

**DENSIDADE, EFICIÊNCIA E DIVERSIDADE DE
BACTÉRIAS FIXADORAS DE N₂ QUE NODULAM O
SIRATRO (*Macroptilium atropurpureum*) DE SOLOS SOB
DIFERENTES USOS NA AMAZÔNIA OCIDENTAL**

ADRIANA SILVA LIMA

2007

ADRIANA SILVA LIMA

**DENSIDADE, EFICIÊNCIA E DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS
FIXADORAS DE N₂ QUE NODULAM O SIRATRO (*Macropitium
atropurpureum*) DE SOLOS SOB DIFERENTES USOS NA AMAZÔNIA
OCIDENTAL**

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

Orientadora

Profª. Dra. Fátima Maria de Souza Moreira

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

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

Lima, Adriana Silva

Densidade, eficiência e diversidade de bactérias fixadoras de N₂ que nodulam o siratro (*Macroptilium atropurpureum*) de solos sob diferentes usos na Amazônia Ocidental / Adriana Silva Lima. -- Lavras : UFLA, 2007.
167 p. : il.

Orientador: Fátima Maria de Souza Moreira
Tese (Doutorado) – UFLA.
Bibliografia.

1. Microbiologia do solo. 2. Rizobio. 3. Estatística multivariada. 4. Sequenciamento 16SrDNA. 5. Fixação biológica de nitrogênio. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-589.90133
-631.46

ADRIANA SILVA LIMA

**DENSIDADE, EFICIÊNCIA E DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS
FIXADORAS DE N₂ QUE NODULAM O SIRATRO (*Macropitium
atropurpureum*) DE SOLOS SOB DIFERENTES USOS NA AMAZÔNIA
OCIDENTAL**

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

APROVADA em 2007

Prof. Dr. José Oswaldo Siqueira	UFLA
Prof. Dr. Daniel Furtado Ferreira	UFLA
Profa. Dra. Mercedes Bustamante	UNB
Prof. Dr. Júlio Neil Cassa Louzada	UFLA

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

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

Aos meus pais, Maria Adélia e Emmanoel, e irmãos, Luciano e Luiz Fernando, pelo incentivo e amor a mim dedicado e por tudo que fizeram para que eu pudesse concluir mais esta etapa da vida.

OFEREÇO

A Deus por tudo.
Ao meu avô, Tancredo, pelo exemplo de vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

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

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Fátima Maria de Souza Moreira pela valiosa oportunidade de iniciação em Microbiologia do Solo em 1998, por acreditar no meu trabalho, pela grande amizade, apoio e confiança durante todos estes anos.

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

A toda a equipe envolvida na fase de coleta das amostras de solo e às comunidades Nova Aliança e Guanabara II pelo apoio, empenho e espírito de equipe, tão importantes para o êxito dos trabalhos de campo.

Ao professor José Oswaldo Siqueira pelo apoio e atenção dispensada em todos os momentos.

A todos os professores do Departamento de Ciência do Solo por seus ensinamentos, auxílios, apoio e disponibilidade para discussões e esclarecimentos de dúvidas.

Em especial ao Prof. Alfredo Scheid Lopes por ser um exemplo de dedicação à vida acadêmica, por seus ensinamentos e pela honra de tê-lo como amigo.

A todos os funcionários Departamento de Ciência do Solo por seu auxílio, apoio, disponibilidade e ajuda.

Aos funcionários Marlene Aparecida de Souza e Manuel Aparecido da Silva pela valiosa contribuição na execução das análises, além da infinita amizade construída durante todos estes anos de trabalho em equipe.

Ao professor Daniel Furtado Ferreira pela disponibilidade e contribuição na realização das análises estatísticas.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. José Oswaldo Siqueira, Prof. Dr. Daniel Furtado Ferreira, Prof. Dr. Júlio Neil Cassa Louzada, Profa. Dra. Mercedes Bustamante e Prof. Dr. Romildo da Silva, pela participação, colaboração e sugestões apresentadas.

Aos preciosos amigos do Laboratório de Microbiologia do Solo, que sempre estiveram dispostos a discutir dúvidas e pontos de vista, além da grande ajuda e auxílio nos momentos mais difíceis: Alexandre, Alice, Amanda, André, Cláudio, Éderson, Gláucia, José Geraldo, João Paulo, Krisle, Ligiane, Manoel, Márcia, Marlene, Meire, Michele Aparecida, Michele Rocha, Paulo, Pedro, Plínio, Rafaela, Rogério e Silvana.

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

A todos, muito obrigada!!!

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	i
GENERAL ABSTRACT.....	ii
CAPÍTULO 1	1
1.1 INTRODUÇÃO GERAL.....	2
1.2 REFERENCIAL TEÓRICO	4
1.2.1 Amazônia potencial para estudos de Diversidade	4
1.2.2 Importância da Fixação Biológica de Nitrogênio.....	5
1.2.3 Diversidade genética microbiana	7
1.2.4 Análise de taxonomia e filogenia	11
1.2.5 Avaliação da diversidade de BNL.....	13
1.2.6 Fatores que afetam a simbiose BNL - leguminosas.....	16
1.2.7 O siratro	19
1.2.8 Análises multivariadas.....	21
1.2.9 Análise de Correlação Canônica	21
1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
CAPÍTULO 2	41
RESUMO	42
ABSTRACT	43
2.1 INTRODUÇÃO	44
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	45
2.2.1 Caracterização.....	45
2.2.2 Amostragem e análise química e física do solo	47
2.2.3 Captura de BNL através de planta isca e determinação da densidade populacional de BNL	50
2.2.4 Avaliação da eficiência das populações de BNL	51
2.2.5 Análise dos Dados.....	52
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
2.3.1 Densidade populacional de BNL.....	53
2.3.2 Eficiência das populações de BNL na promoção do crescimento de plantas de siratro.....	58
2.3.3 Análise Multivariada dos Dados	61
2.4 CONCLUSÕES	73
2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
CAPÍTULO 3	79
RESUMO	80
ABSTRACT	81
3.1 INTRODUÇÃO	82
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	84
3.2.1 Amostragem do solo, captura e isolamento de bactérias que nodulam leguminosas através de planta isca.....	84

3.2.2. Análise dos dados.....	86
3.2.3 Amplificação e sequenciamento do gene 16S do DNA ribossomal.....	87
3.2.4 Pesquisa por similaridade.....	88
3.2.5 Alinhamento das seqüências e análise filogenética.....	89
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	90
3.3.1 Isolamento e caracterização cultural de Bactérias que Nodulam Leguminosas.....	90
3.3.2 Agrupamento e diversidade dos isolados de BNL.....	93
3.3.3 Ajustes de modelos de abundância de tipos culturais às populações de BNL.....	98
3.3.4. Amplificação e sequenciamento do gene 16S do DNA ribossomal.....	100
3.3.5 Análise filogenética.....	104
3.4 CONCLUSÕES.....	108
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
CAPÍTULO 4.....	117
RESMO.....	118
ABSTRACT.....	119
4.1 INTRODUÇÃO.....	120
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	122
4.2.1 Amostragem, captura através de planta isca e isolamento de Bactérias que Nodulam Leguminosas (BNL).....	122
4.2.2 Autenticação e eficiência de isolados de BNL por meio da inoculação no hospedeiro de origem.....	123
4.2.3 Análise dos Dados.....	127
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	127
4.3.1 Autenticação e eficiência simbiótica de isolados de BNL por meio da inoculação no hospedeiro de origem.....	127
4.4 CONCLUSÕES.....	137
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	138
ANEXOS.....	142

RESUMO GERAL

LIMA, A.S. **Densidade, Eficiência e Diversidade de Bactérias Fixadoras de N₂ que Nodulam o Siratro (*Macropitium atropurpureum*) de Solos sob Diferentes Usos Na Amazônia Ocidental.** 2006. 167 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, MG.¹

Com o objetivo de avaliar a densidade, eficiência e diversidade de bactérias que nodulam leguminosas (BNL) em solos submetidos aos sistemas de uso da terra (SUTs) pastagem (P), agricultura (AG), agrofloresta (A), floresta secundária em estágio inicial de regeneração (FI), floresta secundária em estágio avançado de regeneração (FA) e floresta primária (FP), localizados na região do Alto Rio Solimões, AM, coletaram-se amostras de solo na profundidade de 0-20 cm em março de 2004, durante o período de maior intensidade pluviométrica. Experimentos sucessivos, sob condições axênicas, em casa-de-vegetação e laboratório, foram conduzidos utilizando a espécie promíscua siratro como armadilha para capturar BNL das amostras de solo. Populações de BNL estão presentes em todos os solos sob sistemas de uso estudados; embora as populações não tenham sido muito eficientes em promover o crescimento do siratro, apresentam-se como potenciais para isolamento de estirpes eficientes e competitivas. Os sistemas de uso da terra alteraram a diversidade cultural da população de bactérias que nodulam siratro. Os sistemas de uso da terra que tiveram maior riqueza cultural observada e estimada, de BNL isoladas de siratro, foram, na seguinte ordem: agrofloresta > pastagem > floresta secundária em estágio inicial de regeneração > floresta secundária em estágio avançado de regeneração > agricultura > floresta primária. Pôde-se observar uma grande diversidade baseada nas análises fenotípicas pelas características culturais e dos sequenciamento do 16S rDNA, inclusive entre os isolados dos sistemas de uso manejados. Essa diversidade indica a resiliência das bactérias às modificações implementadas pelos diferentes sistemas de uso da terra.

¹Orientadora: Fátima Maria de Souza Moreira - UFLA

GENERAL ABSTRACT

Density, efficiency and diversity of nitrogen-fixing bacteria nodulating siratro (*Macroptilium atropurpureum*) from soils under different uses in Western Amazon region. 2006. Chap. 1, 167p. Thesis (Doctorate in Soil Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.¹

Aiming to evaluate density, efficiency and diversity of bacteria nodulating leguminous (BNL) in soils under the following land use systems (LUSs): pasture (P), agriculture (AG), agroforestry (A), young secondary forest (FI), old secondary forest (FA) and pristine forest (FP) situated in Upper Solimões river, AM, soil samples were collected in 0-20 cm depth in March, 2004, during the highest rainfall period. Greenhouse and laboratory experiments were carried out under axenic conditions by using the promiscuous species siratro to trap BNL from soils. BNL populations were present in all LUSs. Although they were not efficient in promoting plant growth, they had populations from which efficient and competitive strains were isolated. BNL were highly heterogeneous in relation to their efficiency to promote siratro growth. Soil attributes, except B, presented low correlation with occurrence and efficiency of BNL, which were more correlated to LUSs. LUSs with highest observed and estimated diversity were in the following order: agroforestry > pasture > young secondary forest > old secondary forest > agriculture > pristine forest. A high diversity were observed both by cultural characteristics and 16S rDNA sequences, among isolates, including those from managed LUSs. This diversity is due to resilience of bacteria even with soil changes occurring under the LUSs after removal of pristine forest.

¹Guidance Committee: Fátima Maria de Souza Moreira - UFLA

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

A Amazônia ocupa cerca de quatro milhões de quilômetros quadrados da superfície terrestre. É uma região rica em biodiversidade e dotada de valiosos recursos minerais e florestais (Almeida & Uhl, 1998). É com frequência lembrada como uma floresta exuberante e com grande diversidade de vegetais e animais. Existem, na região, diferentes tipos de vegetação, e essa heterogeneidade também é constatada na geologia (Rodrigues, 1996), no clima e nos solos (Moreira et al., 2006; RADAMBRASIL, 1977).

Amazônica possui uma grande diversidade de ecossistemas abrangendo 59% do território brasileiro. Se considerarmos que ainda possui locais sem intervenção antrópica, esta pode ser bastante explorada por estudos de biodiversidade, e principalmente estudos de diversidade de bactérias que nodulam leguminosas (BNL) na Amazônia (Jesus et al., 2005; Lima et al., 2005; Moreira et al., 1993; Nóbrega, 2006; Pereira, 2000). Espera-se encontrar, nestes solos, uma grande diversidade de BNL e, entre estas, obter isolados que apresentem potencial para estudos posteriores objetivando a produção de inoculantes para leguminosas de interesse agrônômico (Lacerda et al., 2004; Moreira et al., 1998; Pereira, 2000).

Para pesquisas em que o objetivo é o levantamento da diversidade de BNL, a planta isca é uma variável importante a ser considerada, pois o que limita a simbiose BNL-leguminosas são os fatores edáficos, climáticos, a população nativa e, principalmente, as características intrínsecas da espécie hospedeira que influencia na captura dos simbiosites, favorecendo ou desfavorecendo a nodulação de determinados gêneros de BNL. A simbiose BNL-leguminosas iscas deve ser promíscua, ou seja, capaz de estabelecer simbiose com vários parceiros. Feijão comum, caupi, leucena, acácia e siratro são exemplo de leguminosas que são utilizadas como planta isca pois podem

nodular com várias espécies de mais de um gênero de BNL (Moreira & Siqueira, 2006).

