212) e 2 controles negativos

(com nitrogênio e sem inoculação e sem nitrogênio e sem inoculação). No controle com N mineral utilizou-se a solução de Hoagland e Arnon (1950), constituída de: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 2 mL L⁻¹; KNO_3 12 mL L⁻¹; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 8 mL L⁻¹; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4 mL L⁻¹; H_3BO_3 2,86 mg L⁻¹; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,81 mg L⁻¹; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,22 mg L⁻¹; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,08 mg L⁻¹, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,09 mg L⁻¹ e FeCl_3 2mL. Os controles positivos BR29/SEMIA 5019 referem-se à estirpe recomendada como inoculante para a soja (*Glicine max*) pela Reunião de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbiológicos de interesse agrícola (RELARE), identificada como *Bradyrhizobium elkanni* (Rumjanek et al., 1993) e UFLA-04212 refere-se a um isolado eficiente em simbiose com siratro (Florentino, 2007).

Após o preparo das garrafas com uma tira de papel filtro, fita adesiva, papel alumínio e a solução nutritiva, estas foram autoclavados por uma hora, à pressão de 1,5 kg cm⁻² e a 127°C. As sementes foram desinfestadas e escarificadas com ácido sulfúrico puro, por 10 minutos e com lavagens sucessivas em água estéril. Posteriormente, foram imersas em água estéril, por 2 horas e colocadas em placa de Petri com algodão autoclavado umedecido, por 20 horas, em condições de assepsia na câmara de fluxo. As sementes pré-germinadas foram inseridas manualmente no orifício da garrafa com auxílio de uma pinça estéril.

Para inoculação das plantas, 1 mL de cultura crescida em meio de cultura 79 (Fred & Waskman, 1928) líquido por 3 dias foi utilizado, já que todos os isolados eram de crescimento rápido, exceto para a estirpe do controle positivo (BR29), que foi crescida por 6 dias. As plantas foram colhidas 40 dias após a germinação para a determinação da matéria parte aérea seca, avaliação e peso de nódulos e raízes secas. Os nódulos, depois de contados, assim como a parte aérea, foram acondicionados em sacos de papel e levados para a estufa de circulação forçada (65° a 70°C) até peso constante, para a determinação do peso

de nódulos secos. Já as raízes foram colocadas em placa de Petri com o mesmo propósito.

A eficiência relativa de cada tratamento foi calculada segundo a fórmula (Bergensen et al., 1971): $EFR = (MSPA \text{ inoculada}) * 100 / (MSPA \text{ da planta com nitrogênio mineral})$. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o programa SISVAR versão 4.3 (Ferreira, 2000) e os efeitos dos tratamentos foram comparados pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

4.4 Extração, amplificação e sequenciamento de DNA

Um total de 105 isolados representantes dos 105 grupos culturais autenticados teve seu DNA inicialmente extraído. Para a realização desse procedimento, as colônias isoladas foram crescidas em meio YMA (79) líquido, em que 1,5 mL da cultura saturada foi centrifugada por 2 minutos (3x). O sobrenadante foi descartado e o pélete lavado em 1 mL do tampão TE 10mM, centrifugado por 2 minutos, a 9441g e ressuspenso em 567µL do tampão TE 50mM. Em seguida, foram adicionados 30µL de SDS (10%), 3µL proteinase K (20mg/ml), misturados vigorosamente e incubados, a 37°C, por uma hora. Foram adicionados 100µL de NaCl 5M, 80µL de solução CTAB/NaCl e mais uma vez misturados vigorosamente e incubados por 10 minutos, a 65°C. Adicionaram-se 500 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), misturados e centrifugados (9441g), por 10 minutos. O sobrenadante (400µL) de cada amostra foi passado para novos tubos, aos quais foram adicionados 360µL de isopropanol. Em seguida, os tubos foram vertidos lentamente até que o precipitado se tornasse visível e incubados no freezer, a -20°C, durante toda a noite para precipitação do DNA. Após a incubação, este foi lavado com 800µL de etanol 70%, centrifugado por 4 minutos, a 9441g e colocado para secar, sendo posteriormente dissolvido em 120µL de tampão TE 10mM, repousado por 4

horas, 20°C e logo mantidos no freezer até que as amostras fossem preparadas para o PCR (Ausubel et al., 1987).

O gene 16S rDNA dos microrganismos foi amplificado por reação de PCR utilizando o conjunto de iniciadores 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') e 1492R(5'GGTTACCTTGTACGACTT). O sistema de reação para PCR foi composto pelos seguintes reagentes (volume em µL): água mili-Q estéril, (25,1), tampão 10X (5,0), MgCl₂50mM (2,5), dNTPs 2mM, (5,0), *primers* 5mM (1,0) e Taq 5U/µl (0,4). Como moldes para a reação, foram utilizadas alíquotas de 10 µL do DNA.

A reação de PCR foi conduzida no termociclador Eppendorf Mastercycler[®] e as temperaturas do ciclo de amplificação foram: de desnaturação inicial de 94°C, por 5 minutos, 40 ciclos de desnaturação (94°C, por 40 segundos); de anelamento (55°C, por 40 segundos); de extensão (72°C, por 1 minuto e 30 segundos) e de extensão final de 72°, por 7 minutos, manutenção a 4°C.

A reação de PCR do 16S rDNA (50 µL) foi corrida em gel de agarose 1% (p/v), com tampão TAE. Foi utilizado como tamanho molecular o marcador 1 kb plus DNA Ladder (InvitrogenTM) e, depois, corada em brometo de etídeo (5 µg mL⁻¹). As amostras foram congeladas e liofilizadas e enviadas para a empresa Macrogen, na República da Coreia, para a realização de purificação e sequenciamento direto, utilizando o oligonucleotídeo iniciador 27F. As sequências obtidas foram analisadas quanto à qualidade, pelo programa Chromas. Somente sequências com mais de 400 pb foram utilizadas para a análise filogenética.

Foram obtidas sequências similares no GenBank (NCBI) utilizando o programa Basic Local Alignment Search Tool (Blast, 2009), para a realização do alinhamentos pelo programa ClustalW. As sequências alinhadas foram utilizadas para análise filogenética, por meio do método Neighbour-Joining usando

Kimura-2 parâmetros (Kimura, 1980), pelo programa MEGA 4.1 (Tamura et al., 2007), aplicando um *bootstrap*, com um mínimo de 2.000 replicações.

4.5 Avaliação da produção de substâncias reguladoras - AIA

Para os isolados que não induziram nodulação em siratro, mas apresentaram plantas bem desenvolvidas e foram estatisticamente iguais ao controle UFLA-04212, no parâmetro eficiência relativa, foi verificada a potencialidade na produção de hormônio AIA (ácido indol-3-acético) que, provavelmente, estaria promovendo este crescimento e desenvolvimento nas plantas de siratro. Como controle negativo foi utilizado um isolado que não induziu a nodulação e que foi ineficiente quando comparado a esta estirpe controle. Também foi realizado um teste de correlação de Pearson (Sigmaplot 11.0) com os valores médios da matéria da parte aérea seca (MPAS) e a produção de ácido indol-3-acético (AIA).

Para verificar o potencial dos isolados testados na produção de AIA, assim como o padrão positivo *Azospirillum brasiliense* (BR11001) e o padrão negativo (AM71-01A), estes foram crescidos em meio Dygs (g.L⁻¹): glicose (2,0), ácido málico (2,0), peptona bacteriológica (1,5), extrato de levedura (2,0), K₂PO₄ (0,5), MgSO₄.7H₂O (0,5) e ácido glutâmico (1,5). Após o crescimento, as células foram centrifugadas e ajustadas a DO 0,5, utilizando solução salina (0,85%). O AIA produzido foi quantificado a partir de alíquotas de 500µL de solução bacteriana inoculadas em 20 mL de meio Dygs (sem L-triptofano e suplementado com 100 mg L⁻¹ de L-triptofano). Foram incubadas por 72 horas, a 30°C, sob agitação constante.

Após este período, foram centrifugadas, a 8763g, por 10 minutos. Em seguida, do sobrenadante obtido, foram retirados 3 mL e adicionados 2 mL de reagente de Salkowski (Sarwar & Kremer, 1995). O material foi então reservado por 30 minutos em ambiente escuro, para o desenvolvimento da cor

rósea, indicativo da produção de AIA. A intensidade da cor foi determinada em espectrofotômetro, a 535 nm (Asghar et al., 2002). A concentração dos compostos indólicos foi estimada com uma curva-padrão, previamente preparada com meio de cultura esterilizado não inoculado e com quantidades conhecidas de ácido indol-3-acético de 0, 25, 50, 100, 150, 200 e 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$, de acordo com a equação $y = 0,0013x + 0,0043$ ($R^2 = 0,987$). Os dados foram analisados utilizando o programa SISVAR versão 4.0 (Ferreira, 2000) utilizando o teste Scott-Knott (5%) em delineamento inteiramente casualizado com três repetições.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento e caracterização cultural

A partir dos nódulos das 16 espécies leguminosas foram obtidos 442 isolados, sendo 149 referentes aos nódulos coletados de 11 espécies do sistema de uso capoeira nova, 152 isolados da capoeira velha oriundos de 9 espécies, 89 isolados da agrofloresta oriundos de 9 espécies, 38 isolados da agricultura com 5 espécies e com um número menor em pastagem com 14 isolados oriundos de 2 espécies de leguminosas (Figura 2).

Ressalta-se que nem todos os isolados apresentaram características típicas de bactérias nodulíferas fixadoras de nitrogênio de leguminosas (BNFNL), uma vez que todos os morfotipos existentes nos nódulos e observados em placa foram caracterizados morfológicamente. Ressalta-se que uma mesma espécie ocorreu em mais de um sistema de uso e mais de uma vez, em pontos diferentes, no mesmo sistema de uso (Figura 3 e 4). Aqueles que apresentaram características típicas de rizóbio indicaram pertencer ao gênero *Rhizobium*, o que foi observado para alguns isolados de diferentes espécies leguminosas. Já aqueles que não apresentaram essas características, denotaram pertencer a outros gêneros que, por sua vez, estariam coexistindo nos nódulos com BNFNL.

O número de isolados dos sistemas de uso capoeira nova e velha que acidificou o meio se igualou e foi superior aos sistemas de uso agricultura, agrofloresta e pastagem. Já considerando, de forma geral, todos os sistemas de uso da terra, a maioria dos isolados acidificou o meio de cultura (60%), e as percentagens daqueles que alcalinizaram e neutralizaram o meio, de 8,6% e 31,4%, respectivamente, apresentando produção de pouco muco com consistência gomosa, cromogênese creme da colônia, forma circular e absorção de indicador negativa (Figura 5).