O siratro (*Macroptilium atropurpureum*) como resultado da interação com bactérias que nodulam leguminosas (BNL) forma nódulos e fixa nitrogênio a uma taxa de fixação biológica de N₂ que varia de 70 a 181 (kg/ha/ano) (Moreira & Siqueira, 2006). É considerada uma leguminosa promíscua, pois nodula com bactérias de vários gêneros, como *Bradyrhizobium* (Jordan, 1984), *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (Bromfield & Barran, 1990; Trinick et al., 1991), *Azorhizobium doebereinae* (syn. *A. johannae*) (Moreira et al., 2006) (Gonçalves & Moreira, 2004), *Mesorhizobium loti* (Jordan et al., 1984) e *Burkholderia sp.* (Moulin et al., 2001). É de fácil manuseio e, assim, pode ser utilizada com sucesso em estudos que objetivem a captura destas.

Este trabalho faz parte do projeto “*Conservation and Sustainable Management of Below-Ground Biodiversity*”, financiado pelo GEF e implementado pelo “*United Nations Environment Programme (UNEP)*”, que está sendo executado em sete países, Brasil, Costa do Marfim, Índia, Indonésia, Kênia, México e Uganda, cujo objetivo é despertar a consciência e a compreensão sobre a biodiversidade do solo, importante para a produção agrícola sustentada em áreas tropicais, através da demonstração de métodos para a conservação e manejo sustentado (Projeto GF/2715-02). Neste contexto, os objetivos específicos deste trabalho foram:

1. Verificar a densidade e eficiência de populações de BNL, capturadas por siratro (*Macroptilium atropurpureum*), como planta isca, em diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia.

2. Avaliar a diversidade fenotípica de bactérias que fixam nitrogênio em simbiose com siratro (*Macroptilium atropurpureum*) em solo sob diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia.

3. Avaliar a eficiência simbiótica e a diversidade genotípica de bactérias que fixam nitrogênio em simbiose com siratro (*Macropodium atropurpureum*) em solo sob diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia.

1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

1.2.1 Amazônia potencial para estudos de Diversidade

Um hectare de floresta Amazônica pode conter 100 a 300 espécies diferentes de árvores, dependendo do sítio e do diâmetro mínimo de caule escolhido como limite interior para a amostragem (CIMA, 1991). Esta diversidade vegetal se traduz em uma grande diversidade animal, principalmente insetos (Erwin, 1997), devido ao grande número de nichos existentes. Também é de se esperar que a diversidade de organismos do solo também seja afetada por esta alta diversidade vegetal.

Tradicionalmente, a ocupação da Amazônia tem conduzido a um aumento do desmatamento nessa região. Embora não se possa atribuir a um único fator as causas do desmatamento, por ser este um fenômeno de natureza bastante complexa, três principais formas de desmatamento para a Amazônia podem ser: a conversão da floresta para pastagem; o corte e a queima da floresta para culturas anuais e a implementação de cultivos de grãos. Na Amazônia, a principal causa do desflorestamento é a pecuária extensiva de baixa produtividade, seguida pelo cultivo de grãos, impulsionada pela demanda do mercado externo e pelos investimentos em infra-estrutura de transporte (Alencar et al., 2004; Margulis, 2003)

As decisões sobre o uso da terra são afetados por uma série de circunstâncias. O sistema de uso da terra em determinado local e tempo e sua vinculação como forma de cobertura do solo constituem o resultado de um conjunto de fatores interagindo em um processo evolucionário (Walker et al., 1998).

A intensificação das atividades agrícolas pode levar a alterações nas funções do ecossistema, diminuição da diversidade de vegetais e de animais, e menor disponibilidade de recursos, o que acarreta uma diminuição de organismos do solo, principalmente dos microrganismos, pode levar a uma perda de importantes serviços para um bom funcionamento do ecossistema e afetará sua produtividade (Giller et al., 1997) e sustentabilidade. A capacidade do ecossistema de resistir e de se recuperar de perturbações será diminuída em consequência dessas mudanças (Swift & Anderson, 1994). Em ambientes impactados, as mudanças na biodiversidade da sub-superfície são semelhantes àquelas ocorridas com as plantas, embora haja evidências de que a comunidade do solo pode ser mais resistente funcionalmente do que a da biota superficial (Giller et al., 1997).

1.2.2 Importância da Fixação Biológica de Nitrogênio

A fixação biológica de N_2 é mediada por uma parcela dos procariotos que, apesar de relativamente pequena, apresenta alta diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética. Diazotróficos podem ser encontrados entre os aeróbios, anaeróbios e anaeróbios facultativos e na maioria dos grupos filogenéticos representativos de Bactéria e de Archae. Nas Proteobacterias encontram-se, por exemplo: *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Derxia* e *Azotobacter*. Entre as Archae, fixadores estão presentes entre os halófilos e os metanogênicos. Entre os metilotróficos, celulolíticos e bactérias envolvidas no ciclo do enxofre e até denitrificadores, que mediam justamente o processo inverso, também se encontram fixadores de N_2 . A alta diversidade destes organismos garante não só a resiliência do importante processo que mediam em um determinado ecossistema, como também a ocorrência deste nos mais diferentes tipos de habitat terrestres (Moreira & Siqueira, 2006).

O conhecimento sobre diversidade de bactérias que nodulam leguminosas é ainda limitado devido à falta de conhecimentos sobre os microsimbiontes e a grande maioria das espécies leguminosas. Estima-se que a família Leguminosae possui um total de aproximadamente 20.000 espécies e 700 gêneros (Lewis et al., 2003).

Se for considerada a ocorrência das famílias botânicas presentes na Amazônia, a família *Leguminosae* é a mais rica em espécies e se encontra entre as cinco maiores em densidade de indivíduos, segundo dados compilados por Moreira et al. (1992). Moreira (1995), em um trabalho com 172 espécies de leguminosas nativas da Amazônia, verificou que 85% das espécies estudadas nodularam quando cultivadas em solo de várzea, sendo que, para 98 espécies, foram obtidos os primeiros registros de nodulação. Gehring et al. (2005) identificaram 157 espécies de leguminosas numa região situada a 100 Km de Manaus, sendo que 78% destas tinham potencial para nodulação. A grande diversidade de espécies de leguminosas na Amazônia pode, provavelmente, refletir-se em uma ampla diversidade de bactérias que nodulam leguminosas.

A capacidade das espécies de formar relações simbióticas efetivas com rizóbio é desconhecida em cerca de 77% das espécies (11200 espécies) desta família; conseqüentemente, as características das espécies de rizóbio também são pouco conhecidas. Além disso, a maioria das espécies descritas ainda é baseada em isolados de espécies herbáceas, principalmente leguminosas produtoras de grãos como *Phaseolus vulgaris* e *Glycine max* (Moreira et al., 1999).

Entretanto, nas últimas décadas, vários estudos revelaram uma grande diversidade de rizóbio tropical de espécies florestais até então desconhecida, incluindo no gênero *Bradyrhizobium* (Dupuy et al., 1994; Moreira et al., 1993).

Até pouco tempo atrás, as espécies de rizóbio conhecidas eram todas oriundas de regiões temperadas. Posteriormente, várias espécies novas foram

descobertas com o estudo de isolados de regiões tropicais (Chen et al., 1997; De Lajudie et al., 1998; De Lajudie et al., 1994; Dreyfus et al., 1988). Atualmente sabe-se que outras bactérias pertencentes a outros gêneros, como *Burkholderia* (Moulin et al., 2001), *Methylobacterium* (Sy et al., 2001), *Bastobacter* (van Berkun & Eardly, 2002), *Devosia* (Rivas et al., 2002), *Ralstonia* (Chen et al., 2001) e *Ochrobactrum* (Trujillo et al., 2005), também podem formar nódulos com leguminosas (Chen et al., 2002; Moulin et al., 2002; van Berkun & Eardly, 2002), sendo todos estes encontrados dentre estirpes isoladas de regiões tropicais. Assim, os solos tropicais representam hábitat com imensa biodiversidade a ser conhecida e explorada.

1.2.3 Diversidade genética microbiana

Os microrganismos apresentam imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos (Myers, 1996). E a diversidade microbiana do solo é considerada um fator importante na sustentabilidade de ecossistemas. Por sua dinâmica, e por estarem continuamente mudando e se adaptando às alterações ambientais, representam indicadores sensíveis das mudanças no solo, oriundas de alterações antrópicas, e também no tipo de cobertura vegetal (Ballard et al., 2004; Gastine et al., 2003; Kaschuk et al., 2006; Kennedy, 1999).

Apesar de sua grande importância, o número de grupos microbianos conhecidos e descritos (diversidade de espécies) representa apenas pequena fração da diversidade microbiana encontrada na natureza (Azevedo, 1998b; Pace, 1997). Dados derivados de estudos comparativos apontam para o fato de que apenas uma pequena fração dos microrganismos na natureza (entre < 0,1% a 1% dependendo do hábitat) é cultivada através de métodos microbiológicos convencionais (Amann et al., 1995).

Um grande número de fatores pode ser apontado para a dificuldade no cultivo de microrganismos em condições de laboratório, incluindo o pouco conhecimento sobre seus requisitos nutricionais e a biologia de organismos presentes em diferentes amostras ambientais.

A evolução das metodologias de biologia moleculares aplicadas ao estudo do meio ambiente tem contribuído significativamente para o avanço do conhecimento sobre a diversidade microbiana. Resultados de estudos independentes de isolamento e cultivo, baseados em amplificação e sequenciamento de fragmentos do gene de rRNA 16S (rDNA 16S), demonstram que a diversidade de microrganismos em amostras ambientais é vasta (Head et al, 1998; Hunter-Cevera, 1998). A aplicação destas metodologias no estudo da diversidade de bactérias tem permitido a descoberta de um número extenso de novas linhas evolutivas neste grupo. Métodos independentes de cultivo tendem a completar os métodos baseados em isolamento e cultivo para a realização de levantamentos e comparações da composição, diversidade e estrutura de comunidades microbianas (Hugenholtz & Pace, 1996; Hugenholtz et al., 1998; Ranjard et al., 2000).

São vários os benefícios científicos esperados a partir de um melhor conhecimento sobre a diversidade microbiana (Colwell, 1997; Hunter-Cevera, 1998), entre eles a compreensão das funções exercidas pelas comunidades microbianas nos ambientes terrestres e o conhecimento de suas interações com outros componentes da biodiversidade, como, por exemplo, as plantas. Neste aspecto, vários estudos têm explorado a diversidade de bactérias associadas às plantas, obtendo-se novas informações para o conhecimento de mecanismos envolvidos na interação bactéria-planta (Araújo et al., 2001; Araújo et al., 2002; Garbeva et al., 2001; Mariley & Aragno, 1999; Sessitsch et al., 2002).

A aplicação de técnicas baseadas em ácidos nucleicos tem auxiliado muitos estudos de diversidade microbiana. Dentre as técnicas mais utilizadas

destacam-se: mapas de restrição; hibridização DNA-DNA ou DNA-RNA; seqüências de subunidades do rRNA; RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*); ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*); RISA (*Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*); DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) (Muyzer & Smalla, 1998; Ranjard et al., 2000; Van Elsas et al., 1998). Embora exista um grande número de técnicas que revelam o polimorfismo de DNA, é importante considerar o tipo de organismo em estudo.

A técnica de RAPD utiliza iniciadores ou *primers* curtos e aleatórios que se anelam a diferentes locais no DNA genômico, gerado por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) produtos de diferentes tamanhos (Welsh & McClelland, 1990; Williams et al., 1990), sendo extremamente úteis para estudos de filogenia e caracterização de indivíduos, estudos da comunidade microbiana de ambientes aquáticos, bactérias endofíticas, relações filogenéticas entre as espécies, rizóbios e agrobactérias (Araújo et al., 2001; Franklin et al., 1999; Louws et al., 1999; Weisburg et al., 1991; Woese, 1987). Oliveira et al (2000) estudaram a diversidade genética de *Rhizobium* sp. associado a leguminosas, e Gonçalves & Rosato (2000), de *Xanthomonas* sp. associada a maracujá, de diferentes locais. Esses autores observaram que as linhagens foram agrupadas preferencialmente de acordo com o local de origem. Araújo et al. (2001) utilizaram RAPD para avaliar a diversidade genética de *Pantoea agglomerans* e *Bacillus* spp. Endofíticos de diferentes espécies de citros, estes microrganismos formaram grupos independentes do hospedeiro. Com isso, observa-se que a técnica de RAPD pode ser utilizada para avaliar a diversidade genética de grupos microbianos e associá-los ao nicho ocupado.

Outra técnica aplicada ao estudo da diversidade microbiana é o ARDRA, que consiste na amplificação e posterior digestão do rDNA com enzimas de restrição. Este método é baseado no princípio de que os sítios de restrição no rDNA são conservados de acordo com padrões filogenéticos. Desta

forma, pode ser utilizado o 16S rDNA para o estudo de grupos heterogêneos, ou a região entre o 16S e o 23S rDNA para o estudo de grupos muito similares (Heyndrickx et al., 1996; Ranjard et al., 2000; Van Elsas et al., 1998). A metodologia de ARDRA tem sido aplicada para o estudo de diversidade microbiana associada a vegetais ou a diferentes solos (Chelius & Triplett, 2001; Ovreas & Torsvik, 1998), análise da diversidade genética de bactérias degradadoras de pesticidas (Desaint et al., 2000) e caracterização de bactérias diazotróficas (Cruz et al., 2001), entre outras.

Técnicas moleculares baseadas no gene do 16S rRNA têm sido utilizadas para a avaliação de comunidades microbianas não cultiváveis (Amann et al., 1995). Dentre estas técnicas, para o estudo de populações microbianas complexas, o DGGE identifica diferenças baseadas no comportamento desnaturante da dupla fita de DNA. Neste caso, o ambiente desnaturante é criado pela combinação uniforme da temperatura de corrida, variando entre 50°C e 65°C, e um gradiente desnaturante linear de uréia e formamida (Heuer & Smalla, 1997). O DGGE tem sido recebido especial atenção por ter sido utilizado com sucesso em diferentes habitats naturais (Brim et al., 1999; Fantroussi et al., 1999; Muyzer et al., 1993), poluição (Brim et al., 1999), estado nutricional e fisiológico da planta hospedeira (Henckel et al., 1999; Yang & Crowley, 2000), e também no estudo da comunidade microbiana associada a plantas transgênicas (Heuer & Smalla, 1999) e bactérias endofíticas (Araújo et al., 2002; Garbeva et al., 2001).

O sequenciamento de genes que codificam para subunidades do RNA ribossomal (16S, 23S e 5S) tem sido amplamente empregado para estudos de diversidade. Os RNAs ribossomais são considerados cronômetros moleculares, pois são moléculas universais com funções altamente específicas estabilizadas ao longo da evolução e não sofreram influência por mudanças no ambiente, sendo o gene 16S um dos mais utilizados para detectar as relações entre

bactérias (Woese, 1991). O gene 16S pode ser amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e o produto da reação pode ser clonado para o sequenciamento ou sequenciado diretamente (Weisburg et al., 1991). Por isso, esta técnica pode ser empregada com facilidade em estudos de diversidade e para a identificação de espécie.

Desta forma, tais técnicas se mostram eficientes na avaliação da diversidade e dos efeitos de alteração físico químicas do ambiente sobre a comunidade microbiana.

1.2.4 Análise de taxonomia e filogenia

A taxonomia é tida, modernamente, como sinônimo de sistemática e é tradicionalmente dividida em três partes, segundo Cowan (1968) e Staley & Krieg (1984): 1) Classificação: ordenação dos organismos em grupos taxonômicos com base na similaridade entre eles; 2) Nomenclatura: rotulagem das unidades definidas na classificação; e 3) Identificação dos organismos desconhecidos: determinação de quais organismos pertencem às unidades genômicas e ecológicas pré-existentes.

A espécie é a unidade básica da taxonomia bacteriana, definida como um grupo de estirpes, incluindo a estirpe tipo, que dividam 70% ou mais de hibridização DNA-DNA (Wayne et al., 1987). Uma espécie de bactéria é uma categoria que circunscreve um grupo de indivíduos (estirpes/isolados) coerentes genomicamente, que dividam um alto grau de similaridade em muitos aspectos independentes, testados comparativamente sob condições padronizadas (Stackebrandt et al., 2002). A homologia de DNA é atualmente a abordagem adotada como consenso para estabelecer limites entre espécies bacterianas (Stackebrandt & Goebel, 1994).

Análises de seqüências do gene que codifica para o 16S rDNA têm sido usadas para inferir relações filogenéticas entre espécies de rizóbios, sendo este o

critério mais utilizado para estimar relações filogenéticas entre bactérias: a homologia entre seqüências de 16S rDNA. Uma vantagem desta abordagem é que seqüências de DNA e produtos gênicos podem ser comparados em um contexto evolucionário (sistemática molecular) (van Berkun et al., 2000). Uma opinião estabelecida é a de que a evolução de alguns genes de bactérias processa-se numa taxa constante por mutação e seleção darwiniana e que a história evolutiva do gene de 16S rDNA aproxima-se da história evolutiva do genoma total, tornando-se, desta forma, aceitável reconstruir relações evolucionárias entre bactérias a partir da divergência das seqüências entre seus genes de 16S rDNA (van Berkun et al., 2000).

Segundo Coenye et al. (2005), os métodos genotípicos clássicos usados na taxonomia bacteriana, como conteúdo G+C, hibridização DNA-DNA e seqüenciamento 16S rDNA, não são significativamente influenciados por forças que moldam o genoma dos procariotos. Entre estas forças estão os rearranjos cromossômicos, aquisição de genes (transferência horizontal de genes) e deleções, que levam a uma grande diversidade na organização e no conteúdo genômico. Para avaliar a possibilidade de que genes de 16S rDNA em algumas estirpes de rizóbios pudessem ser produto de transferência lateral de genes e eventos de recombinação, Van Berkun et al. (2000) compararam filogenias de 16S rDNA e 23S rDNA para o mesmo conjunto de estirpes de rizóbios, obtendo topologias de árvores semelhantes.

A conservação da ordem gênica também pode ser usada para inferir relações entre dois organismos. Este tipo de estratégia pode ser utilizada para resolver a filogenia de espécies mais próximas, porém a resolução é baixa para grupos filogeneticamente mais distantes (Coenye et al., 2005). A ordem gênica sofre uma rápida evolução, o que limita o uso desta técnica, sendo apenas complementar aos estudos de seqüência de proteínas e análise de estruturas (Wolf et al., 2001). Recentemente, técnicas que avaliam a filogenia de um grupo

com base nas informações da seqüência do genoma inteiro ou um grande número de seqüências de genes foram desenvolvidas. Também conhecida como filogenômica, Henz et al. (2004) desenvolveram uma abordagem chamada *Genome Blast Distance Phylogeny* (GBDP), que consiste na comparação par-a-par de um genoma contra vários disponíveis em um banco de dados. Uma matriz de distância é utilizada e estes dados podem, então, ser utilizados na construção de uma árvore filogenética. As relações entre os *taxa* podem ser comparadas também com base na presença ou ausência de genes que codificam para determinadas famílias de proteínas (House & Fitz-Gibbon, 2002).

A taxonomia bacteriana moderna permitiu a construção de uma classificação hierárquica nos níveis taxonômicos mais altos, principalmente com base nos resultados obtidos pela análise filogenética usando seqüências de 16S rDNA. Descrições de novas espécies são determinadas principalmente com base nos resultados de hibridização DNA-DNA, que expõe uma avaliação quantitativa das relações inter e intra-espécies. Além do mais, a questão do quão apropriado é cada *taxoné* validada incorporando -se vários perfis fenotípicos, quimiotaxonômicos e genotípicos na estrutura hierárquica com base em critérios moleculares pelas técnicas citadas acima. Esta série de técnicas é chamada de Taxonomia polifásica (Vandamme et al., 1996). Nesta abordagem uma árvore filogenética de 16S rDNA é a base para construir a classificação das bactérias e a validação multidimensional é feita examinando-se as várias características moleculares e fenotípicas dos organismos em questão. Esta metodologia é considerada a abordagem padrão na sistemática bacteriana moderna (Boone et al., 2001; Stackenbrandt et al., 2002).

1.2.5 Avaliação da diversidade de BNL

A avaliação da diversidade de bactérias pode ser realizada por muitas técnicas baseadas em características fenotípicas ou genotípicas. Podem ser

métodos baseados na quantificação do número de espécies presentes (riqueza específica) ou baseados na estrutura das comunidades para avaliar a distribuição proporcional do valor de importância de cada espécie (abundância relativa dos indivíduos, sua biomassa, cobertura e produtividade, entre outros).

A morfologia das bactérias, embora muito diversa (Moreira & Siqueira, 2006), não permite o uso de caracteres morfológicos para uma classificação filogenética adequada destes organismos, o que difere dos organismos superiores. Com o surgimento das técnicas de biologia molecular, principalmente da tecnologia do sequenciamento de ácidos nucleicos, o problema da filogenia de bactérias tornou-se tratável (Woese, 1987).

As medidas de diversidade, de acordo com Magurran (1987), são divididas em três tipos principais: índices de riqueza de espécies, modelos de abundância de espécie e índices baseados na abundância proporcional de espécies. Os índices de riqueza de espécies são medidas do número de espécies presente na comunidade. Os modelos de abundância mostram padrões seguidos pela comunidade. Entre os índices que relacionam riqueza de espécies com a abundância, os mais conhecidos e utilizados são os índices de Shannon e Simpson (Hughes et al., 2001)

Os estudos de diversidade de bactérias que nodulam leguminosas se limitam, em muitos casos, à comparação do número de espécies ou estirpes, ou seja, da riqueza de espécies (Aguilar et al., 2001; Bala et al., 2002; Gao et al., 2001; Moreira et al., 1998; Odee et al., 2002; Tamimi, 2002).

Índices como os de Shannon e Simpson têm sido utilizados para representar a diversidade de isolados de bactérias que nodulam leguminosas (Andrade et al., 2002; Mc Innes et al., 2004).

Coutinho et al. (1999) utilizaram o índice de Shannon para estimar a diversidade de 31 isolados. Neste estudo foi feita uma adaptação do método do

quadrado médio, consistindo de 300 sorteios dos dados e cálculo do índice de diversidade em uma curva com dados acumulados.

Estudo com base em características dos grupos culturais de 230 isolados de caupi utilizou o índice de Shannon para estimar a diversidade destes isolados (Zilli et al., 2004). Mc Innes et al. (2004), utilizando o índice de Shannon em dados de diversidade de vários trabalhos publicados, mostraram que as populações de bactérias que nodulam leguminosas nativas são freqüentemente estruturadas e geneticamente diversas.

A relação matemática entre o número de estirpes identificadas e o número de isolados recuperados é assumida ser linear para os índices de Shannon e Simpson. Porém, Handley et al. (1998) plotaram estas relações para seis populações de *R. leguminosarum* bv *viciae* e uma variedade de curvas foi obtida (Figura 1).

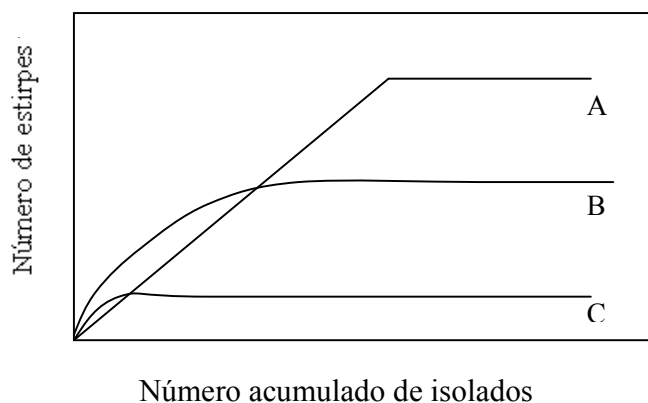


FIGURA 1 Relação entre o número de estirpes identificadas e o número acumulado de isolados recuperados de populações ou comunidades de rizóbio (compilado de Handley et al., 1998). Significados das letras encontram-se no texto.