A taxa de crescimento foi rápida (2-3 dias) para 100% dos isolados, denotando que gêneros, como *Bradyrhizobium*, em que a taxa de crescimento é lenta, não estariam nodulando as espécies em questão, como encontrado nos estudos com leguminosas florestais por Moreira et al. (1993b), na Amazônia. As características culturais são o passo primordial para identificar novos microrganismos e auxiliar nos estudos de diversidade. Jesus et al. (2005), por meio da caracterização cultural de isolados, encontraram ampla diversidade de grupos culturais de BFNNL em solos cultivados com pupunha e mandioca e de floresta primária na região do Alto Solimões na Amazônia, constatando que a maioria dos isolados que acidificaram o meio de cultura apresentaram características culturais dos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium*. Já aqueles que alcalinizaram o meio de cultura apresentaram características culturais de *Bradyrhizobium*.

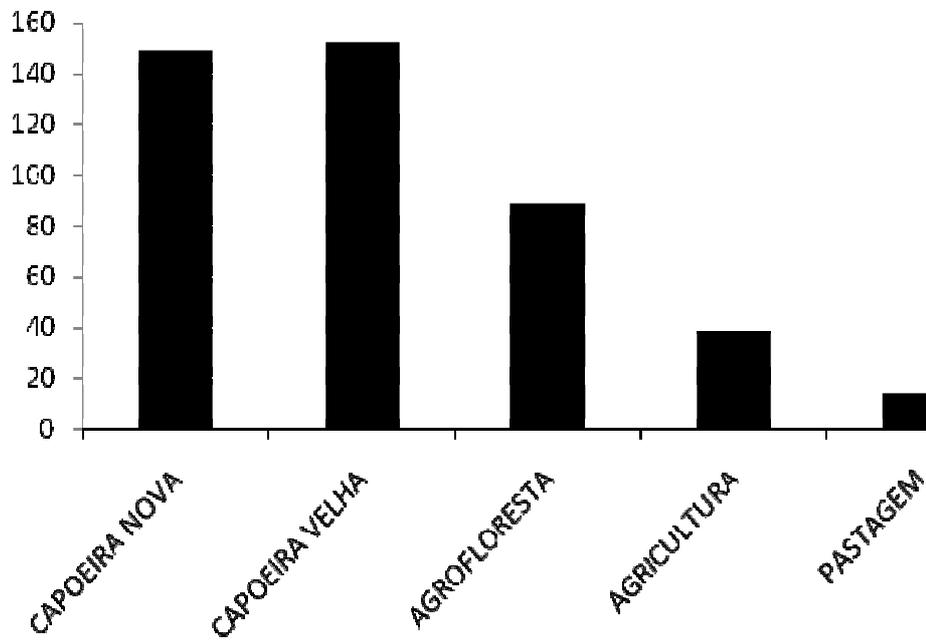


FIGURA 2 Número de isolados obtidos em cada sistema de uso da terra, considerando 16 espécies leguminosas.

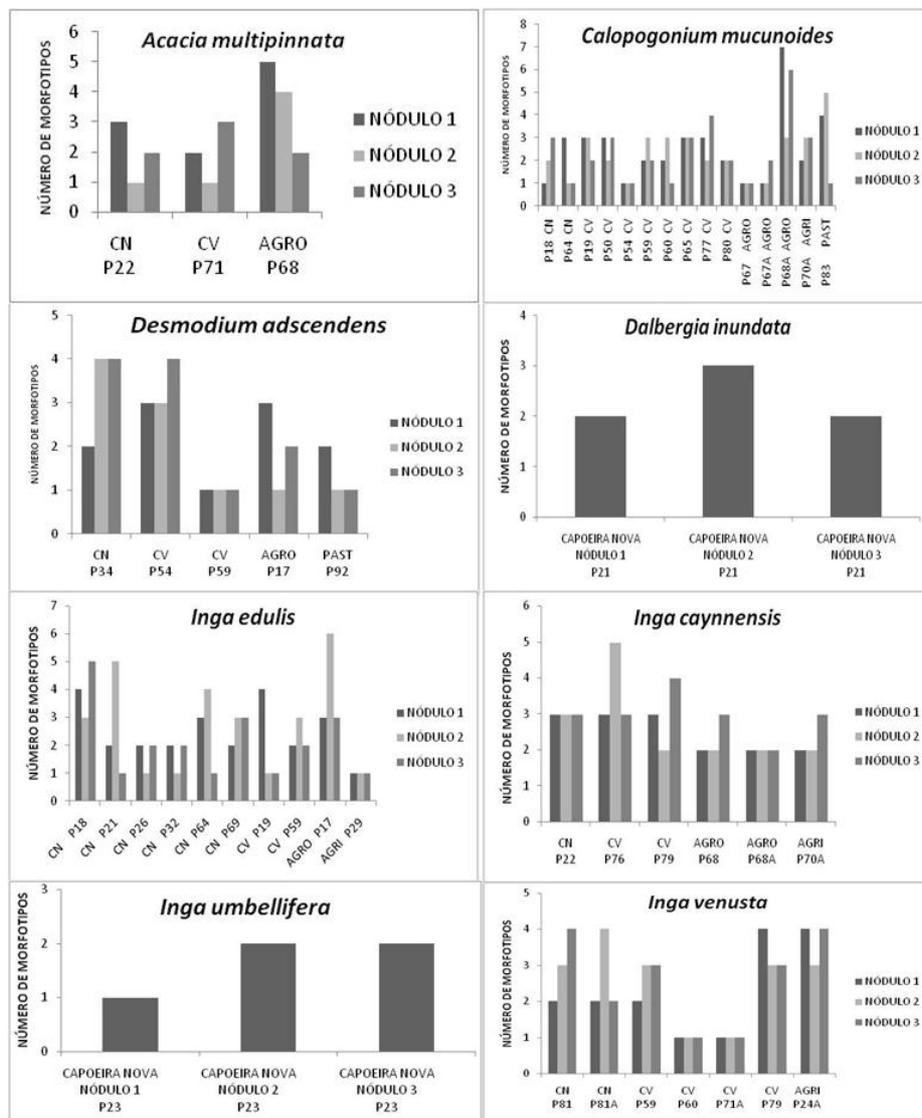


FIGURA 3 Número de morfotipos isolados por nódulo de cada espécie de leguminosa nos referidos SUTs em que as mesmas foram encontradas. P: ponto de coleta.

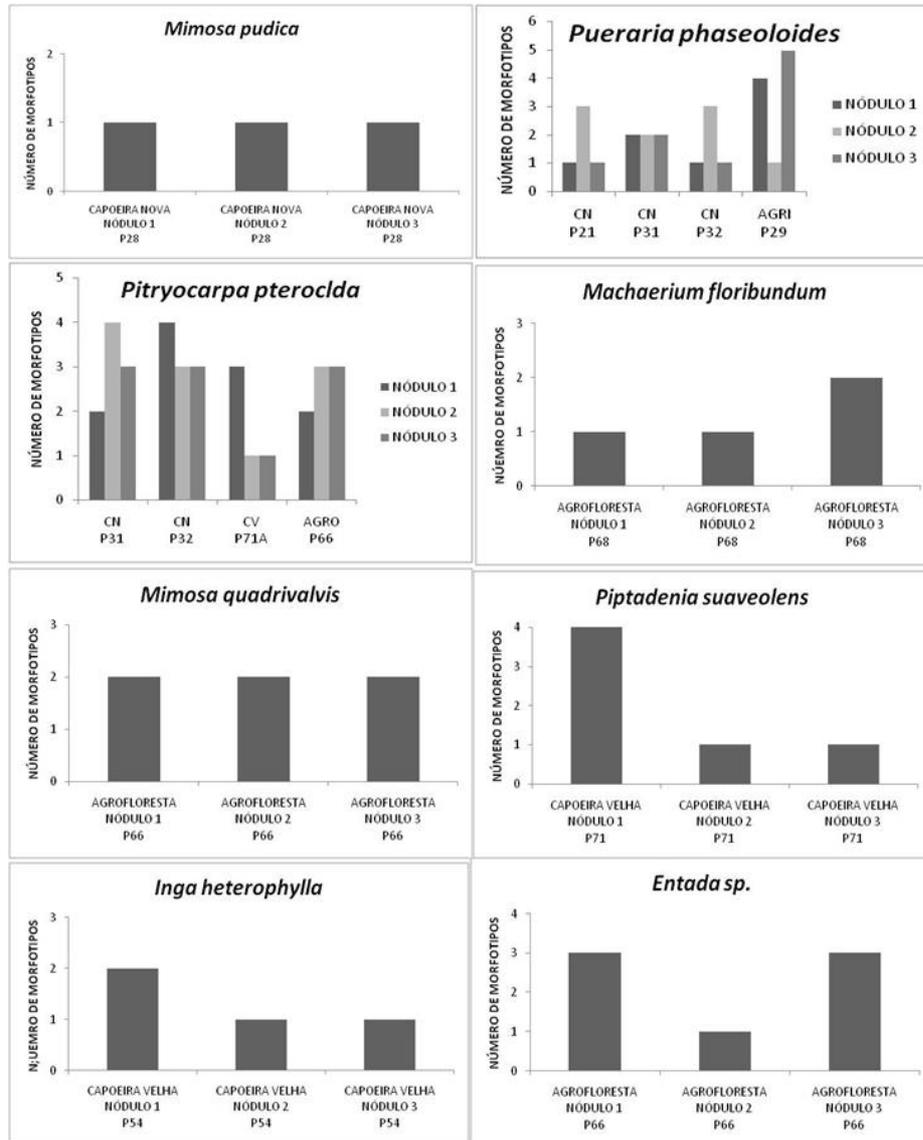


FIGURA 4 Número de morfotipos isolados por nóculo de cada espécie de leguminosa nos referidos SUTs em que as mesmas foram encontradas. P: ponto de coleta.