As Curvas A, B, C são baseadas em populações de *R. leguminosarum* bv *viciae* por Handley et al. (1998) e assume-se que todas as populações de bactérias que nodulam leguminosas e comunidades contêm um número finito de estirpes. A curva indica que os isolados de rizóbios são altamente diversos, resultando numa relação exponencial, e após a assíntota, há uma relação de estabilidade entre o número de estirpes identificadas e o número de isolados recuperados. Na curva B, há uma relação curvilínea em que a parte inicial da curva é íngreme, indicando freqüente recuperação de novas estirpes em relação ao número de isolados acumulados. Contudo, com o aumento do número de isolados amostrados, a curva achata-se, indicando que estirpes já identificadas foram reamostradas. A curva C é similar à curva B, mas os isolados apresentam menor riqueza. As curvas de riqueza de estirpes podem ser utilizadas para comparações entre tratamentos em populações ou comunidades dentro do mesmo estudo, cujas seguintes vantagens sobre índices de riqueza são destacadas por Mc Innes et al. (2004): a) curvas de riqueza de estirpes podem identificar parte ou a maioria das estirpes que são recuperadas das comunidades e populações amostradas; b) as diferenças entre riqueza de estirpes e entre sítios múltiplos são realmente aparentes e podem ser comparadas usando análise de regressão; c) há variação no número total de isolados recuperados de cada população; e d) o número acumulado de estirpes pode ser plotado, indicando se a amostragem espacial foi adequada.

1.2.6 Fatores que afetam a simbiose BNL - leguminosas

A comunidade microbiana nos solos é influenciada pelo ambiente. As modificações ambientais provocadas pela flutuação estacional das condições climáticas também podem influenciar as populações na comunidade microbiana (Wardle & Parkinson, 1990). Nos ecossistemas, a cobertura vegetal permanente proporciona proteção contínua do solo, além de adicionar grandes quantidades

de nutrientes principalmente através de resíduos. Seus efeitos sobre a comunidade microbiana podem interagir com os efeitos provocados pelas flutuações hídricas e térmicas que ocorrem durante o ano, influenciando em menor ou maior grau as populações microbianas, através da determinação da atividade e das taxas de crescimento das diversas populações na comunidade microbiana (Tsai et al., 1992). Nos agroecossistemas, o preparo e o cultivo do solo influenciam as populações da comunidade microbiana, principalmente através de alterações na aeração e na disponibilidade de nutrientes no solo. A calagem e a adubação são alternativas técnicas utilizadas para corrigir a elevada acidez e a baixa fertilidade dos solos de Cerrados (Pereira et al., 1999). Entretanto, as alterações do pH e da disponibilidade de nutrientes podem influenciar a comunidade microbiana de maneira direta através da atuação sobre processos microbianos, fisiológicos e bioquímicos específicos, ou indiretamente através da disponibilidade de nutrientes e da neutralização de elementos tóxicos (Kamel et al., 1989).

Vários fatores podem determinar a necessidade de inoculação em regiões tropicais, tais como a reduzida população de rizóbio nativo do solo, principalmente em áreas submetidas a temperaturas elevadas ou à baixa umidade do solo, ou áreas sem histórico de cultivo anterior com leguminosas (Martins et al., 1997). Apesar das vantagens da prática da inoculação com rizóbio, pouco se conhece sobre a contribuição na fixação biológica do nitrogênio e da nodulação por rizóbios nativos em leguminosas tropicais, bem como sobre o grau de especificidade.

Com a finalidade de avaliar a nodulação em várias leguminosas em condições tropicais, Stamford et al. (1999) observaram grande variação na efetividade em relação às plantas hospedeiras. Nas associações com leguminosas e rizóbios na África e na região semiárida do Nordeste do Brasil, observa-se que os isolados nativos são bastante resistentes às temperaturas elevadas e aos

estresses hídricos, podendo fixar nitrogênio em condições edafo-climáticas desfavoráveis, com boa produtividade, e sem o uso de fertilizantes nitrogenados (Stamford et al., 1999). Entretanto, é necessária a avaliação dos rizóbios nativos, de modo a possibilitar a seleção de estirpes altamente eficientes em condições adversas.

Além da eficiência simbiótica, a capacidade de sobrevivência no solo e a habilidade competitiva com a população rizobiana nativa ou naturalizada do solo são características altamente desejáveis em estirpes de rizóbios recomendadas para inoculação em leguminosas (Brockwell, 1981). Essas características têm sido freqüentemente relacionadas à maior resistência das estirpes a antibióticos, ao Al e a temperaturas elevadas (Oliveira & Graham, 1990; Wolff et al., 1991; Xavier et al., 1998). As temperaturas elevadas, que ocorrem freqüentemente nos trópicos, afetam diversos estágios da fixação biológica do N₂ (FBN), como o crescimento e sobrevivência do rizóbio no solo, troca de sinais moleculares entre os simbiossitos, processo de infecção e nodulação e atividade do aparato enzimático para redução do N₂ e assimilação da amônia formada (Hungria & Vargas, 2000). Do mesmo modo, concentrações tóxicas de Al ocorrem em diversos solos intemperizados dos trópicos e afetam todas as etapas da FBN (Hungria & Vargas, 2000). Contudo, existe variabilidade entre estirpes de rizóbio quanto à tolerância a temperaturas elevadas e ao Al tóxico (Ayanaba et al., 1983; Campo & Wood, 2001; Hungria et al., 1997; Hungria & Vargas, 2000; Karanja & Wood, 1988; La Favre & Eaglesham, 1986; Wood, 1995).

O regime hídrico do solo também é considerado importante, já que os microrganismos necessitam de água para absorção de nutrientes e integridade celular (Moreira & Siqueira, 2006), e mesmo sob inundação há relatos de ocorrência de nodulação em soja (Pires et al., 2002).

Outros fatores abióticos característicos do solo, como a textura, a porosidade, a agregação e os teores de nutrientes, podem também contribuir para

a variação da diversidade das populações de BNL (Moreira & Siqueira, 2006). A etapa preliminar da pesquisa envolve o levantamento da diversidade de BNL, em que a planta isca é uma variável importante a ser considerada, pois o que limita a simbiose BNL-leguminosas são os fatores edáficos, climáticos, a população nativa e, principalmente, as características intrínsecas da espécie hospedeira que influencia na captura dos simbiosites, favorecendo ou desfavorecendo a nodulação de determinados gêneros de BNL. A simbiose BNL-leguminosas iscas deve ser promíscua, ou seja, ser capaz de estabelecer simbiose com vários parceiros. Feijão comum, caupi, leucena, acácia e siratro são exemplo de leguminosas que são utilizadas como planta isca pois podem nodular com várias espécies de mais de um gênero de BNL (Moreira & Siqueira, 2006).

1.2.7 O siratro

Planta estolonífera, radicante, que possui raízas profundas, hastes rasteiras e volúveis. Folhas trifolioladas, pinadas, verde-escuras. Foliolos laterais, ovais e bilobados. Estípulas com 4 a 5 mm, longas e pilosas. Inflorescência do tipo racemo, flores de cor roxo-escuro aglomeradas no ápice. Vagem linear com 8 cm de comprimento, contendo de 12 a 13 sermentes, cuja forma é ovóide e achatada. Pertencente a família *Leguminosae*, subfamília *Papilionoideae*, nome científico *Macroptilium atropurpureum* (OC.) Urb., nome comum siratro (Calegari et al., 1993).

O siratro foi originado de um tipo de planta selvagem no México e é vastamente cultivado em áreas tropicais e subtropicais como uma leguminosa forrageira (Skerman, 1977); usado como suplementação de gramíneas tropicais (Ndlovu & Buchanan-Smith, 1985), apresenta alta digestibilidade para animais (Mupangwa et al., 2003) e possui potencial para suplemento protéico para ruminantes tratados com gramíneas de baixa qualidade e com resíduos de culturas (D'Mello & Devendra, 1995; Topps & Oliver, 1993). Utilizado como

adubação verde (Calegari et al., 1993). Como resultado da interação com bactérias que nodulam leguminosas (BNL), forma nódulos e fixa nitrogênio.

É planta perene que cresce em áreas com precipitação anual entre 635 e 1780 mm anuais, apresenta melhor crescimento onde a temperatura média anual é acima de 21°C, possuindo alto grau de resistência à seca; não tolera solo encharcado e é planta sensível a geada, mas não morre e rebrota a seguir. É considerada planta rústica, pois se desenvolve bem em qualquer tipo de solo porque é pouco exigente em fertilidade, vegeta em solos moderadamente ácidos e tolera teores razoáveis de manganês no solo. Produz cerca de 5 a 6 t/ha/ano de matéria seca e a produção por hectare é em torno de 100 a 150 kg de sementes limpas (Calegari et al., 1993).

Consoquia-se bem com a maioria das gramíneas, é tolerante ao pisoteio, tem boa palatabilidade, bom valor nutritivo e alto grau de resistência a nematóide, mas é atacado por míldio e oídio e pela falsa ferrugem (*Synchytrium*) (Calegari et al., 1993).

O siratro como resultado da interação com bactérias que nodulam leguminosas (BNL) forma nódulos e fixa nitrogênio numa taxa de fixação biológica de N₂ que varia de 70 a 181 (kg/ha/ano) (Moreira & Siqueira, 2006). É considerado uma leguminosa promíscua, pois nodula com bactérias de vários gêneros. Possui a estirpe SEMIA656 (*Bradyrhizobium sp*) como estirpe de bactéria fixadora de nitrogênio recomendada pela RELARE (Reunião de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbiológicos de interesse agrícola) e autorizada pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) para produção de inoculante. Portanto, diante do exposto, é uma planta utilizada com sucesso em estudos que tenham como objetivo a captura de bactérias que nodulam leguminosas.

1.2.8 Análises multivariadas

A interpretação dos resultados gerados na pesquisa depende da análise dos dados, a qual pode ser denominada univariada, quando for baseada na avaliação de apenas uma única variável, e multivariada, quando baseada em duas ou mais variáveis. A utilização da análise univariada torna-se muito limitada quando se tem um grande número de variáveis a serem analisadas em um só experimento.

A análise individual de cada uma dessas variáveis gera dificuldade na interpretação dos dados e, conseqüentemente, no estabelecimento das conclusões, uma vez que as tendências observadas nas variáveis submetidas a um mesmo tratamento podem ser discrepantes ou contraditórias.

Segundo Ferreira (1996), a análise multivariada possui maior aplicabilidade, pois, segundo o autor, permite a redução de dados ou simplificação estrutural - o fenômeno sob estudo é representado da maneira mais simples possível, sem sacrificar informações valiosas e tornando as interpretações mais simples; a ordenação e o agrupamento de tratamentos ou variáveis similares, baseados em dados amostrais ou experimentais; a investigação da dependência entre variáveis; a predição: relações entre variáveis devem ser determinadas para o propósito de predição de uma ou mais variável com base na observação de outras variáveis; a construção e o teste de hipóteses.

1.2.9 Análise de Correlação Canônica

A análise de correlação canônica identifica e quantifica a associação entre dois grupos de variáveis. É a correlação entre a combinação linear das variáveis de um grupo com uma outra combinação linear das variáveis de outro grupo de variáveis (Ferreira, 1996).

Uma coleção de variáveis é dividida em dois conjuntos ($X^{(1)}$, $X^{(2)}$), cujo objetivo é encontrar combinações lineares $U=a'X^{(1)}$ e $V=b'X^{(2)}$, de modo que U e

V tenham maior correlação possível, em que $X^{(1)}$ e $X^{(2)}$ são vetores contendo as variáveis dos dois conjuntos. Essas combinações lineares permitem relacionar os dois conjuntos de variáveis.

A análise da correlação canônica determina o par de combinações lineares que têm a maior correlação entre todos os pares não correlacionados com o par selecionado inicialmente. Os pares de combinações lineares são denominados variáveis canônicas e suas correlações, correlações canônicas (Ferreira, 1996).

A análise de correlação canônica é diferente da análise de componentes principais porque procura identificar e quantificar as associações entre dois conjuntos de variáveis (Abreu & Veter, 1978).

Essa análise é amplamente aplicada, podendo ser utilizada em estudos exploratórios. Assim, em um conjunto grande de variáveis pode-se estudar somente umas poucas combinações lineares de variáveis e aquelas cuja correlação é mais elevada.

Ferreira & Rezende (1997) estudaram o uso de variáveis canônicas em estudos de divergência genética em 28 variedades de milho e mostraram que este método permite determinar quais são as características mais importantes para a divergência genética entre os materiais utilizados no estudo.

Vicente et al. (1998) estudaram as características indicativas de sensibilidade do arroz ao alumínio e as correlações canônicas se mostraram eficientes para a obtenção de combinações lineares capazes de relacionar características vegetativas medidas em solução nutritiva e produtividades em campo, fornecendo, assim, combinações estruturalmente simples, de elevada correlação e significância. Em outro trabalho, Bulluck et al. (2002) determinaram a influência de fertilizantes orgânicos e sintéticos nas

propriedades físicas, químicas e biológicas de solos sob cultivo convencional e orgânico.

1.2.9 Análise de agrupamento

A análise de agrupamento é considerada ferramenta básica para a classificação de itens diversos (populações, clones, variedades, indivíduos, etc.). Agrupar objetos consiste em reconhecer, entre eles, um grau de similaridade suficiente para reuni-los em um mesmo conjunto (Valentin, 2000).

As etapas de uma análise de agrupamento são as seguintes:

- 1- Coleta e organização dos dados que serão reunidos numa tabela com m colunas (descritores) e n linhas (objetos).
- 2- Escolha do modo de análise: modo Q (agrupamento de objetos) ou modo R (agrupamento de descritores), de acordo com o objetivo do trabalho.
- 3- Escolha do coeficiente de associação (similaridade, distância, dependência).
- 4- Escolha do método de agrupamento, que depende de critérios baseados no menor grau de distorção, e sua capacidade de evidenciar melhor a estrutura dos dados.
- 5- Elaboração e interpretação do dendrograma.

Os dados resultantes da análise de métodos genotípicos ou fenotípicos mais complexos e dispendiosos e das características simbióticas, quando envolve a caracterização de um grande número de isolado de bactérias, são interpretados através de análise fenotípica numérica, que é realizada, muitas vezes, utilizando o critério de agrupamento para a seleção de isolados representativos (Stralioetto & Rumjanek, 1999).

As interpretações de análises microbiológicas através de agrupamento de dados de descrição de características fenotípicas (morfológicas, fisiológicas,

perfil de proteínas) permitem comparar um grande número de isolados e verificar possíveis similaridades e diferenças entre eles. Isto é possível devido à análise conjunta dos dados utilizando métodos estatísticos de avaliação das diferenças e similaridades entre os microrganismos, de uma forma menos subjetiva e mais rigorosa, fornecendo medidas quantitativas de similaridade.

Moreira et al. (1993) foram os primeiros a utilizar análise de agrupamento para caracterizar isolados de rizóbio de diferentes grupos de leguminosas tropicais pela comparação de perfis de proteína total por eletroforese em gel de poliacrilamida. Maatallah et al. (2002) utilizaram análise de agrupamento e identificaram 5 grupos fenotípicos de bactéria que nodulam leguminosas a 82% de similaridade. Lima et al. (2005), ao avaliarem a diversidade fenotípica (SDS-PAGE) de 46 estirpes isoladas da Amazônia, formaram 11 grupos ao nível de similaridade de 80%, dos quais apenas um grupo continha a estirpe referência de *B. elkanii* (BR 29), recomendada como inoculante para a soja. Jesus (2004), com base em dendrogramas de similaridade entre isolados de bactérias que nodulam leguminosas, constatou que foi possível o cálculo de ajustes de distribuições de abundância e dos índices de diversidade para os grupos formados a 80%. Hungria et al. (2001) utilizaram 20 parâmetros morfológicos e fisiológicos para o agrupamento de isolados de bactéria que nodulam leguminosas de crescimento rápido com o objetivo de caracterização preliminar.

Assim, as análises multivariadas auxiliam no levantamento preliminar da diversidade presente no ambiente e o efeito conjunto de múltiplas variáveis edáficas que, reconhecidamente, afetam a diversidade e a ocorrência dos organismos.

1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, M. A.; VETTER, D. A análise de relações entre conjuntos de variáveis na matriz geográfica: correlação canônica. In: FAISSOL, S. **Tendências atuais na geografia urbana/regional**: teorização e quantificação. Rio de Janeiro: IBGE, 1978. p. 133-144.

AGUILAR, O. M.; LÓPES, M. V.; RICCILLO, P. M. The diversity of rhizobia nodulating beans in Northwest Argentina as a source of more efficient inoculant strains. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 91, n. 2/3, p. 181-188, Oct. 2001.

ALENCAR, A.; NEPSTAD, D.; DIAZ, M. C. V. Forest under story fire in the Brazilian Amazon in ENSO and non - ENSO Years: area burned and committed carbon emissions. **Earth Interactions**, Boston, v. 10, art. 6, 2005.

ALENCAR, A.; NEPSTAD, N.; MCGRAT, D.; MOUTINHO, P.; PACHECO, P.; DIAZ, M. D. C. V.; FILHO, B. S. **Desmatamento na Amazônia**: indo além da emergência crônica. Manaus: Instituto de Pesquisa Ambiental da Amazônia (Ipam), 2004. 89 p

ALMEIDA, O. T.; ULH, C. O Imposto Territorial Rural Como Instrumento Para Incentivar Usos Produtivos e Sustentáveis do Solo na Amazônia Oriental In: HOMMA, A. K. O. (Ed.) **Amazônia – meio ambiente e desenvolvimento agrícola**. EMBRAPA-CPATU, 1998. Cap 6, 143-157.

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

ANDRADE, D. S.; MURPHY, P.; GILLER, K. E The diversity of *Phaseolus*-nodulating rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris* in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 8, p. 4025-034, Aug. 2002.

ARAÚJO, W. L.; MACCHERONI JR, W.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; BARROSO, P. A. V.; SARIDAKIS, H. O.; AZEVEDO, J. L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, n. 3, p. 229-236, Mar. 2001

ARAÚJO, W. L.; MARCON, J. MACCHERONI JR, W.; VAN ELSAS, J. D.; VAN VUURDE, J. W. L.; AZEVEDO, J. L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 10, p. 4906-4914, Oct. 2002.

AYANABA, A.; ASANUMA, S.; MUNNS, D. N. An agar plate method for rapid screening of *Rhizobium* for tolerance to acid-aluminium stress. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 47, n. 2, p. 256-258, Mar./Apr. 1983.

AZEVEDO, J. L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) **Ecologia microbiana**. Jagariúna: EMBRAPA-Meio Ambiente, 1998. cap. 18, p. 445-461.

BALA, A.; MURPHY, P.; GILLER, K. E. Occurrence and genetic diversity of rhizobia nodulating *Sesbania sesban* in African soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 34., n. 11, p. 1759-1768, Nov. 2002.

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

BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W.; GARRITY, G. M. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2. Ed. New York: Springer-Verlag, 2001.

BRIM, H.; HEUER, H.; KRÖGERRECKLENFORT, E.; MERGEAY, M. SMALLA, K. Characterization of bacterial community of a zinc-polluted soil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 45, n. 4, p. 326-338, Nov. 1999.

BROCKWELL, J.; HELY, F. W.; NEAL-SMITH, C. A. Some symbiotic characteristics of rhizobia responsible for spontaneous, effective field nodulation of *Lotus hispidus*. **Australian Journal of Experimental Agricultural and Animal Husbandry**, Collingwood, v. 6, n. 23, p. 365-370, Nov. 1966.

BROMFIELD, E. S. P.; BARRAN, L. R. Promiscuous nodulation of *Phaseolus vulgaris*, *Macroptilium atropurpureum*, and *Leucaena leucocephala* by indigenous *Rhizobium meliloti*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 36, n. 5, p. 369-372, May 1990.

BULLUCK III, L. R.; BULLOCK, L. R.; BROSINS, M.; EVAYLO, G. K.; RISTINO, J. B. Organic and synthetic fertility amendments influence soil microbial, physical and chemical properties on organic and conventional farms. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 19, n. 2, p. 147-160, Feb. 2002.

CALEGARI, A.; MONDARDO, A.; BULISANI, E. A.; WILDNER, L. P.; COSTA, M. B. B.; ALCÂNTARA, P. B.; MIYASAKA, S.; AMADO, T. J. C. **Adubação Verde no Sul do Brasil**. 2. ed. Rio de Janeiro:AS-PTA, 1993. 346 p.

CAMPO, R. J.; WOOD, M. Residual effects of successive exposure of soybean *Bradyrhizobium* strains to aluminum on solid defined medium. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 11, p. 1399-1407, nov. 2001.

CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. The diversity of archaea and bacteria in association with roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, New York, v. 41, n. 3, p. 252-263, Apr. 2001.

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

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

CIMA. Comissão Interministerial para Preparação da Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento. **O desafio do desenvolvimento sustentável**: relatório do Brasil para a conferência das Nações Unidas sobre meio ambiente e desenvolvimento. Brasília: Cima, 1991. 204 p.

COENYE, T.; GEVERS, D.; Van de PEER, Y.; VANDAMME P.; SWINGS, J.; Towards a prokaryotic genomic taxonomy. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 29, n. 2, p. 147-167, Apr. 2005

COLWELL, R. R. Microbial diversity: the importance of exploration and conservation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Basingstoke, v. 18, n. 5, p. 302-307, May 1997.

COUTINHO, H. L. C.; OLIVEIRA, V. M.; LOVATO, A.; MAIA, A. H. N.; MANFIO, G. P. Evaluation of the diversity of rhizobia em Brazilian agricultural soils cultivated with soybeans. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 13, n. 2, p. 159-167, Oct. 1999.

COWAN, S. T. **A dictionary of microbial taxonomic usage**. Edinburgh: Oliver & Boyd, 1968.

CRUZ, L. M.; SOUZA, E. M.; WEBER, O. B.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J.; PEDROSA, F. O. 16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa* sp) and pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merrill). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 5, p. 2375-2379, May 2001.

De LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; NICK, G.; MOREIRA, F.; MOLOUBA, F.; HOST, B.; TORCK, U.; COLLINS, M. D.; LINDSTROM, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. Nov. **International Journal Systematic Bacteriology**, Washington, v. 48, p. 369-382, 1998.

De LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; MAESTROJUAN, G.; NEYRA, M.; COLLINS, M. D.; DREYFUS, B.; KERSTERS, K.; GILLIS, M. Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium melilot* com. nov.; *Sinorhizobium saheli* sp. nov.; and *Sinorhizobium teranga*, sp. nov. **International Journal Systematic Bacteriology**, Washington, v. 44, n. 4, p. 715-733, Oct. 1994.

D'MELLO, J. P. F.; DEVENDRA, C. (Ed.). **Tropical Legumes in Animal Nutrition**. Wallingford, U. K: CAB International, 1995.

DEPRET, G.; HOUOT, S.; ALLARD, M. R.; BRENIL, M. G.; NOUAIM, R.; LAGUERRE, G. Long-term effects of crop management on *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 51, n. 1, p. 87-97, 2004.

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

DUPUY, N.; LORQUIN, J.; N'DIAYE, S.; ALAZARD, D.; GILLIS, M.; DREYFUS, B. Les *Bradyrhizobium* d'*Acacia albida* et d'*Aeschynomene* sp. Bacteriies photosynthetiques et nom photosynthetiques. In: **Interactions Plantes Microorganismes**. Senegal: Fondation Internationale pour la Science, 1992. p. 371-381.

DUPUY, N.; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; VANDENBRUAENE, I.; MAESTROGUAN, J.; DREYFUS, B.; KERSTERS, K.; COLLINS, M. D.; GILLIS, M. Phenotypic and genotypic characterization of *Bradyrhizobia* nodulating the leguminous tree *Acacia albida*. **International Journal Systematic Bacteriology**, Reading, v. 44, p. 461-473, 1994.

ERWIN, T. L. A copa da floresta tropical: o coração da diversidade biológica. In: WILSON, E. O. (Ed.). **Biodiversidade**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. p. 158-165.

FANTROUSSI, S. E. L.; VERSCHUERE, L.; VERSTRAETE, W.; TOP, E. M. effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S r RNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 3, p. 982-988, Mar. 1999.

FERREIRA, D. F. **Análise multivariada**. 1996. 400 p. Disponível em: <<http://www.dex.ufla.br/~danielff/dex522.pdf>>. Acesso em: 10 mar. 2006.

FERREIRA, D. F. **Análise multivariada**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1996. 394p. (Textos acadêmicos).

FERREIRA, D. F.; REZENDE, D. S. P. Use of canonical variates in genetic divergence studies. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 20, n. 3, p. 497-500, Sept. 1997.

FRANKLIN, R. B.; TAYLOR, D. R.; MILLS, A. L. Characterization of microbial communities using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 35, n. 3, p. 225-235, Apr. 1999.

GAO, J.; TEREFWORK, Z.; CHEN, W.; LINDSTRÖM, K. Genetic diversity of rhizobia isolated from *Astragalus adsurgens* growing in different geographical regions of China **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 91, n. 2/3, p. 155-168, Oct. 2001.

GARBEVA, P.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN VUURDE, J. W. L.; VAN ELSAS, J. D. Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S r DNA based PCR fragments. **Microbial Ecology**, New York, v. 41, n. 4, p. 369-383, May 2001.

GASTINE, A.; SCHERER-LORENZEN, M.; LEADLEY, P. W. No consistent effects of plant diversity on root biomass, soil biota and soil abiotic conditions in temperate grassland communities. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 224, n. 1, p. 101-111, Sept. 2003.