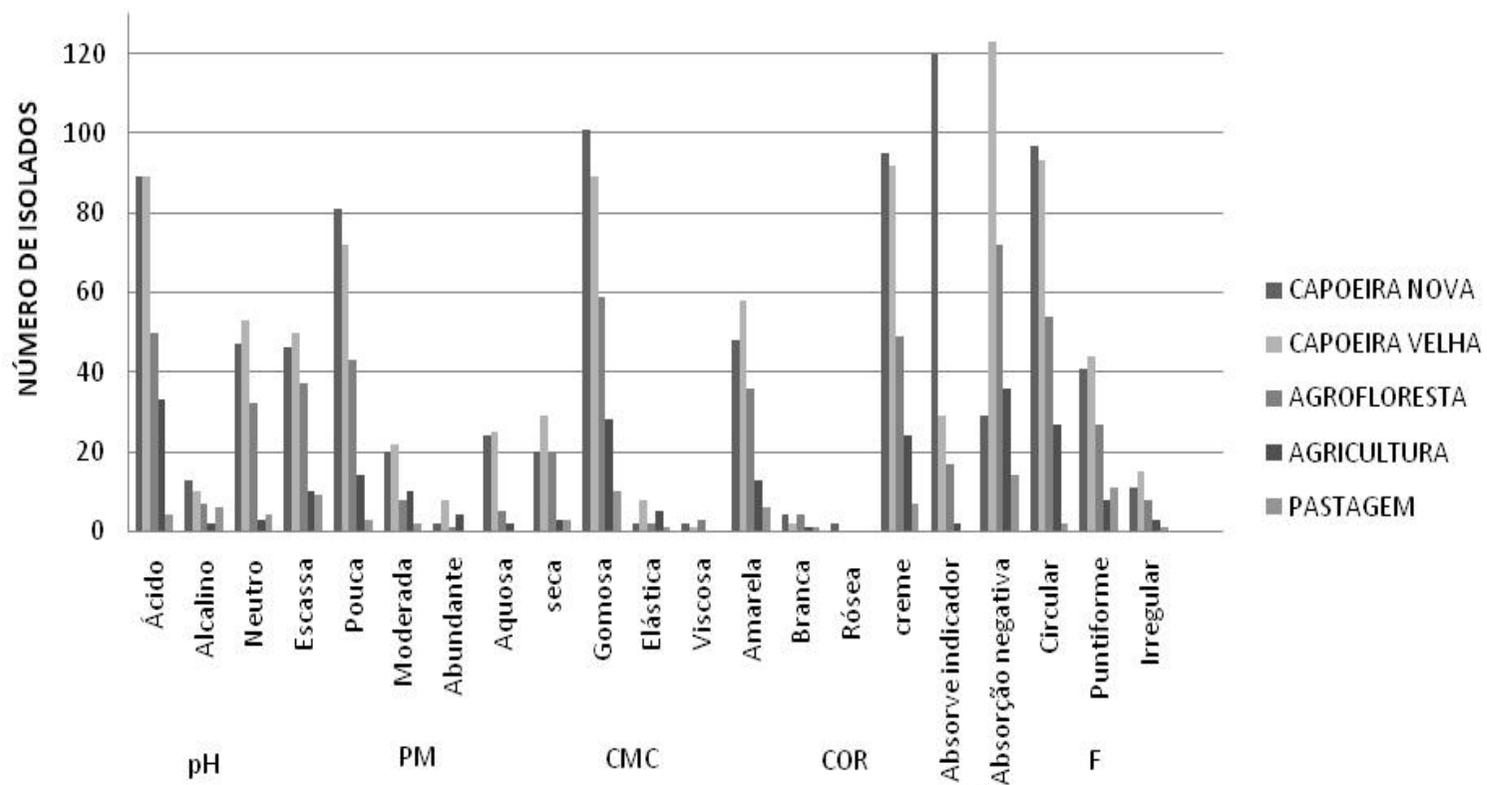


FIGURA 5 Distribuição de todos os isolados obtidos das 16 espécies leguminosas estudadas, com base nas características culturais avaliadas: produção de muco (PM), consistência da massa de crescimento (CMC), absorção de indicador (AI) e forma da colônia (F).

A partir das características morfológicas avaliadas dos 442 isolados, foram obtidos 105 grupos culturais por meio do agrupamento realizado por meio do dendrograma cultural analisado a 80% de similaridade (Figura 6). Este agrupamento revelou grande diversidade de isolados provenientes das diferentes espécies e sistemas de uso da terra e, a partir destes foram selecionados os isolados representantes de cada grupo cultural (Anexo 1A).

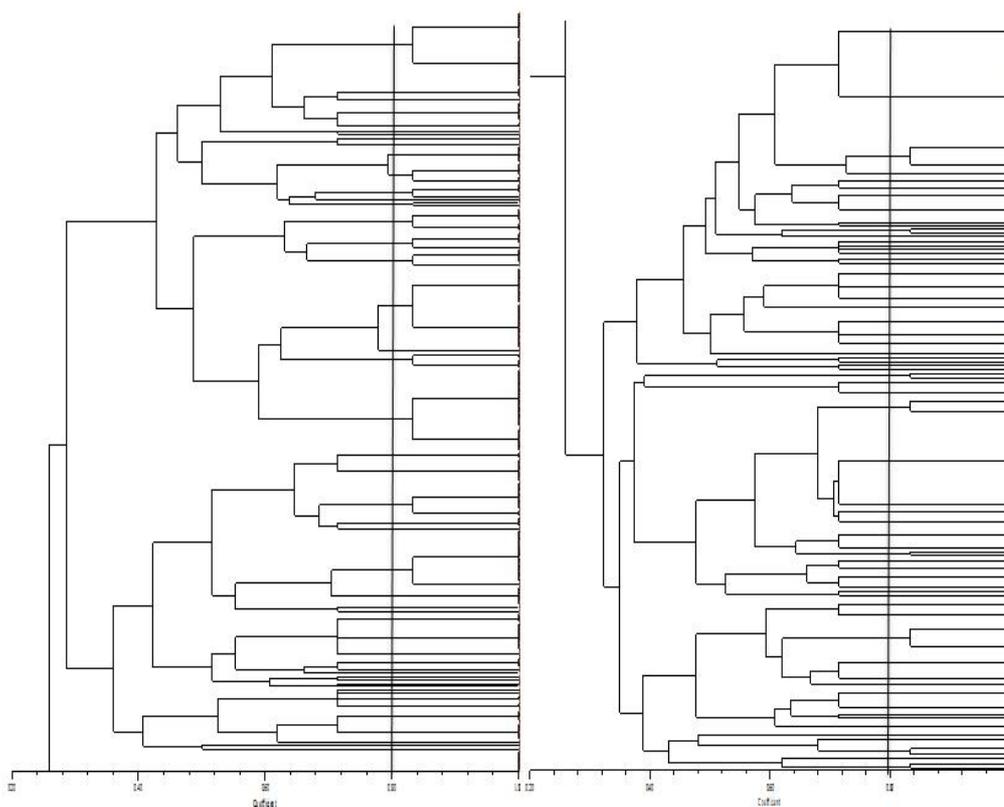


FIGURA 6 Dendrograma de similaridade baseado em características fenotípicas culturais de bactérias isoladas de diferentes leguminosas com grupos formados a 80% de similaridade.

A diversidade calculada pelo índice de Shannon mostrou diferenças entre a diversidade fenotípica nos distintos sistemas de uso e também comportamento diferenciado na captura de bactérias pelas diferentes espécies leguminosas (Tabela 4 e 5). Considerando os sistemas de uso da terra, foi verificado um maior índice de diversidade no sistema de uso capoeira velha e um menor índice em pastagem. O próprio número de leguminosas encontradas em capoeira velha, que foi alto, pode ter favorecido o aumento desta diversidade de bactérias nestas áreas, assim como um menor número encontrado em pastagem levou a um menor índice de diversidade. Também a própria sustentabilidade dos sistemas de uso pode ter favorecido estes valores, já que a capoeira velha é um sistema de uso que sofre pouca interferência, como fogo e pisoteio, em relação à pastagem.

Quanto à diversidade de bactérias encontradas nos diferentes sistemas de uso, foi verificado um maior índice para *Calopogonium mucunoides* e um menor número para *Inga heterophylla*. A frequência destas espécies nos sistemas de uso, explicam estes índices, uma vez que *Calopogonium mucunoides* ocorreu nos 5 sistemas de uso estudados, enquanto *Inga heterophylla* ocorreu apenas no sistema de uso capoeira velha. Neste caso, *Calopogonium mucunoides* pode ser indicada como planta isca para estudos de diversidade nos diferentes sistemas de uso das áreas em questão.

TABELA 4 Número total de isolados de bactérias obtidos de diferentes leguminosas em vários sistemas de da terra na região do Alto Solimões- AM e seus respectivos índices diversidade.

Suts	Total de isolados	Índice de diversidade Shannon (H')
Capoeira Nova	149	1,64
Capoeira Velha	152	1,66
Agrofloresta	89	1,49
Agricultura	38	1,39
Pastagem	14	0,89
TOTAL	442	-

TABELA 5 Espécies leguminosas e seus respectivos índices de diversidade.

ESPÉCIES	Índice de diversidade Shannon (H')
<i>Acacia multipinnata</i> (AM)	1,16
<i>Calopogonium mucunoides</i> (CM)	1,51
<i>Dalbergia inundata</i> (DI)	0,64
<i>Desmodium adscendens</i> (DA)	1,23
<i>Entada</i> sp. (E)	0,64
<i>Inga caynnensis</i> (IC)	1,49
<i>Inga edulis</i> (IE)	1,48
<i>Inga heterophylla</i> (IH)	0,24
<i>Inga umbellifera</i> (IU)	0,78
<i>Inga venusta</i> (IV)	1,41
<i>Machaerium floribundum</i> (MF)	0,60
<i>Mimosa pudica</i> (MP)	0,48
<i>Mimosa quadrivalvis</i> (MQ)	0,54
<i>Piptadenia suaveolens</i> (PS)	0,50
<i>Pitryocarpa pteroclada</i> (Pt)	1,39
<i>Pueraria phaseoloides</i> (Pp)	1,33

5.2 Autenticação e eficiência dos isolados

No experimento de autenticação, dos 105 representantes inoculados em garrafas de vidro âmbar recicláveis de 500 mL (âmbar), apenas 7 isolados nodularam e 98 não nodularam siratro. Bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas são microrganismos abundantes nos solos de muitos ecossistemas e desempenham papel importante quanto à entrada de nitrogênio no sistema. Além disso, o fato de essas bactérias não terem nodulado siratro não significa que não possuam a capacidade de nodulação, já que não foram inoculadas na espécie em que foi isolada e isso indicaria uma especificidade destas bactérias com seu hospedeiro de origem (Faria et al., 1999; Moreira et al., 2006). Também, a alta temperatura, no período em que o experimento ficou instalado (setembro a novembro de 2010), pode ter influenciado a nodulação pelas bactérias inoculadas. Os isolados que foram capazes de induzir nódulos na planta utilizada como isca foram provenientes de três sistemas de uso (agricultura, capoeira nova e agrofloresta) e os seguintes hospedeiros: *Pueraria phaseoloides*-agricultura (Pp29-03A), *Dalbergia inundata*-capoeira nova (DI21-03), *Inga caynensis*-agricultura (IC70A-03A), *Pitryocarpa pteroclada*-capoeira nova (Pt31-02C), *Pueraria phaseoloides* agricultura (Pp29-01C), *Inga edulis*-agricultura (IE29-01B) e *Mimosa quadrivalvis*-agrofloresta (MQ66-02B).

Os nódulos obtidos foram reisolados para a confirmação das características culturais do isolado inoculado. No trabalho de Lima et al. (2009) com diluições do solo das mesmas áreas e utilizando também siratro como planta isca, verificou-se alto número de nódulos nos tratamentos referentes aos sistemas de uso agricultura e agrofloresta, indicando que as populações de bactérias desses sistemas de uso presentes nos solos estariam nodulando as leguminosas presentes na área em questão.