GEHRING, C.; VLEK, P. P. G.; De SOUZA, L. A. C.; DENICH, M. Biological nitrogen fixation in secondary regrowth and mature rainforest of central amazonia. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 111, n. 1/4, p. 237-252, Dec. 2005.

GILLER, K. E. **Nitrogen fixation in tropical cropping systems**. 2. ed. Wallingford, Reino Unido: CAB International.

GONÇALVES, E. R.; ROSATO, Y. B. Genotypic characterization of *Xanthomonas* strains isolated from passion fruit plants (*Passiflora* spp.) their relatedness to different *Xanthomonas* species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 50, n. 2, p. 811-821, Mar. 2000.

GONÇALVES, M.; MOREIRA, F. M. S. Specificity of the Legume *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. and Its Nodule Isolates *Azorhizobium johannae* with other Legume Hosts and Rhizobia. I **Symbiosis**, Rehovot, v. 36, n. 1, p. 57-68, 2004

HANDLEY, B. A.; HEDGES, A. J.; BERINGER, J. E. Importance of host plant for detecting the population diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 241-249, Feb. 1998.

HEAD, I. M.; SAUNDERS, J. R.; PICKUP, R. W. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganism. **Microbial Ecology**, New York, v. 35, n. 1, p. 1-21, Jan./Feb. 1998.

HENCKEL, T.; FRIEDRICH, M.; CONRAD, R. Molecular analyses of methane-oxidizing microbial community in rice field soil by targeting the genes of the 16S r RNA, particulate methane monooxygenase, and methanol

dehydrogenase. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 5, p. 1980-1990, May 1999.

HENZ, S. R.; HUSON, D. H.; AUCH, A. F.; NIESELT-STRUWE, K.; SCHUSTER, S. C. Whole-genome prokaryotic phylogeny. **Bioinformatics**, Oxford, v. 21, n. 10, p. 2329-2335, May 2004.

HEUER, H.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis and temperature gradient gel electrophoresis for studying soil microbial communities. In: VAN ELSAS, J. D.; TREVORS, J. T.; WELLINGTON, E. M. H. (Ed.). **Modern Soil Microbiology** New York: Marcel Dekker, 1997. cap. 12b, p. 353-373.

HEUER, H.; SMALLA, K. Bacterial phyllosphere communities of *Solanum tuberosum* L. and T4-lysozyme-production transgenic variants. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 28, n. 4, p. 357-371, Apr. 1999.

HEYNDRICKX, M.; VAUTERIN, L.; VANDAMME, P.; KERSTERS, K. DE VOS, P. Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 26, n. 3, p. 247-259, Aug. 1996.

HOUSE, C. H.; FITZ-GIBBON, S. T. Using homolog groups to create a whole-genomic tree of free-living organisms:an update. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 54, n. 4, p. 539-547, Apr. 2002.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B. M.; PACE, N. R. Impact of culture independent studies of the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal fo Bacteriology**, Washington, v. 180, n. 18, p. 4765-4774, Sept. 1998.

HUGENHOLTZ, P.; PACE, N. R. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. **Trends in Biotechnology**, Oxford, v. 14, n. 6, p. 190-197, June 1996.

HUGHES, J. B.; HELLMANN, J. J.; RICKETTS, T. H.; BOHANNAN, J. M. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67,n. 10, p. 4399-4406, Oct. 2001.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L. M. D.; COCA, R. G.; MEGIAS, M. Preliminary characterization of soyabean nodules in Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 33, n., 10, p. 1349-1361, Aug. 2001.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, n. 2/3, p. 151-164, Mar. 2000.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; ARAUJO, R. S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. (Ed.). **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1997. p. 189-295.

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

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

JESUS, E. C.; MOREIRA, M. F. 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. *Bradyrhizobium*. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1984. v. 1, p. 242-244.

KAMEL, Z.; KHALIL, M. S.; SHALABY, A. M. Calcium and the biological activities of two *Streptomyces* species isolated, from the rhizosphere of soybean plants. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 29, n. 1, p. 31-39, 1989.

KARANJA, N. K.; WOOD, M. Selecting *Rhizobium phaseoli* strains for use with beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Kenya: tolerance of high temperature and antibiotic resistance. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 112, n. 1, p. 15-22, Nov. 1988.

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

KENNEDY, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 74, n. 1/3, p. 65-76, June 1999.

KENT, M.; COKER, P. **Vegetation description and analysis**. Baffins Lane: J. Wiley, 1992. 363 p.

LA FAVRE, A. K.; EAGLESHAM, A. R. J. The effects of high temperatures on soybean nodulation and growth with different strains of bradyrhizobia. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 32, n. 1, p. 22-27, Jan. 1986.

LACERDA, A. M.; MOREIRA, F. M. S.; ANDRADE, M. J. B.; SOARES, A. L. L. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão caupi. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 51, n. 293, p. 67-82, jan./fev. 2004.

LEWIS, G.; SCHRIRE, B. D.; MACKINDER, B. A.; LOCK, J. M. (Ed.) **Legumes in the world**. Kew, UK: Royal Botanic Gardens, 2003.

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

LOUWS, F. J.; RADEMARK, J. L. W.; BRUIJIN, F. J. The three of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: Diversity, detection and disease diagnosis. **Annual Reviews Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 81-125, 1999.

MAÂTALLAH, J.; BERRAHO, E.; SANJUAN, J.; LLUCJ, C. Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils. **Agronomie**, Les Ulis, v. 22, p. 321-329, 2002.

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

MANLAY, R. J.; CODET, P.; THOULOUSE, J.; CHOTE, J. L. Relationships between abiotic and biotic soil properties during fallow periods in the sudanian zone of Senegal. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 14, n. 2, p. 89-101, Apr. 2000.

MARGULIS, S. **Causas do desmatamento da Amazônia Brasileira**. Brasília: Banco Mundial, 2003. 100 p.

MARILLEY, L; ARAGNO, M. Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of promity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 13, p. 127-136, 1999.

MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, n. 5/6, p. 1005-1010, May/June 1997.

MCINNES, A.; THIES, J. E.; ABBOTT, L. K.; HOWIESON, J. G. Structure and diversity among rhizobial strains, populations and communities- a review. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 36, n. 8, p. 1295-1308, Aug. 2004.

MOREIRA, F. M. S. Nodulação e crescimento de leguminosas em dois solos da Amazônia. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 197-204, maio/ago. 1995.

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

MOREIRA, F. M. S.; HAUKKA, K.; YOUNG, J. P. W. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of Forest legumes in Brazil. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, n. 7, p. 889-895, July 1998.

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, n. 4, p. 563-570, Aug. 1992.

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

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. (Ed.). **Soil biodiversity in Amazonian and others Brazilian ecosystems**. Wallingford: CABI: 2006. 280 p.

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

MUPANGWA, J. F.; NGONGONI N. T.; TOPPS, J. H.; ACAMOVIC, T.; HAMUDIKUWANDA, H. Dry matter intake, apparent digestibility and excretion of purine derivatives in sheep fed tropical legume hay. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 36, n. 3, p. 261-268, June 2000.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. Profiling of complex microbial populations using denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S r RNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v, 59, n. 3, p. 695-700, Mar. 1993.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 73, n. 1, p. 127-141, Jan. 1998.

MYERS, N. Environmental services of biodiversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 93, n. 7, p. 2764-2769, Apr. 1996.

NDLOVU, L. R.; BUCHANAN-SMITH, J. G. Utilisation of poor quality roughage by sheep. Effect of alfalfa supplementation on ruminal parameters, fibre digestion and rate of passage from the rumen. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 65, n. 3, p. 693-703, 1985.

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. 188 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

ODEE, D. W.; SUTHERLAND, J. M.; MAKATIANI, E. T.; MCINROY, S. G.; SPRENT, J. I. Phenotypic characteristics and composition of rhizobia associated with woody legumes growing in diverse Kenyan conditions. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 188, n. 1, p. 65-75, Jan. 1997.

OLIVEIRA, L. A.; GRAHAM, P. H. Evaluation of strain competitiveness in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* using a nod⁺ fix⁻ natural mutant. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 54, n. 4, p. 305-310, Mar. 1990.

OLIVEIRA, I. A.; VASCONCELLOS, M. J.; SELDIN, L.; PAIVA, E.; VARGAS, M. A.; SÁ, N. M. H. Random amplified polymorphic DNA analysis of effective *Rhizobium* sp. Associated with beans cultivated in Brazilian cerrado soils. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, p. 39-44, Jan./Mar. 2000.

OVREAS, L.; TORSVIK, V. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. **Microbial Ecology**, New York, v. 36, n. 3, p. 303-315, Nov./Dec. 1998.

PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, Washington, v. 276, n. 5313. p. 734-740, May 1997.

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

PEREIRA, J. C.; NEVES, M. C. P. ; DROZDOWICZ, A. Dinâmica Das Populações Bacterianas em Solos de Cerrados **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 5, p. 801-811, maio 1999.

PIRES, J. L. F.; SOPRANO, E.; CASSOL, B. Adaptações morfofisiológicas da soja em solo inundado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 1, p. 41-50, jan. 2002.

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

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, Paris, v. 151, n. 3, p. 167-177, Apr. 2000.

RIVAS, R.; VELAZQUEZ, E.; WILLEEEMS, A.; VIZCAINO, N.; SUBB-RAO, N. S.; MATEOS, P. F.; GILLIS, M.; DAZZO, F. B.; MARTINEZ-MOLINA, E. A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L. f.) Druce. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 11, p. 5217-5222, Apr. 2002.

RODRIGUES, T. E. Solos da Amazônia In: ALVAREZ, V. H.; FONTES, L. E. F.; FONJTES, M. P. F. (Ed.) **O solos nos Grandes domínios Morfoclimáticos do Brasil e o Desenvolvimento Sustentado**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, 1996. p. 19-60.

SESSITSCH, A.; REITER, B.; PFEIFER, U.; WILHELM, E. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and *Actinomycetes*-specific PCR of 16S rRNA genes **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 39, n. 1/2, p. 23-32, July 2002.

SKERMAN P. J. *Macroptilium* spp. In: **Tropical forage legumes**. Rome: FAO, 1977. p. 331-340.

SPLECHTNA, B. E.; KLINKA, K. Quantitative characterization of nutrient regimes of high-elevation forest soils in the southern coastal region of British Columbia, Canada. **Geoderma**, Amsterdam, v. 102, n. 1/2, p. 153-174, Jan. 2001.

STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G. M.; GRIMONT, P. A.; KAMPFER, P.; MAIDEN, M. C.; NESME, X.; ROSSELLO-MORA, R.; SWINGS, J.; TRUPER, H. G.; VAUTERIN, L.; WARD, A. C.; WHITMAN, W. B. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal of Systematics and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 52, n. 3, p. 1043–1047, May 2002.

STACKENBRANDT, E.; GOEBEL, B. M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 44, n. 4, p. 846-849, Oct. 1994.

STALEY, J. T.; KRIEG, N. J. Classification of prokaryotes organisms: an overview. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's manual of systemaic bacteriology**. Baltimore: The Williams & Wilkins Company, 1984. v. 1.

STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S.; MEDEIROS, R.; FREITAS, A. D. S. Efeito da fertilização com fósforo, potássio e magnésio em jacatupé infectado com rizóbios em um latossolo álico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 10, p. 1831-1838, out. 1999.

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

SWIFT, M. J.; ANDERSON, J. M. Biodiversity and ecosystem function in agricultural systems. In: SCHULZE, E. D.; MOONEY, H. A. (Ed.). **Biodiversity and ecosystem function**. Berlin: Springer-Verlag, 1994. p. 15-41.

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

TAMIMI, S. M. Genetic diversity and simbiotic effectiveness of rhizobia isolated from root nodules of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in soils of the Jordan valley. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 19, n. 2, p. 183-190, Feb. 2002.

TOPPS, J. H.; OLIVER, J. **Animal Foods of Central Africa**. Harare, Zimbabwe: Modern Farming Publications, 1993. p. 76-105, 1993. (Zimbabwe Agricultural Journal Technical Handbook, n. 2).

TRINICK, M. J.; MILLER, C.; HADOBAS, P. A Formation and structure of root nodules induced on *Macropodium atropurpureum* inoculated with various species of *Rhizobium*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 69, n. 7, p. 1520-1532, July 1991.

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

TSAI, S. M.; BARAIBAR, A. V. L.; ROMANI, V. L. M. Efeito de fatores do solo. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. (Ed.). **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 59-72.

VALENTIN, J. L. **Ecologia numérica**: uma introdução à análise multivariada de dados ecológicos. Rio de Janeiro: Interciência, 2000. 118 p.

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

VAN BERKUN, P.; FUHRMANN, J. J.; EARDLY, B. D. Phylogeny of Rhizobia. In: PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M.; YATES, G.; NEWTON, W. E.

Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity. Foz do Iguaçu: Kluwer Academic Publishers, 2000. p 3-8.

VAN ELSAS, J. D.; DUARTE, G. F.; ROSADO, A. S.; SMALLA, K. Microbiological and their effects in the soil environmental. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 32, n. 2, p. 133-154, Apr. 1998.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLS, M; DEVOS , P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a Consensus Approach to Bacterial Systematics. **Microbiology Reviews**, Washington, v. 60, n. 2, p. 407-437, June 1996.

VICENTE, F. M. P.; ROSSIELLO, R. O. P.; PEREIRA, E. M. B. Características indicativas de sensibilidade ao alumínio em arroz. II correlação canônica com a produção. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 1, p. 9-16, Jan. 1998.

WALKER, R. T.; HOMMA, A. K. O.; SCATENA, F. N.; ROCHA, A. C. P. N.; SANTOS, A. I. M.; CONTO, A. J.; RODRIGUEZ-PEDRAZA, C. D.; FERREIRA, C. A. P.; OLIVEIRA, P. M.; CARVALHO, R. A. A Evolução da cobertura do Solo nas áreas de Pequenos Produtores na Transamazônica In: HOMMA, A. K. O. (Ed.) **Amazônia – meio ambiente e desenvolvimento agrícola**. EMBRAPA-CPATU, 1998. Cap 12, p. 321-343.

WARDLE, D. A.; PARKINSON, D. Interactions between microclimatic variables and the soil microbial biomass. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 9, n. 3, p. 273-280, 1990.

WAYNE, L. G.; BRENNER, D. J.; COWELL, R. R.; GRIMONT, P. A. D.; KANDLER, P.; KRICHEVSKY, M. I.; MOORE, L. H.; MOORE, W. E. C.; MURRAY, R. G. E.; STACKENBRANDT, E.; STARR, M. P.; TRÜPER, H. G. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 37, n. 4, p. 463-464, Oct. 1987.

WEISBURG, W. G.; BARNES, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, n. 2, p. 697-703, Jan. 1991.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, Dec. 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBERLIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A. .; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, Nov. 1990.

WOESE, C. Prokaryote Systematics: Chapter 1. The Evolution of a Science. In: The prokaryotes. In: BALOWS, A. et al. (Ed.). **The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria, ecophysiology, isolation, identification, applications**. 2. ed. New York: Springer-Verlang, 1991. v. a, p. 3-18.

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

WOLF, Y. I.; ROGOZIN, I. B.; KONDRASHOV, A. S. e KOONIN, E. V. Genome alignment, evolution of prokaryotic genome organization, and prediction of gene function using genomic context. **Genome Research**, Plainview, v. 11, n. 3, p. 356-372, Mar. 2001.

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

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea rhizobia population. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 27, n. 4, p. 386-392, sept. 1998.

YANG, C. H.; CROWLEY, D. E. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 1, p. 345-351, Jan. 2000.

ZILLI, J. E.; VALISHESKI, R. R.; FREEIRE, F. R.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Assessment of cowpea *Rhizobium* diversity in cerrado areas of northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 281-287, Oct./Dec. 2004.

CAPÍTULO 2

RESUMO

LIMA, A.S. Densidade e eficiência de populações de bactérias que podem fixar nitrogênio em simbiose com siratro (*Macropodium atropurpureum*) de solos sob diferentes usos na Amazônia Ocidental In: _____. **Densidade, Eficiência e Diversidade de Bactérias Fixadoras de N₂ que Nodulam o Siratro (*Macropodium atropurpureum*) de Solos sob Diferentes Usos na Amazônia Ocidental**. 2006. Cap. 2, 167p. Tese (Doutorado em Ciência do Solos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

As bactérias que nodulam leguminosas (BNL) destacam-se pela importância ecológica e potencial de utilização agrícola. O objetivo deste estudo foi avaliar a densidade e a eficiência de populações de BNL capturadas por siratro (*Macropodium atropurpureum*), como planta isca, de diferentes sistemas de uso da terra (SUT): floresta primária (F); floresta secundária em estágio avançado de regeneração (FA); floresta secundária em estágio inicial de regeneração (FI); agricultura (AG); agrofloresta (A) e pastagem (P). Em nenhuma das áreas dos SUT, estirpes exóticas foram introduzidas pelo uso de inoculantes. Foram coletadas 98 amostras de solo, na camada de 0-20 cm, utilizando trado de rosca, as quais foram distribuídas em seis janelas, de 9 ha cada, no Alto do Rio Solimões, AM. A distância entre pontos foi, geralmente, de 100 m (ou 50m para alguns deles). Suspensões de diluições decimais seriadas em solução de NaCl (0,85%) das amostras de solo coletadas em cada ponto amostrado foram inoculadas em plantas de siratro cultivados em sacos plásticos na casa-de-vegetação da Universidade Federal de Lavras, MG. A densidade da população de BNL foi avaliada através do número mais provável (NMP). Depois de um mês, as plantas inoculadas com a diluição de 10⁻¹ foram colhidas e os pesos da matéria seca da parte aérea, o número de nódulos e a eficiência relativa foram avaliados em relação à testemunha nitrogenada. Populações de bactéria fixadoras de nitrogênio nodulíferas de siratro estão presentes em solos sob todos os SUT, e embora tenham sido pouco eficientes na promoção do crescimento das plantas de siratro, apresentam-se como potenciais para isolamento de estirpes eficientes e competitivas.

¹ Orientadora: Fátima Maria de Souza Moreira – UFLA.

ABSTRACT

LIMA, A.S. Density and efficiency of nitrogen-fixing bacteria nodulating siratro (*Macropodium atropurpureum*) from soils under different uses in Western Amazon region. In: _____. **Density, efficiency and diversity of nitrogen-fixing bacteria nodulating siratro (*Macropodium atropurpureum*) from soils under different uses in Western Amazon region.** 2006. Chap. 2, 167p. Thesis (Doctorate in Soil Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.¹

Bacteria nodulating leguminous (BNL) stands out for ecological importance and agricultural use potential. This work aimed to evaluate density and efficiency of nitrogen fixing bacterial populations able to establish symbiosis with siratro (*Macropodium atropurpureum*), in soils under the land use systems (LUSs): primary forest, young secondary forest, old secondary forest, agriculture, agroforestry and pasture. In no one of the areas in each LUSs, exotic strains were introduced by using inoculants. Composed samples were collected at 0-20 cm depth in 98 sampling points distributed in 6 sampling grids (windows) with about 9 ha each, in Upper Solimões river – AM. Distance between points was usually 100 m (or 50 m for a few of them). Suspensions in NaCl solution (0,85%) of composed soil samples collected in each sampling point were inoculated in siratro plants cultivated in plastics bags in greenhouse at Federal University of Lavras, MG. The density was evaluated by Most Probable Number (MPN). After one month, plants of 10^{-1} dilution were harvest and shoot dry matter weight, nodule number and relative efficiency were evaluated in relation to plants receiving mineral nitrogen. Nitrogen-fixing Bacteria nodulating siratro were present in soils under all LUSs. Although they presented low efficiency in promoting siratro growth, they presented potentially useful for isolation of efficient and competitive strains.

¹Guidance Committee: Fátima Maria de Souza Moreira – UFLA.

2.1 INTRODUÇÃO

Os organismos do solo são os responsáveis por diversas atividades essenciais para o funcionamento dos ecossistemas, como decomposição da matéria orgânica, disponibilidade de nutrientes no solo e agregação das partículas do solo, entre outras (Moreira & Siqueira, 2006). Uma dessas importantes atividades dos microrganismos do solo é a fixação biológica de nitrogênio, mediada por diversas espécies de procariotos, chamados diazotróficos, entre os quais se destacam as bactérias que nodulam leguminosas (BNL).

Os benefícios da simbiose BNL - leguminosas dependem da exploração da diversidade natural de leguminosas e de estirpes de BNL presentes em solo tropicais (Kahindi et al., 1997) e diferentes práticas de manejo do solo utilizadas influenciam na ocorrência e diversidade de BNL (Coutinho et al.; 1999; Jesus et al., 2005; Nóbrega, 2006; Pereira, 2000).

Manejos adequados, e que garantam a sustentabilidade dos ecossistemas, só serão melhores desenvolvidos através de avaliações do impacto dos diversos usos da terra sobre a diversidade edáfica, ou seja, sobre a população dos organismos do solo. Entre esses organismos, as bactérias que nodulam leguminosas (BNL) destacam-se pela importância ecológica e potencial de utilização agrícola.

Assim, os objetivos deste estudo foram: verificar a densidade e a eficiência simbiótica das populações de bactérias que nodulam e fixam nitrogênio em siratro de solos sob diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental; discriminar os sistemas de uso da terra em função do crescimento e nodulação das plantas induzidos por estas populações; e correlacionar o grupo das variáveis que representam o crescimento e nodulação das plantas com os atributos dos solos de origem.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Caracterização

Este trabalho faz parte do projeto “*Conservation and Sustainable Management of Below-Ground Biodiversity*”, financiado pelo GEF e implementado pelo “*United Nations Environment Programme (UNEP)*”, que está sendo executado em sete países, Brasil, Costa do Marfim, Índia, Indonésia, Kênia, México e Uganda, cujo objetivo é despertar a consciência e a compreensão sobre a biodiversidade do solo, importante para a produção agrícola sustentada em áreas tropicais, através da demonstração de métodos para a conservação e manejo sustentado (Projeto GF/2715-02).

As áreas avaliadas são em número de seis janelas, com aproximadamente nove hectares cada, e localizam-se na região amazônica, incluindo comunidades indígenas do município de Benjamin Constant, noroeste do Estado do Amazonas, cuja região é denominada de Alto Solimões, na tríplice fronteira Brasil, Colômbia e Peru, sob as coordenadas geográficas 4°20' e 4°26' Sul e 69°36' e 70°2' Oeste. As áreas compreendem as comunidades de Guanabara II e de Nova Aliança e a cidade de Benjamim Constant, situadas a aproximadamente 1.100 km a oeste de Manaus, na base do Rio Solimões (Figura 1). São áreas de difícil acesso, e por isso de pouca intervenção antrópica, que possuem diferentes sistemas de uso da terra e são povoadas por representantes dos índios Ticuna e Cocamo. As comunidades existem há 22 anos, estão organizadas em associações que praticam agricultura de pequena escala, agrofloresta e extrativismo vegetal e representam um dos mais importantes “hotspots” em termos de agrobiodiversidade (Fidalgo et al., 2005; Moreira et al., 2005).

O clima da região é tropical úmido a superúmido Af (Köppen), sem estação seca, com temperatura e precipitação média anual de 25,7°C e de 2.562 mm, respectivamente. O total das chuvas do mês mais seco é superior a 100 mm,

com maiores precipitações concentradas nos meses de dezembro (Coelho et al., 2005).

Destaca-se, no projeto RADAMBRASIL (Brasil, 1977), o levantamento, em pequena escala (1:1.000.000), dos recursos naturais desta região. Segundo levantamento de solos realizado por Coelho et al. (2005), o material geológico das áreas deste estudo pertence à Formação Solimões e está, predominantemente, sobre Cambissolos.

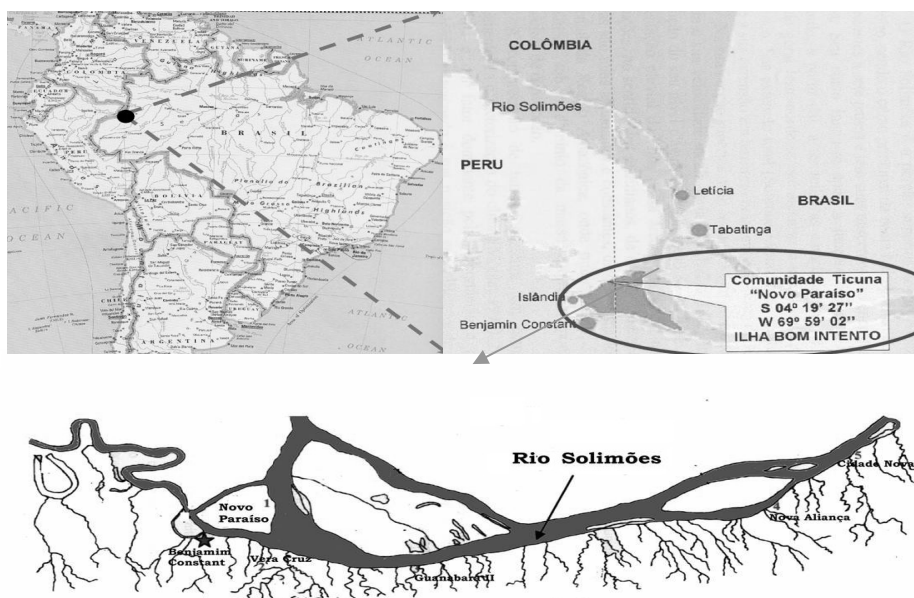


FIGURA 1 Local das áreas de coleta (cidade Benjamin Constant e comunidades indígenas Nova Aliança e Guanabara II, no município de Benjamin Constant).