No experimento de eficiência (Tabela 6) não foi observada a presença de nódulos nas testemunhas (com N mineral e com N mineral “start”), ficando

clara a ausência de contaminação nas mesmas. Apenas dois isolados foram ineficientes no parâmetro eficiência relativa, ou seja, foram iguais ao controle sem nitrogênio mineral. Os outros 103 isolados se mostraram eficientes, promovendo maior crescimento em relação à testemunha sem nitrogênio e menor crescimento em relação àquela em que foi adicionado o nitrogênio mineral. Esse aumento na produção de parte aérea naqueles tratamentos em que não houve nodulação pode ter sido em função da produção de hormônios pelas bactérias inoculadas.

No parâmetro matéria da parte aérea seca (MPAS) e eficiência relativa (EFR, %), nenhum dos isolados se igualou à testemunha nitrogenada, porém, o isolado MQ66-02B (agrofloresta) que nodulou siratro foi superior a todos os outros isolados, inclusive aos controles BR29 e UFLA-04212. Já o isolado Pp32-02A (capoeira nova) foi estatisticamente igual a BR29 e 56,2% dos isolados foi igual ao controle UFLA-04212. A estirpe BR29, utilizada como controle nos estudos de Lima et al.(2009), também foi eficiente, o que corrobora os resultados do presente estudo.

Quanto ao incremento em matéria de raiz seca, também nenhum dos isolados foi igual à testemunha nitrogenada, mas pôde-se verificar que boa parte dos isolados (44,7%) foi estatisticamente igual ao controle UFLA-04212, tendo a BR29 e 6,6% dos isolados sido inferiores a estes.

Na nodulação, o maior número de nódulos foi observado para o isolado MQ66-02B, que foi superior a todos os outros tratamentos. O isolado Pp29-03A (agricultura) foi estatisticamente igual ao controle positivo UFLA-04212, porém, inferior ao controle BR29. Já para o peso de nódulos secos, os mais eficientes estatisticamente foram IE29-01B (agricultura) e Pt31-02C (capoeira nova).

TABELA 6 Matéria da parte aérea seca (MPAS), em mg; matéria de raiz seca (MRS), em mg; número de nódulos; peso de nódulos seco (PNS), em mg e eficiência relativa (EFR) dos 105 isolados representantes dos grupos culturais isolados de diferentes leguminosas e sistemas de uso da terra. Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

TRATAMENTO	MPAS (mg)	MRS (mg)	NN**	PNS(mg)	EFR(%)
AM71-01A	12,0 h	6,0 e	0 g	0 g	3,4 h
CM50-01A	19,3 h	12,0 e	0 g	0 g	5,5 h
TEST C/N "start"	38,6 h	20,6 e	0 g	0 g	11,1 h
IC22-03A	48,3 g	32,0 e	0 g	0 g	13,8 g
IV81A-03B	57,0 g	32,0 e	0 g	0 g	16,3 g
AM68-03B	73,0' g	71,6 d	0 g	0 g	20,8' g
CM83-02C	74,0 g	65,3 d	0 g	0 g	21,1 g
IE64-02C	76,0 g	93,3 c	0 g	0 g	21,7 g
Pp29-03C	76,3 g	59,3 d	0 g	0 g	21,8 g
CM50-03A	87,0 f	108,3 b	0 g	0 g	24,8 f
Pp29-03A	88,3 f	81,0 c	4,6 e	13,3 e	25,2 f
CM70A-01A	89,0 f	32,0 e	0 g	0 g	25,4 f
Pt66-03A	89,0 f	58,3 d	0 g	0 g	25,4 f
DI21-03B	89,3 f	84,6 c	0 g	0 g	25,5 f
E66-03B	90,0 f	80,3 c	0 g	0 g	25,7 f
IV24A-03D	91,3 f	60,6 d	0 g	0 g	26,1 f
DI21-03A	92,0 f	49,3 d	3,6 f	15,6 d	26,3 f
IV24A-01C	92,3 f	66,3 d	0 g	0 g	26,4 f
Pt71A-01B	92,3 f	86,3 c	0 g	0 g	26,4 f
IV71A-01A	92,6 f	60,0 d	0 g	0 g	26,4 f
Pp29-01D	93,0 f	92,0 c	0 g	0 g	26,5 f
CM68A-03D	93,0 f	62,6 d	0 g	0 g	26,6 f
DA92-03A	93,3 f	80,0 c	0 g	0 g	26,6 f
Pt71A-01C	94,0 f	103,0 c	0 g	0 g	26,8 f
IC79-01B	94,3 f	72,3 d	0 g	0 g	26,9 f
AM68-02C	95,0 f	104,6 c	0 g	0 g	27,1 f
IV71A-03A	96,0 f	104,0 c	0 g	0 g	27,4 f

...Continua...

“TABELA 6, Cont.”

AM22-01C	96,0	f	118,0	c	0	g	0	g	27,4	f
Pp31-03A	96,0	f	76,0	d	0	g	0	g	27,4	f
CM80-03A	96,0	f	125,3	c	0	g	0	g	27,4	f
DI21-01B	96,3	f	89,0	c	0	g	0	g	27,5	f
IH54-02A	96,3	f	81,3	c	0	g	0	g	27,5	f
Pt66-03B	96,6	f	83,0	c	0	g	0	g	27,6	f
IV59-02A	97,0	f	85,0	c	0	g	0	g	27,7	f
IC79-03D	97,0	f	57,0	d	0	g	0	g	27,7	f
CM68A-01F	97,3	f	86,3	c	0	g	0	g	27,8	f
IC68A-02B	97,3	f	62,3	d	0	g	0	g	27,8	f
Pt32-01B	98,3	f	115,0	b	0	g	0	g	28,0	f
CM83-01B	99,3	f	95,3	c	0	g	0	g	28,3	f
Pt71A-03A	100,0	f	29,6	e	0	g	0	g	28,5	f
IC76-01A	101,0	f	94,0	c	0	g	0	g	28,8	f
CM68A-01G	101,0	f	96,3	c	0	g	0	g	28,8	f
UFLA-04212	101,0	f	97,0	c	4,3	e	7,3	f	28,8	f
E66-01C	102,0	f	112,0	c	0	g	0	g	29,1	f
MF68-03A	102,0	f	101,3	c	0	g	0	g	29,1	f
PS71-01B	102,3	f	5,3	e	0	g	0	g	29,2	f
IV24A-03C	102,3	f	94,0	c	0	g	0	g	29,2	f
Pp31-01A	102,6	f	67,0	d	0	g	0	g	29,3	f
CM80-01B	103,0	f	140,3	c	0	g	0	g	29,4	f
IU23-01A	103,3	f	77,0	d	0	g	0	g	29,5	f
IH54-03A	103,3	f	86,3	c	0	g	0	g	29,5	f
DA59-03A	103,6	f	83,3	c	0	g	0	g	29,6	f
IC68A-01A	103,6	f	70,6	d	0	g	0	g	29,6	f
CM83-01A	104,0	f	102,3	c	0	g	0	g	29,7	f
IE64-02D	105,0	f	76,0	d	0	g	0	g	30,0	f
MF68-01A	106,3	f	96,6	c	0	g	0	g	30,3	f
Pp29-01B	106,3	f	86,3	c	0	g	0	g	30,3	f
AM68-02A	106,3	f	110,0	b	0	g	0	g	30,3	f
CM65-02A	107,3	f	107,3	c	0	g	0	g	30,6	f
IC68-03B	107,6	f	123,3	c	0	g	0	g	30,7	f
Pt66-01B	107,6	f	59,3	d	0	g	0	g	30,7	f
CM83-03A	107,6	f	73,0	d	0	g	0	g	30,7	f
DA17-03B	108,0	f	86,0	c	0	g	0	g	30,8	f
IE59-03A	109,0	f	115,3	c	0	g	0	g	31,1	f
IV24A-03A	109,3	f	85,3	c	0	g	0	g	31,2	f
CM83-02A	109,3	f	79,3	c	0	g	0	g	31,2	f

...Continua...

“TABELA 6, Cont.”

IC70A-02A	109,6 f	104,0 c	0 g	0 g	31,3 f
IU23-01B	110,3 f	81,3 c	0 g	0 g	31,5 f
IV81A-02A	111,0 e	124,3 c	0 g	0 g	31,7 e
AM68-03A	111,3 e	95,6 c	0 g	0 g	31,8 e
CM70A-01B	111,3 e	99,6 c	0 g	0 g	31,8 e
MQ66-03B	111,6 e	122,0 c	0 g	0 g	31,9 e
CM83-02B	112,0 e	53,0 d	0 g	0 g	32,0 e
IC22-02B	112,3 e	133,3 c	0 g	0 g	32,0 e
MP28-01A	112,6 e	78,0 c	0 g	0 g	32,1 e
IE69-02A	113,3 e	64,6 d	0 g	0 g	32,3 e
IE19-01A	114,0 e	75,3 d	0 g	0 g	32,5 e
IC79-02A	114,0 e	120,0 c	0 g	0 g	32,5 e
IE32-02A	114,3 e	81,0 c	0 g	0 g	32,6 e
CM59-01A	114,3 e	113,0 c	0 g	0 g	32,6 e
Pp21-02C	114,3 e	120,0 c	0 g	0 g	32,6 e
Pt32-02C	115,0 e	92,0 c	0 g	0 g	32,8 e
CM68A-03C	115,3 e	123,6 c	0 g	0 g	32,9 e
PS71-01C	116,3 e	72,3 d	0 g	0 g	33,2 e
IE21-01B	118,0 e	123,3 c	0 g	0 g	33,7 e
Pt31-02C	118,0 e	92,0 c	6,3 d	33,3 a	33,7 e
IC76-03A	118,0 e	120,0 c	0 g	0 g	33,7 e
CM18-01A	118,3 e	117,6 c	0 g	0 g	33,8 e
DI21-02C	118,6 e	87,6 c	0 g	0 g	33,9 e
CM60-01A	119,3 e	85,0 c	0 g	0 g	34,0 e
DA92-01A	120,0 e	54,0 d	0 g	0 g	34,2 e
Pp29-03B	121,3 e	131,3 c	0 g	0 g	34,6 e
Pp29-01A	121,3 e	117,0 c	0 g	0 g	34,6 e
CM70A-03A	121,6 e	103,3 c	0 g	0 g	34,7 e
IC68A-01B	121,6 e	122,3 c	0 g	0 g	34,7 e
DA54-02A	124,3 e	101,0 c	0 g	0 g	35,5 e
CM70A-03B	124,6 e	124,3 c	0 g	0 g	35,6 e
IE18-01A	125,0 e	82,3 c	0 g	0 g	35,7 e
IC22-01A	127,3 e	86,0 c	0 g	0 g	36,3 e
DA92-02A	129,3 e	84,0 c	0 g	0 g	36,9 e
Pt66-02C	130,0 e	119,6 c	0 g	0 g	37,1 e
IE17-02D	131,6 e	115,3 b	0 g	0 g	37,6 e
IC70A-03A	132,3 e	120,3 c	17,6 b	27,3 c	37,8 e
IE29-01B	134,0 e	97,0 c	17,3 b	33,3 a	38,2 e

...Continua...

“TABELA 6, Cont.”

Pp32-02A	141,3 d	100,6 c	0 g	0 g	40,3 d
BR29	150,3 d	24,0 e	10,6 c	6,3 f	42,9 d
Pp29-01C	183,0 c	106,3 b	3,6 f	31,3 b	52,2 c
MQ66-02B	244,3 b	86,3 c	19,6 a	32,0 b	69,8 b
TEST COM N	350,0 a	358,6 c	0 g	0 g	100 a
CV(%)	14,38	19,88	6,08	33,34	14,38

5.3 Extração, amplificação e sequenciamento do gene 16S rDNA

A extração, a amplificação parcial e o sequenciamento do gene 16SrDNA ribossomal dos 105 isolados representantes foi bem sucedida em 52 isolados, incluindo 4 dos 7 que nodularam e 48 dos 98 que não nodularam. O sucesso não atingido para todos os isolados decorreu da não amplificação de alguns isolados e da baixa qualidade de algumas sequências obtidas.

Os resultados obtidos pela análise das sequências para aqueles isolados que nodularam denotaram que não houve alta diversidade de gêneros de bactérias nodulíferas fixadoras de nitrogênio nodulando as espécies *Pueraria phaseoloides*, *Pytirocarpa pteroclada*, *Inga edulis* e *Mimosa quadrivalvis*, restringindo-se ao gênero *Rhizobium*. As bactérias que nodularam *Pueraria phaseoloides* foram similares a *Rhizobium hainanense*, uma espécie que foi isolada e descrita a partir das seguintes leguminosas tropicais na China: *Stylosanthes guyanansi*, *Centrosema pubescens*, *Desmodium triquetrum*, *Desmodium triquetrum*, *Desmodium gyroides*, *Desmodium heterophyllum*, *Desmodium sinuatum*, *Tephrosia candida*, *Acacia sinuata*, *Arachis hypogaea*, *Zoniadiphylla*, *Uraria crinita* e *Macroptilium lathyroides* (Chen et al., 1997). Na mesma província, isolados de *Pueraria phaseoloides*, quando comparados com estirpes referência, ficaram no mesmo grupo fenotípico das referências *Rhizobium* e *Agrobacterium* (Gao et al., 1994). Esta espécie também revelou ser promíscua, nodulando tanto com espécies de crescimento rápido quanto crescimento lento (Pérez et al., 2008).

Estirpe SEMIA 6175, pertencente ao gênero *Bradyrhizobium*, é recomendada como inoculante pela RELARE e autorizada pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para *Pueraria phaseoloides* (Moreira & Siqueira, 2006) e este gênero já foi isolado e evidenciado nesta espécie em solos brasileiros (Moreira, 2008). As bactérias que nodularam *Inga edulis* e *Mimosa quadrivalvis* foram similares a *Rhizobium tropici*, espécie que parece ser originária da América do Sul (Martínez-Romero et al., 1991), devido à frequência de isolamento desta espécie, principalmente no Brasil, na cultura do feijão (Hungria et al., 2000).

Lima et al. (2009) também identificaram esta espécie a partir de diluições do solo usando como planta isca o siratro. Para *Inga edulis*, bactérias nodulíferas de crescimento rápido, identificadas como *Bradyrhizobium*, nodularam esta espécie (Leblanc et al., 2005), diferente do que foi encontrado neste trabalho.

Recentes trabalhos com isolados provenientes de nódulos de várias espécies de *Mimosa* têm identificado a simbiose efetiva dessas espécies com o gênero *Burkholderia* (Bontemps et al., 2010; Chen et al., 2005; Moreira, 2008), o que também não pode ser observado neste estudo. A espécie *Pitryocarpa pteroclada* foi nodulada pela bactéria identificada como *Rhizobium* sp., não tendo sido encontrada nenhuma informação na literatura para dar suporte ao resultado encontrado.

A planta isca siratro, nos mesmos sistemas de uso, mostrou-se eficiente na captura de várias espécies e gêneros de rizóbio, inclusive *Rhizobium tropici* e *Rhizobium* sp. (Lima et al., 2009), porém, não foi capaz de capturar o gênero *Rhizobium hainanense* encontrado neste trabalho, evidenciando uma particularidade da espécie *Pueraria phaseoloides* em simbiose com esta bactéria.

Dentre aqueles isolados que não expressaram a nodulação com siratro, estes foram similares com maior frequência aos seguintes gêneros:

Brevibacillus, em que 7 isolados se encaixaram nesta classificação, 8 ao gênero *Enterobacter* sp., 6 pertencentes ao gênero *Pantoea*, 6 ao gênero *Bacillus* e 8 ao gênero *Paenibacillus*. Com menor frequência ocorreram os gêneros *Klebsiella*, *Chryseobacterium*, *Bacterium*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* e bactérias identificadas como *Uncultured bacterium* e *Gram negative bacterium*. No sistema de uso capoeira nova predominou o gênero *Enterobacter*; para capoeira velha, os gêneros *Pantoea* e *Paenibacillus*; para agricultura, *Paenibacillus* e para agrofloresta e pastagem, *Bacillus*. Tal fato estaria indicando a presença de outros microrganismos coexistindo como endofíticos dentro dos nódulos.

Vários trabalhos vêm revelando a presença de endofíticos em nódulos de leguminosas. Em colmo, folhas e nódulos de trevo vermelho, Sturz et al. (1997) mostraram colonização pelos endofíticos *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter agglomerans*, *Rhizobium* spp., *Agrobacterium* spp., *Curtobacterium* spp., *Bacillus* spp., *Bordetella* spp., *E. coli*, *Pasteurella* spp., *Pseudomonas* spp. e *Xanthomonas*. Bactérias endofíticas, como *Pantoea*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Agrobacterium* e *Burkholderia*, também já foram verificadas em nódulos de leguminosas por meio da análise filogenética do gene 16SrRNA (Li et al., 2008). Essas bactérias não causaram nenhum efeito problemático para a planta, mas revelaram um grande potencial na promoção de crescimento da planta pela produção de AIA (ácido indol-3-acético). A maioria dos endofíticos dos nódulos é de *Agrobacterium tumefaciens*, mas também *Bacillus* e *Pseudomonas* podem ser isolados de nódulos (Mrabet et al., 2006).

Lima et al. (2009) também verificaram alguns gêneros incomuns em nódulos de siratro que, provavelmente, também poderiam ser bactérias endofíticas, mas precisariam ser mais bem estudadas para esta afirmação. Também foi possível observar a presença de mais de um microrganismo no mesmo nódulo, como ocorreu nos seguintes isolados: IV24A-03D e IV24A-03^a, com espécies diferentes de bactérias, identificadas como *Paenibacillus* sp. e

Brevibacillus formosus, respectivamente, para os isolados Pp29-01A e Pp29-01D, identificados como *Enterobacter* e *Pantoea* e para IC68A-01F e IC68A-01G, identificados como *Enterobacter* e *Bacillus*.

Os isolados representantes sequenciados, seguido do referente grupo cultural, sistema de uso correspondente, número de isolados deste grupo, número de pares de base do isolado representante, espécie ou gênero correspondente, percentagem da similaridade e número de acesso no NCBI estão listados na Tabela 7. As similaridades dos representantes estudados com os acessados no GenBank variaram de 97% a 100% (Figura 7).

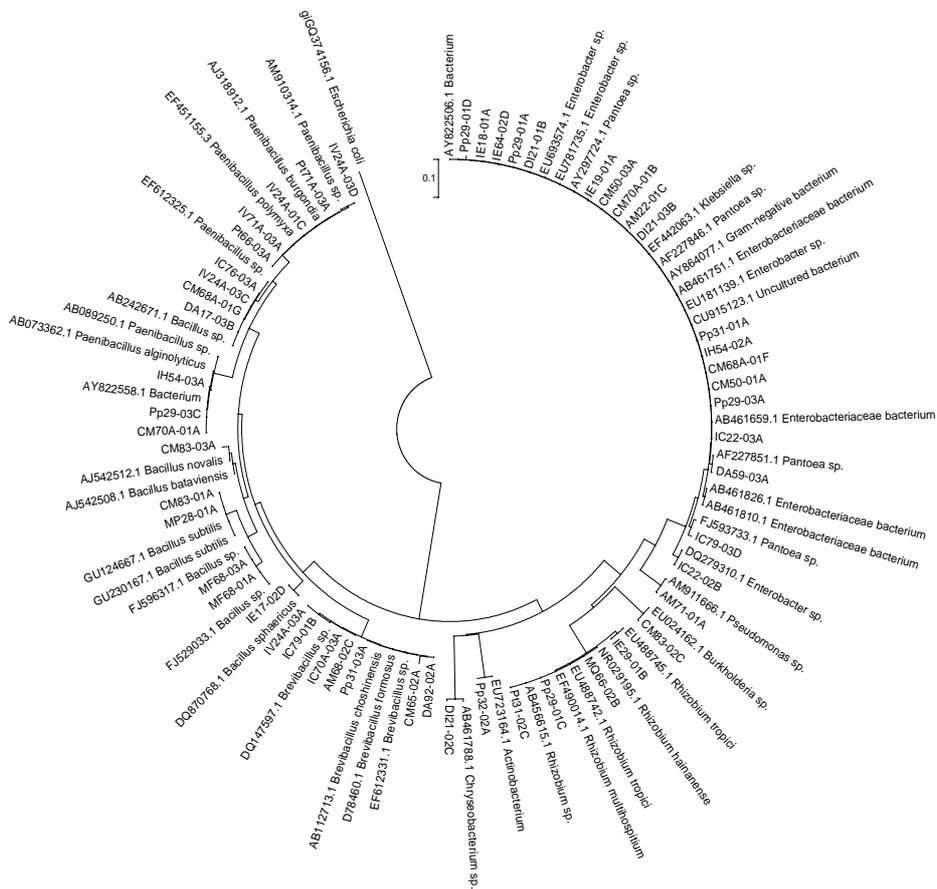


FIGURA 7 Neighbour-joining filogenia para 16S rDNA de isolados representantes dos grupos culturais isolados de diferentes leguminosas. A raiz usada para árvore foi *Escherichia coli*. O tamanho do alinhamento foi de 560 pb. A porcentagem suporte do bootstrap foi de 2000 replicações.

TABELA 7 Identificação de isolados baseada nas sequências mais similares encontradas no GenBank (NCBI).
Os isolados são oriundos de diferentes leguminosas e sistemas de uso da terra no Alto Solimões, AM.

Isolado representante	Grupo cultural	SUTs ¹	NI ²	Npb ³	Sequências mais similares encontradas no Genbank (NCBI)		
					Espécie	Similaridade (%)	Número de acesso GenBank (NCBI)
Pp31-03A	1	CN	4	639	<i>Brevibacillus choshinensis</i>	100	AB112713.1
IE64-02D	2	CN	1	580	<i>Enterobacter</i> sp.	99	EU693574.1
DI21-03B	3	CN	5	738	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>	99	AB461751.1
Pp31-01A	4	CN	4	527	<i>Klebsiella</i> sp.	99	EF442063.1
IE18-01A	5	CN	1	610	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>	99	AB461826.1
DI21-02C	6	CN	24	752	<i>Chryseobacterium</i> sp.	97	AB461788.1
DI21-01B	7	CN	1	695	<i>Pantoea</i> sp.	99	AF227846.1
IC22-03A	8	CN	4	703	<i>Bacterium</i>	99	AY822506.1
MP28-01A	9	CN	7	745	<i>Bacillus subtilis</i>	100	GU230167.1
AM22-01C	10	CN	1	728	<i>Pantoea</i> sp.	99	AF227846.1
IC22-02B	11	CN	5	689	<i>Enterobacter</i> sp.	97	DQ279310.1
Pp32-02A	12	CN	16	617	<i>Actinobacterium</i> sp.	99	EU723164.1
Pt31-02C	13	CN	1	945	<i>Rhizobium</i> sp.	99	AB56615.1
IC79-01B	14	CV	2	675	<i>Brevibacillus</i> sp.	100	DQ147597.1
DA59-03A	15	CV	4	640	<i>Pantoea</i> sp.	99	AF227851.1
IE19-01A	16	CV	6	710	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>	99	AB461751.1
CM65-02A	17	CV	2	500	<i>Brevibacillus</i> sp.	99	EF612331.1
CM50-01A	18	CV	1	683	<i>Uncultured bacterium</i>	98	CU915123.1
IH54-03A	19	CV	1	543	<i>Paenibacillus</i> sp.	98	AB089250.1
AM71-01A	20	CV	1	670	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	AM911666.1
IC79-03D	21	CV	2	674	<i>Pantoea</i> sp.	98	FJ593733.1
IH54-02A	22	CV	6	604	<i>Pantoea</i> sp.	99	AY297724.1
IC76-03A	23	CV	6	596	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	EF612325.1
Pt71A-03A	24	CV	1	739	<i>Paenibacillus burgondia</i> sp.	99	AJ318912.1

...Continua...

“TABELA 7, Cont.”

IV71A-03A	25	CV	1	666	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	98	AJ223989.1
CM50-03A	26	CV	1	623	<i>Klebsiella</i> sp.	98	EF442063.1
IV24A-03C	27	AGRI	5	605	<i>Bacillus</i> sp.	100	AB242671.1
CM70A-01A	28	AGRI	7	649	<i>Paenibacillus alginolyticus</i>	98	AB073362.1
IV24A-01C	29	AGRI	1	673	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	100	EF451155.3
Pp29-01A	30	AGRI	3	618	<i>Enterobacter</i> sp.	100	EU781735.1
Pp29-03C	31	AGRI	4	562	<i>Bacterium</i>	99	AY822558.1
Pp29-01D	32	AGRI	4	561	<i>Pantoea</i> sp.	98	AF227846.1
CM70A-01B	33	AGRI	1	790	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i>	99	AB461659.1
IV24A-03D	34	AGRI	1	689	<i>Paenibacillus</i> sp.	98	AM910314.1
IV24A-03A	35	AGRI	10	711	<i>Brevibacillus formosus</i>	98	D78460.1
PS71-01C	36	AGRI	1	649	<i>Gram negative bacterium</i>	99	AY864077.1
IE69-02A	37	AGRI	3	760	<i>Brevibacillus</i> sp.	99	EF612331.1
IE29-01B	38	AGRI	5	780	<i>Rhizobium tropici</i>	99	EU488745.1
Pp29-01C	39	AGRI	2	850	<i>Rhizobium hainanense</i>	98	NR_029195.1
AM68-02C	40	AGRO	3	697	<i>Brevibacillus</i> sp.	100	DQ147597.1
MF68-01A	41	AGRO	2	426	<i>Bacillus</i> sp.	100	FJ596317.1
IE17-02D	42	AGRO	5	757	<i>Bacillus sphaericus</i>	99	DQ870768.1
DA17-03B	43	AGRO	7	693	<i>Paenibacillus rizhosphaerae</i>	99	AY751754.1
Pt66-03A	44	AGRO	1	739	<i>Paenibacillus</i> sp.	99	AJ318912.1
MF68-03A	45	AGRO	4	596	<i>Bacillus</i> sp.	100	FJ529033.1
CM68A-01F	46	AGRO	1	799	<i>Enterobacter</i> sp.	100	EU181139.1
CM68A-01G	47	AGRO	1	549	<i>Bacillus</i> sp.	100	AB242671.1
MQ66-02B	48	AGRO	1	890	<i>Rhizobium tropici</i>	99	EU488742.1
CM83-03A	49	PAST	22	630	<i>Bacillus bataviensis</i>	98	AJ542508-1
DA92-02A	50	PAST	6	680	<i>Brevibacillus choshinensis</i>	100	AB112713.1
CM83-02C	51	PAST	2	483	<i>Burkholderia</i> sp.	98	EU024162.1
CM83-01A	52	PAST	24	727	<i>Bacillus subtilis</i>	100	DQ279310-1

SUTs¹= sistema de uso da terra: CN: capoeira nova, CV: capoeira velha, AGRI: agricultura, AGRO: agrofloresta, PAST: pastagem. NI²: número de isolados representantes no grupo cultural correspondente. NPb³: número de pares de base da sequência do respectivo isolado, comparado no GenBank.

5.4 Avaliação da produção de substâncias reguladoras - AIA

Verificou-se que todos os isolados testados, incluindo o ineficiente, apresentaram a habilidade de produzir o fitormônio AIA (ácido indol-3-acético), independente da ausência ou da presença de L-triptofano adicionado ao meio de cultura. Os valores variaram de 2,1 a 14,1 µg/mL na ausência de triptofano e de 4,4 a 39,0 µg/mL na presença de triptofano. Na ausência de triptofano, o isolado AM68-02A (agrofloresta) superou a estirpe BR11001 (*Azospirillum brasiliense*), não tendo esta se igualado a nenhum dos outros tratamentos. O menor valor encontrado foi para o isolado Pt66-01B (agrofloresta), que apresentou uma média de 2,1 µg/mL (Tabela 9).

Quando o meio foi suplementado com 100 µg/mL de L-triptofano, nenhum dos tratamentos superou o controle positivo que apresentou o maior valor produzido de 39,0 µg/mL e o menor valor para o isolado CM83-01A (capoeira velha), de 4,4 µg/mL. Uma vez que o controle negativo AM71-01A (ineficiente) produziu o fitormônio, constatou-se que este não seria o agente de contribuição para o incremento na matéria seca da parte aérea em siratro. Outros hormônios não avaliados poderiam estar contribuindo para o efeito observado.

Os resultados de correlação tanto no tratamento com triptofano quanto sem triptofano não foram significativos, ou seja, a matéria da parte aérea seca (MPAS) não interferiu na produção de ácido indole-3-acético (Tabela 8).

Vários fitormônios, além da auxina, podem ser produzidos como citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno. A produção desses fitormônios já foi relatada em várias bactérias, como *Gluconoacetobacter*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Erwinia*, *Pantoea* e *Pseudomonas* (Lee, 2004; Zakrahova et al., 1999; Kuklinsky-Sobral, 2004). O AIA é de ocorrência natural e provoca efeitos fisiológicos na planta, podendo ter várias vias metabólicas: indole-3-acetamida (IAM), indole-3-piruvato (IpyA) e triptamina (TAM) (Theunis et al., 2004). Além disso, esta substância afeta consideravelmente a morfologia da raiz, o que

possibilita maior entrada de nutrientes e exsudação radicular e até a própria raiz da planta pode exsudar componentes orgânicos, inclusive o triptofano, sendo um dos fatores que induzem à produção de fitormônios pelas bactérias (Dakora & Phillips, 2002). Porém, existem trabalhos que relatam que a produção muito alta (171,17 µg/mL) do fitormônio pode ser tóxica para a planta, assim como concentrações muito baixas podem não exercer efeito algum no crescimento da planta. Neste trabalho não foram encontrados valores tão altos de AIA, indicando a possibilidade de essas bactérias estarem agindo como fitoestimuladores.

TABELA 8 Correlação de Pearson obtida entre os atributos MPAS (matéria da parte aérea seca) e produção de AIA (ácido índole -3-acético) nos tratamentos com triptofano e sem triptofano.

	MPAS/AIA (µg/L)
Com triptofano	0,224 ^{ns}
Sem triptofano	0,211 ^{ns}

ns: não significativo a 5%.

Alguns dos isolados que foram submetidos à avaliação na produção de AIA, no banco de dados, foram similares aos gêneros e espécies: *Enterobacter* (IE64-02D), *Bacillus bataviensis* (CM83-03A), *Paenibacillus rizhosphaerae* (DA17-03B), *Bacillus subtilis* (CM83-01A), *Bacillus* sp. (MF68-01A) e *Pseudomonas* sp. (AM71-01A) e revelaram potencialidade em produzir o fitormônio. Em estudos com soja, foi verificado, em 34% dos isolados identificados como *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Enterobacter*, o potencial para promoção do crescimento vegetal pela produção do fitormônio AIA (Kuklinsky-Sobral et al., 2004).

TABELA 9 Produção de auxina (AIA) por isolados crescidos em meio Dygs na ausência e na presença de L-triptofano.

Isolados	Similaridade no Genbank	Ausência de L-triptofano	Isolados	Presença de L-triptofano (100mg.L ⁻¹)
	Espécie	AIA (µg/mL)		AIA (µg/mL)
AM68-02A	-	14,1 a	BR11001 ¹	39,0 a
BR11001 ¹	-	12,6 b	IC68A-01A	30,5 b
PS71-01B	-	9,0 c	Pt66-01B	29,5 b
IC68-03B	-	8,2 d	DA17-03B	22,3 c
IE64-02D	<i>Enterobacter</i> sp.	7,5 e	CM83-03A	17,2 d
CM83-03A	<i>Bacillus bataviensis</i>	7,5 e	PS71-01B	16,7 d
IU23-01A	-	7,2 e	IU23-01B	15,6 e
DA17-03B	<i>Paenibacillus rizhosphaerae</i>	6,4 f	IU23-01A	14,9 e
Pp29-01B	-	6,2 f	IV24A-03C	13,6 f
CM83-01A	<i>Bacillus subtilis</i>	5,9 f	Pp29-01B	13,1 f
E66-01C	-	5,9 f	IC68-03B	11,6 g
IC68A-01A	-	5,2 g	AM68-02A	11,3 g
Pp31-01A	-	4,9 g	MF68-01A	6,9 h
MF68-01A	<i>Bacillus</i> sp.	4,4 h	E66-01C	6,4 h
DA59-03A	-	3,6 i	IE64-02D	6,2 h
AM71-01A ²	<i>Pseudomonas</i> sp.	2,9 j	AM71-01A ²	5,9 h
IV24A-03C	-	2,6 j	Pp31-01A	5,1 i
IU23-01B	-	2,6 j	DA59-03A	4,4 i
Pt66-01B	-	2,1 k	CM83-01A	4,4 i
CV (%)		5,41		5,36

- Isolados não sequenciados

¹Controle positivo

²Controle negativo

6 CONCLUSÕES

A diversidade fenotípica de bactérias isoladas nos diferentes sistemas de uso da região do Alto Solimões foi alta, porém, foi baixa a diversidade de espécies de bactérias nodulíferas conhecidas encontradas nos nódulos das diferentes espécies leguminosas.

Estirpes tão eficientes quanto os controles positivos são indicadas para estudos posteriores, em testes de eficiência agronômica.

A diversidade de gêneros incomuns encontrada nos nódulos de diferentes leguminosas evidencia a possibilidade da coexistência destes com bactérias fixadoras de nitrogênio.

As bactérias isoladas de nódulos das diferentes leguminosas estudadas foram geneticamente distintas entre os diferentes sistemas de uso da terra.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASGHAR, H. N.; ZAHIR, Z. A.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 35, n. 4, p. 231-237, June 2002.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Current protocols in molecular biology**. New York: Greene/Wiley Interscience, 1987.

AZEVEDO, J. L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: **Ecologia microbiana**. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). Jaguariúna: Embrapa/CNPMA, p.445-461, 1998.

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**, Hange, v. 46, n. 1, p. 3-16, Dec. 1971.

BLAST: Basic local alignment search tool. Rocville, 2009. Disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 20 dez. 2009.

BONTEMPS, C.; ELLIOTT, G. N.; SIMON, M. F.; JÚNIOR, F. B. R.; GROSS, E.; LAWTON, R. C.; ELIAS NETO, N.; LOUREIRO, M. F.; FARIA, S. M.; SPRENT, J. I.; JAMES, E. K.; YOUNG, J. P. W. Burkholderia species are ancient symbionts of legumes. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 44-52, Jan. 2010.

CHEN, W. M.; FARIA, S. M.; STRALIOTTO, R.; PITARD, R. M.; ARAÚJO, J. L. S.; CHOU, J. H.; CHOU, Y. J.; BARRIOS, E.; PRESCOTT, A. R.; ELLIOTT, G. N.; SPRENT, J. I.; YOUNG, J. P. W.; JAMES, E. K. Proof that *Burkholderia* Strains Form Effective Symbioses with Legumes: a Study of Novel *Mimosa*-Nodulating Strains from South America. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 11, p. 7461-747, Nov. 2005.

CHEN, W. X.; TAN, Z. Y.; GAO, J. L.; LI, Y.; WANG, E. T. *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.47, n. 3, p. 870-873, July 1997.

DAKORA, F. D.; PHILLIPS, D. A. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 245, n. 1, p. 35-47, Aug. 2002.

FARIA, S. M.; LIMA, H.; OLIVARES, F.; MELO, R. B.; XAVIER, R. P. Fixação biológica de nitrogênio em espécies florestais: nodulação, morfologia e estrutura de nódulos: especificidade hospedeira e implicações na sistemática de Leguminosae. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. (Ed.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Lavras: SBCE/UFLA/DCS, p.667-686,1999.

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. **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 seis áreas amostrais relacionadas ao projeto “Conservation and sustainable management of below-ground biodiversity: phase 1”, município de Benjamin Constant, (AM)**. Rio de Janeiro: Embrapa, 2005. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento da Embrapa Solos).

FLORENTINO, L. A. **Relações simbióticas e edáficas de *Azorhizobium doebereineriae* e de outras espécies nodulíferas em solos coletados próximos ao sistema radicular de *Sesbania virgata* (cav.) pers.** 2007. 62p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology**: with special reference to the microorganisms of the soil. New York: McGraw-Hill, 1928. 145p.

GAO, J. L.; SUN, J. G.; LI, Y.; WANG, E. T.; CHEN, W. X. Numerical taxonomy and DNA relatedness of tropical rhizobia isolated from Hainan Province, China. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 44, n. 1, p. 151-158, Jan. 1994.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: Agricultural Experiment Station, 1950. 32p. (Circular , 347; Solução, 2).

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

JESUS, E. C.; MARSH, T. L.; TIEDJE, J. M.; MOREIRA, F. M. S. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **International Society for Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 3, n. 9, p. 1004-1011, Sept. 2009.

JESUS, E. C.; MOREIRA, F. M. S.; FLORENTINO, L. A.; RODRIGUES, M. J. 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.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 16, n. 2, p. 111-120, June 1980.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAUJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 6, n. 12, p. 1244-1251, June 2004.

LEBLANC, H. A.; MCGRAW, R. L.; NYGREN, P.; ROUX, C. L. Neotropical legume tree *Inga edulis* forms N₂-fixing symbiosis with fast-growing Bradyrhizobium strains. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 275, n. 1/2, p. 123-133, Aug. 2005.

LEE, S. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome c biogenesis genes. **Journal of Bacteriology**, Oxford, v. 186, n. 16, p. 5384-91, Aug. 2004.

LI, J. H.; WANG, E. T.; CHEN, W. F.; CHEN, W. X. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 238-246, Jan. 2008.

LIMA, A. S.; NÓBREGA, R. S. A.; BARBERI, A.; SILVA, K.; FERREIRA, D. F.; MOREIRA, F. M. S. Nitrogen fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 319, n. 1/2, p. 127-145, June 2009.

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

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

MOREIRA, F. M. S. Bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam Leguminosae. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: UFLA, p.621-680, 2008.

MOREIRA, F. M. S. **Caracterização de estirpes de rizóbio isoladas de espécies florestais pertencentes a diversos grupos de divergência de Leguminosae introduzidas ou nativas da Amazônia e Mata Atlântica**. 1991. 158p. Tese (Doutorado em Ciências do Solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí.

MOREIRA, F. M. S. Nitrogen-fixing Leguminosae nodulating bacteria. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. (Ed.). **Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian ecosystems**. Wallington: CABI, 2006. p. 237-270.

MOREIRA, F. M. S.; CRUZ, L.; FARIA, S. M.; MARSH, T.; ROMERO, E. M.; PEDROSA, F. O.; PITARD, R. M.; YOUNG, J. P.W. *Azorhizobium doebereineriae* sp. Nov. Microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz). Per. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 29, n. 3, p. 197-206, Apr. 2006.

MOREIRA, F. M. S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSKERS, 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**, Stuttgart, v. 17, n. 1, p. 135-146, 1993b.

MOREIRA, F. M. S.; MAGALHÃES, L. M. S.; SILVA, M. F.; MOREIRA, F. W.; SCARCELLO, J. A. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi II**. Belém: Associação Rizóbio-leguminosas na Amazônia, 1993c. v. 2. (Série Botânica, 9).

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, M. F. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi I**. Belém: Associação Rizóbio-leguminosas na Amazônia, 1993. v. 1. (Série Botânica, 9).

MOREIRA, F. M. S.; SILVA, M. F.; MOREIRA, F. W.; SOUZA, L. A. G. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi III**. Belém: Associação Rizóbio-leguminosas na Amazônia, 1993 d. v. 2. (Série Botânica, 9).

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

MRABET, M.; MNASRI, B.; ROMDHANE, S. B.; LAGUERRE, G.; AOUANI, M. E.; MHAMDI, R. *Agrobacterium* strains isolated from root nodules of common bean specifically reduce nodulation by *Rhizobium gallicum*. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 56, n. 2, p. 304-309, May 2006.

NAVARRETE, A. A. **Estrutura e diversidade de comunidades microbianas em solos sob diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental**. 2009.114p.. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada) - Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

NOGUEIRA, C. L. B. K. **Análise florística e estrutural em áreas de produção agrícola (agrofloresta, agricultura e pasto), na região do Alto Solimões, Amazonas, Brasil**. Manaus: INPA 2007. 36p. (Relatório de PIBIC-INPA).

OLIVEIRA, R. F. M. **Dinâmica vegetacional em áreas de produção agrícola (capoeiras) na região do Alto Solimões**. Manaus: INPA 2007. 36p. (Relatório de PIBIC-INPA).

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

PÉREZ, G.; GÓMEZ, G.; NÁPOLES, M. C.; MORALES, B. Aislamiento y caracterización de cepas de rizobios aisladas de diferentes leguminosas en la región de Cascajal, Villa Clara. **Pastos y Forrajes**, Matanzas, v. 31, n. 2, p. 151-159, abr. 2008.

ROHLF, F. J. **NTSYSpc**: numerical taxonomy system: versão. 2.0. New York: Exeter Software, 2002.

RUMJANEK, N. G.; DOBERT, R. C.; VAN BERKUM, P.; TRIPLETT, E. W. Common soybean inoculants strains in Brazil are members of *Bradyrhizobium elkanii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n.12, p. 4371-4373, Dec. 1993.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, Washington, v. 239, n. 4839, p. 487-491, Jan. 1988.

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences, of the Sciences of the United States of America**, Washington, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, Dec. 1977.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Enhanced suppression of plant growth through production of L-tryptophan-derived compounds by deleterious rhizobacteria. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.172, p. 261-269, 1995.

SHANNON, C. E.; WEAVER, W. **The mathematical theory of communication**. Urbana: University of Illinois, 1949.

SILVA, M. F.; CARREIRA, L. M. M.; TAVARES, A. S.; RIBEIRO, I. C.; JARDIM, M. A. G.; LOBO, M. G. A.; OLIVEIRA, J. Leguminosas na Amazônia Brasileira: lista prévia. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 39., 1988, Belém. **Anais...** Belém: SBB, 1989. p. 193-237.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; MATHESON, B. G.; NOWAK, J. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 25, n. 3, p. 13-19, Oct. 1997.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, Aug. 2007.

THEUNIS, M.; KOBAYASHI, H.; BROUGHTON, W. J.; PRINSEN, E. Flavonoids, NodD1, NodD2 and nod-box NB15 modulate expression of the *y4wEFG* locus that is required for indole-3-acetic acid synthesis in *Rhizobium* sp. strain NGR234. **Molecular Plant-Microbes Interactions**, Saint Paulo, v. 17, n. 10, p.1153-1161, 2004.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. (International Biological Programme Handbook, 15).

ZAKHAROVA, E.; SHCHERBAKOV, A. A.; BRUDNIK, V. V.; SKRIPKO, N. G.; BULKHIN, N. S.; IGNATOV, V. V. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. Insights from quantum chemistry. **European Journal Biochemistry**, Zurich, v. 259, n. 3, p. 572-576, Feb. 1999.

ANEXO

ANEXO A		Página
TABELA 1A	Caracterização morfológica dos grupos culturais.....	79

TABELA 1A Caracterização cultural de representantes de 105 grupos culturais obtidos de diferentes leguminosas e sistemas de uso da terra, na região do Alto Solimões, AM.

GC	NI	Representante	T	D	pH	F	E	B	S	M	C.	D.O	Cor	A. I.
1	22	Pp31-03A	R	1	AC	I	C	I	L	P	A	B	C	N
2	3	IE64-02D	R	4	AC	C	C	I	L	A	G	O	C	N
3	1	DI21-03B	R	3	AC	C	L	I	L	M	G	TL	C	N
4	6	Pp31-01A	R	1	AC	I	C	I	L	P	A	B	C	N
5	2	IE18-01A	R	<1	AC	P	L	I	L	E	G	O	A	S
6	1	DI21-02C	R	<1	N	P	P	I	L	E	G	O	A	N
7	1	DI21-01B	R	2	AC	C	L	I	L	P	A	TL	C	N
8	2	IC22-03A	R	1	AC	I	L	O	R	E	S	O	C	N
9	1	MP28-01A	R	1	N	C	P	I	L	P	G	O	C	S
10	5	AM22-01C	R	<1	AC	P	P	I	L	E	G	B	R	N
11	6	IC22-02B	R	2	AC	C	P	I	L	P	G	TL	C	S
12	4	Pp32-02A	R	<1	AC	P	P	I	L	P	G	O	A	N
13	1	Pt31-02C	R	2	A	I	L	I	L	A	G	TL	C	S
14	2	IC79-01B	R	3	AC	C	C	I	L	A	E	TL	C	N
15	7	DA59-03A	R	2	AC	C	L	I	L	P	A	TL	C	S
16	5	IE19-01A	R	1	AC	C	L	I	L	E	S	O	A	N
17	5	CM65-02A	R	<1	N	P	N	I	L	E	G	O	C	S
18	24	CM50-01A	R	1	AC	I	P	I	L	M	A	TL	C	S
19	6	IH54-03A	R	2	AC	C	L	I	L	E	G	O	C	N
20	24	AM71-01A	R	1	N	C	P	I	L	E	G	O	B	S
21	9	IC79-03D	R	1	N	I	L	I	L	M	G	TL	C	N
22	10	IH54-02A	R	<1	AC	P	P	I	L	P	G	O	A	N
23	4	IC76-03A	R	<1	AC	P	L	I	L	E	S	O	C	N
24	16	Pt71A-03A	R	3	AC	C	L	I	L	M	G	B	A	N
25	6	IV71A-03A	R	2	AC	C	C	I	L	M	E	B	A	S
26	1	CM50-03A	R	3	AC	C	C	I	L	P	G	TL	C	S
27	1	IV24A-03C	R	<1	AC	P	P	I	L	E	G	O	C	N
28	3	CM70A-01A	R	1	AC	C	L	I	L	P	G	O	A	N
29	8	IV24A-01C	R	2	AC	C	C	I	L	P	E	B	A	N
30	2	Pp29-01A	R	1	AC	C	L	I	L	M	G	O	C	N

...Continua...

“TABELA 1A, Cont.”

31	3	Pp29-03C	R	1	AC	C	P	O	L	M	G	B	C	N
32	1	Pp29-01D	R	2	AC	C	L	I	L	M	G	TL	C	N
33	1	CM70A-01B	R	1	AC	C	L	I	L	P	G	O	A	N
34	1	IV24A-03D	R	1	AC	C	C	I	L	A	G	O	C	N
35	1	IV24A-03A	R	1	N	C	L	I	L	P	G	O	A	N
36	1	Pp29-03A	R	2	AC	C	C	I	L	A	G	TL	C	S
37	1	IC70A-03A	R	2	AC	C	C	I	L	A	G	TL	C	S
38	1	IE29-01B	R	2	AC	C	C	I	L	A	G	O	C	S
39	1	Pp29-01C	R	4	AC	C	C	I	L	A	E	TL	C	S
40	2	AM68-02C	R	1	N	C	L	I	L	P	G	O	A	S
41	2	MF68-01A	R	1	N	C	P	I	L	P	G	O	C	N
42	4	IE17-02D	R	1	N	C	P	I	L	P	G	O	B	N
43	5	DA17-03B	R	<1	N	P	P	I	L	E	G	O	A	N
44	1	Pt66-03A	R	1	AC	C	P	I	L	E	V	O	A	S
45	1	MF68-03A	R	1	N	C	P	I	L	P	G	O	C	S
46	1	CM68A-01F	R	2	AC	C	L	I	L	P	G	O	A	S
47	39	CM68A-01G	R	3	AC	C	L	I	L	P	G	O	A	S
48	10	MQ66-02B	R	4	AC	C	C	I	L	A	A	TL	C	S
49	4	CM83-03A	R	<1	AL	P	P	I	L	E	G	O	C	N
50	4	DA92-02A	R	<1	N	P	P	I	L	P	G	O	C	N
51	6	CM83-02C	R	<1	AL	P	P	I	L	M	G	O	A	N
52	2	CM83-01A	R	<1	N	P	P	I	L	E	S	O	A	N
53	1	CM60-01A	R	<1	AC	P	P	I	L	M	G	O	C	N
54	1	Pp29-03B	R	<1	AC	P	P	I	L	A	G	B	C	N
55	1	Pt32-02C	R	<1	AC	P	P	I	L	P	E	B	C	N
56	2	IC68-03B	R	<1	AC	P	P	I	L	E	G	O	C	S
57	1	Pp29-01B	R	3	AC	C	L	I	L	E	G	O	C	N
58	1	IC68A-02B	R	2	AC	C	P	I	L	E	S	O	C	N
59	1	CM83-02A	R	<1	AC	P	P	I	L	E	S	O	B	N
60	2	CM83-01B	R	<1	AL	P	L	I	L	E	G	TL	C	N
61	1	CM83-02B	R	1	AL	C	P	I	L	E	G	O	A	N
62	5	IV71A-01A	R	1	AC	C	P	I	L	A	G	O	A	N
63	3	PS71-01B	R	2	AC	C	C	I	L	P	G	B	A	N
64	4	CM68A-03C	R	1	AC	C	C	I	L	P	G	O	A	S

...Continua...

“TABELA 1 A, Cont.”

65	1	Pt71A-01C	R	1	N	C	P	I	L	P	G	O	A	S
66	7	IC22-02A	R	1	AC	C	P	I	L	E	G	O	A	S
67	1	AM68-03B	R	3	AC	C	P	I	L	M	G	B	A	S
68	4	IC76-01A	R	2	AC	C	C	I	L	M	G	O	A	S
69	2	AM68-03A	R	4	AC	C	C	I	L	M	G	B	A	N
70	1	IV81A-03B	R	2	AC	C	P	I	L	M	G	O	A	N
71	1	DA92-03A	R	1	AC	C	C	I	L	M	E	B	A	N
72	2	E66-03B	R	2	AC	C	C	I	L	M	E	B	A	N
73	3	MQ66-03B	R	2	AC	C	C	I	L	A	A	O	A	N
74	1	PS71-01C	R	2	AC	C	C	I	L	E	V	B	A	N
75	5	IC70A-02A	R	2	AC	C	C	I	L	P	G	O	C	N
76	5	CM70A-03A	R	1	AC	I	P	I	L	P	S	O	C	N
77	25	IC68A-01A	R	3	AC	C	C	I	L	P	G	O	C	N
78	1	Pt66-02C	R	3	AC	C	L	I	L	P	A	TL	C	N
79	4	IU23-01A	R	3	AC	C	C	I	L	P	V	B	C	N
80	1	Pt66-01B	R	3	AC	I	P	I	L	E	V	O	C	N
81	7	IV59-02A	R	<1	AL	P	P	I	L	P	S	O	C	N
82	1	Pt32-01B	R	<1	AC	P	P	I	L	P	S	O	C	N
83	2	IE32-02A	R	2	AC	C	C	I	L	A	G	TL	C	N
84	3	IC79-02A	R	3	N	C	L	I	L	A	G	TL	C	N
85	1	IE64-02C	R	4	AC	C	C	I	L	P	G	TL	C	N
86	4	IC68A-01B	R	3	AC	I	C	I	L	M	G	O	C	N
87	2	IC22-01A	R	2	AC	C	C	I	L	M	A	O	C	N
88	1	DI21-03A	R	3	AC	C	C	I	L	A	A	TL	C	S
89	1	CM80-01B	R	1	AC	C	C	I	L	A	A	O	C	N
90	4	CM80-03A	R	3	AC	C	C	I	L	A	A	TL	C	N
91	2	IU23-01B	R	1	AL	P	P	I	L	E	G	O	C	N
92	10	CM18-01A	R	<1	N	P	P	I	L	P	G	O	B	N
93	7	E66-01C	R	1	AC	C	P	I	L	P	E	B	C	N
94	2	IE21-01B	R	<1	AC	P	P	I	L	P	G	O	R	N
95	1	DA54-02A	R	3	N	C	L	I	L	P	G	O	A	N
96	5	Pp21-02C	R	<1	AC	P	P	I	L	P	G	O	A	N
97	3	IV81-02A	R	2	N	C	P	I	L	M	G	O	C	N
98	1	CM70A-03B	R	2	AC	C	L	I	L	A	G	O	C	S

...Continua...

“TABELA 1 A, Cont.”

99	1	AM68-02A	R	1	N	C	L	I	L	P	G	O	C	S
100	4	Pt71A-01B	R	2	N	C	L	I	L	P	G	O	C	S
101	1	IE69-02A	R	2	AC	C	L	I	L	E	G	B	C	S
102	2	Pt66-03B	R	1	N	C	C	I	L	E	G	O	A	S
103	4	CM68A-03D	R	1	AC	C	L	I	L	E	G	O	C	S
104	1	IE59-03A	R	1	AC	I	L	I	L	E	S	O	C	S
105	3	DA92-01A	R	1	N	I	P	I	L	P	G	O	C	N

Significado das letras e números utilizados na identificação dos isolados: AM: *Acacia multipinnata*; CM: *Calopogonium mucunoides*; DA: *Desmodium adscendens*; DI: *Dalbergia inundata*; E: *Entada* sp.; IC: *Inga caynnensis*; IE: *Inga edulis*; IH: *Inga heterophylla*; IU: *Inga umbellifera*; IV: *Inga venusta*; MF: *Machaerium floribundum*; MP: *Mimosa pudica*; MQ: *Mimosa quadrivalvis*; Pp: *Pueraria phaseoloides*; PS: *Piptadenia suaveolens*; Pt: *Pitryocarpa pteroclada*. O primeiro número refere-se ao ponto de coleta e o segundo número refere-se ao nódulo utilizado para o isolamento. As letras A, B, C, D, E, F, G, H referem-se ao