Fidalgo et al. (2005) caracterizaram os sistemas de uso da terra (SUT) estudados quanto à cobertura vegetal e uso atual como sendo: floresta tropical (F), sub região dos baixos platôs da Amazônia (Brasil, 1977) (controle); floresta secundária em estágio avançado de regeneração (FA) com mais de cinco anos de

formação, após ter sido área de cultivo; floresta secundária em estágio inicial de regeneração (FI) com menos de 5 anos de formação, também após ter sido área de cultivo; agricultura (AG), áreas de cultivos agrícolas anuais (mandioca, milho, cana-de-açúcar e abacaxi) e semiperenes (banana); agrofloresta (AF), caracterizada por grande parte formada de regeneração espontânea de espécies florestais secundárias, além do enriquecimento de espécies através do plantio de mudas de interesse econômico como cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), pupunha (*Bactris gassipae*), banana, abacaxi, café e outras. Essas áreas foram desflorestadas no período de 1979 a 1983 e cultivadas com banana e mandioca.

Os sistemas agroflorestais foram formados logo após os primeiros ciclos de cultivo, no período de 1980 a 1984; a pastagem (P), área restrita à cidade de Benjamin Constant, foi implantada em 1970, com capim imperial (*Axonopus scoparius*). Após declínio, aproximadamente onze anos decorridos da implantação, este foi substituído por *Brachiaria brizantha*, *B. humidicola* e grama batatais (*Paspalum notatum flugge*), apresentando, atualmente, espécies invasoras. A reforma das pastagens é realizada através do plantio de mudas em covas. As capinas são realizadas três vezes ao ano com facão, enxada e machado. Em todos os SUTs não são aplicados corretivos, fertilizantes e defensivos para o controle de pragas e não existe registro de utilização de inoculantes de bactérias que nodulam leguminosas.

2.2.2 Amostragem e análise química e física do solo

Foram coletadas 98 amostras de solo, na camada de 0-20 cm, utilizando trado de rosca, distribuídas em seis janelas, alocadas a 100 m uma da outra e, em alguns casos, a 50 m (Fidalgo et al., 2005), na primeira quinzena de março de 2004 (período úmido e com maior pluviosidade). Dos 98 pontos para que a amostragem pudesse englobar as diferenças entre os SUTs, 10 pontos foram amostrados na agrofloresta (A), 18 na agricultura (AG), 17 na floresta primária

(F), 10 na floresta secundária estágio avançado de regeneração (FA), 30 na floresta secundária estágio inicial de regeneração (FI) e 13 na pastagem (P). Cada ponto de amostragem foi georeferenciado e fazia parte de uma malha pré-estabelecida, seguindo as normas instituídas do projeto para todos os países envolvidos (Moreira & Bignell, 2006). As amostras simples foram coletadas em dois círculos concêntricos de 3 a 6 m de raio, tendo como ponto central o ponto principal de amostragem, segundo protocolo do projeto global coordenado nos 7 países (figura 2). Antes de realizar a coleta das amostras, retirou-se a serapilheira do local e todo o material utilizado foi flambado para evitar contaminação entre os pontos.

As amostras destinadas à análise microbiológicas (cerca de 300g) foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis *Nasco*[®], armazenadas em recipientes de isopor, para conservação, e levadas para o laboratório, no qual foram conservadas a 4° C até o uso. Em cerca de 200g de cada amostra composta foi realizada a análise das características físicas e químicas do solo (Nóbrega, 2006) (Tabela 1).

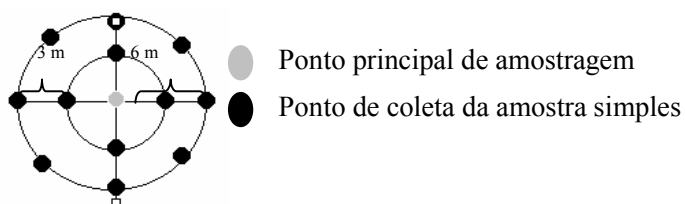


FIGURA 2 Esquema de coleta das subamostras de solo para formação de cada amostra composta por ponto de amostragem. O ponto do centro do círculo foi georeferenciado. Os 12 pontos em negrito representam as amostras simples.

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

SUT	FP	P	A	AG	FI	FA
pH	4,5 (4,7/4,2)	5,2 (5,4/4,9)	4,9 (5,5/4,6)	5,4 (6,4/4,7)	4,9 (5,8/4,3)	4,6 (5,8/4,0)
S	7,2 (14,3/3,3)	6 (7,5/4,5)	22,9 (173,4/3,3)	5,5(10,3/2,10)	6,9 (32,6/1,8)	22,4 (173,4/4,1)
P	4 (5,5/2,3)	2,8 (5,2/2,0)	4,5 (10/1,4)	4,4 (9,3/2,3)	3,6 (8,9/2,0)	3,8 (5,2/2,3)
P-rem	10,2 (14,0/6,8)	11,2 (14,3/7,7)	14,4 (18,3/10,9)	17,9 (25,2/8,5)	14,2 (24,4/6,0)	11,4 (21,1/6,5)
K ⁺	62,8 (86,0/36,0)	40,46 (67/27)	62,8 (124,0/34,0)	94,5 (136/42,0)	76,4 (136,0/41,0)	56,1 (99,0/34,0)
Ca ²⁺	3,8 (8,0/1,3)	2,2 (3,7/1,4)	7,3 (12,0/4,6)	8,9 (17,5/4,6)	6,1 (10,5/2,6)	4 (12,7/0,8)
Mg ²⁺	2 (3,0/1,0)	1,4 (2,5/0,6)	2,1 (3,6/1,0)	2,5 (3,7/1,2)	2,5 (4,8/1,2)	1,7 (4,3/0,2)
Al ³⁺	5,7 (9,3/2,5)	2,8 (4,7/1,4)	2,5 (3,6/0,5)	1,7 (5,4/0,0)	3 (8,2/0,4)	5,2 (9,4/0,20)
H+Al	22,1 (33,4/8,8)	12,8 (29,9/6,3)	12,4 (17,1/5,6)	8,2 (21,4/2,3)	13 (29,9/3,6)	19,9 (33,4/4,00)
SB	6 (11,2/2,6)	3,8 (6,1/2,2)	9,6 (15,8/6,5)	11,7 (21,3/7,3)	8,8 (15,5/4,4)	5,8 (17,2/1,1)
t	11,7 (16,7/9,1)	6,6 (9,0/3,7)	12,1 (17,2/9,2)	13,3 (21,6/8,4)	11,9 (18,8/6,4)	11,1 (17,3/8,8)
T	28,13 (9,1/15,4)	16,6 (33,6/8,6)	22 (29,1/4,5)	19,9 (32,0/12,9)	21,8 (35,2/14,0)	25,7 (35,4/15,2)
V	22,3 (43,0/9,0)	24,2 (35,5/11,0)	43,9 (61,7/29,7)	61,6 (85,5/29,0)	43,6 (81,1/15,0)	26,9 (81,1/4,0)
m	49,4 (72,0/23,0)	42,5 (65,0/28,0)	21,4(33,0/5,0)	12,8 (37,0/0,0)	25,3 (61,0/4,0)	51,9 (87,0/1,0)
MO	1,7 (2,2/1,0)	1,6 (2,0/1,3)	1,8 (2,2/1,5)	1,9 (2,2/1,40)	1,9 (2,6/1,3)	1,7 (2,1/1,4)
Zn	6,5 (17,9/1,4)	7,7 (21,4/2,0)	5,2 (14,6/2,0)	71 (8,9/1,6)	6,7 (20,9/1,6)	3,6 (7,9/2,0)
Fe	190 (338,5/124,1)	471,8 (1150,5/74,9)	136,7 (231,7/75,6)	97,3 (162,0/10,2)	157,6 (332,0/59,8)	126,2 (222,0/53,0)
Mn	70 (137,7/9,4)	40,5 (139,2/15,8)	58 (99,7/11,2)	70,1 (116,4/20,9)	53,9 (139,2/23,4)	56,4 (89,5/18,0)
Cu	1,5 (3,3/0,7)	1,9 (2,8/1,2)	2 (3,7/0,8)	1,4 (1,9/0,7)	2 (4,6/0,2)	1,4 (2,3/0,7)
B	0,3 (0,7/0,0)	0,1 (0,7/0,0)	0,4 (0,7/0,0)	0,4 (0,6/0,1)	0,2 (0,5/0,0)	0,1 (0,4/0,0)
Areia	13,6 (27,0/4,0)	28,2 (50/10)	13,6 (30,0/7,0)	22,4 (36/10)	22 (53/5)	13,2 (27,0/6,0)
Silte	44,1 (53/31)	39,2 (53/10)	47,4 (54/39)	39,8 (48/32)	41,9 (54/26)	47,3 (51/40)
Argila	42,3 (65/32)	32,6 (45/24)	39 (52/30)	37,8 (55/25)	36,1 (64/21)	39,5 (47/31)

Média e máximo e mínimo dos números de pontos de coleta em cada SUT sistema de uso da terra; 10 pontos na agrofloresta (A), 18 na agricultura (AG), 17 na floresta primária (F), 10 na floresta secundária estágio avançado de regeneração (FA), 30 na floresta secundária estágio inicial de regeneração (FI) e 13 na pastagem (P); pH em água; P fósforo em mg dm⁻³; K potássio em mg dm⁻³; Ca cálcio em cmol_c dm⁻³; Mg magnésio em cmol_c dm⁻³; Al alumínio em cmol_c dm⁻³; H + Al hidrogênio + alumínio em cmol_c dm⁻³; SB soma de bases trocáveis em cmol_c dm⁻³; CTC efetiva em cmol_c dm⁻³; T CTC em pH 7; V saturação de bases da CTC a pH 7; m saturação de Al da CTC efetiva; em porcentagem (%); MO matéria orgânica em Dag kg⁻¹; P remanescente em mg dm⁻³; Zn zinco em mg dm⁻³; Fe ferro em mg dm⁻³; Mn manganês em mg dm⁻³; Cu cobre em mg dm⁻³; S enxofre mg dm⁻³ e areia, silte e argila em porcentagem (Nóbrega et al., em preparação).

2.2.3 Captura de BNL através de planta isca e determinação da densidade populacional de BNL

Para captura e determinação da densidade populacional de BNL, um experimento foi montado na casa-de-vegetação do Laboratório de Microbiologia do Solo – DCS – UFLA, de abril a maio de 2004, em sacos plásticos estéreis da *Nasco*[®] de 300 mL, com solução nutritiva de Jensen isenta de nitrogênio (K_2HPO_4 0,2 g L⁻¹; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g L⁻¹, NaCl 0,2 g L⁻¹, $CaHPO_4$ 1g L⁻¹, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,1 g L⁻¹; H_3BO_3 2,86 mgL⁻¹; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 2,03 mg L⁻¹; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,22 mgL⁻¹; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,08 mgL⁻¹ e $Na_2MoO_4 \cdot H_2O$ 0,09 mgL⁻¹), diluída quatro vezes e esterilizada (Jensen, 1942; Vincent, 1970). As sementes foram desinfestadas e escarificadas em ácido sulfúrico (H_2SO_4 p.a), lavadas e colocadas para entumecer em um becker com água destilada por cerca de seis horas e, em seguida, foram germinadas por cerca de doze horas em placa de Petri com algodão e papel filtro e umedecidas com água destilada (todo este procedimento foi realizado com material estéril). Foram colocadas duas plantas de siratro (*Macroptilium artropurpureum*) por saco, as quais foram inoculadas com suspensões de cada uma das diluições decimais seriadas das amostras de solo.

As 98 amostras de solo foram submetidas a diluições decimais seriadas antes da inoculação da planta-isca. Foram diluídos 10g de cada amostra em 90 mL de solução salina NaCl 0,85%. Os frascos contendo as amostras de solo foram agitados por 30 minutos, a 50 rpm. Após a agitação, 1mL de cada diluição foi transferido para tubos de ensaio contendo 9mL de solução salina, constituindo uma diluição de 10 vezes (10^{-1}). O processo de diluição foi repetido sucessivamente até a obtenção da diluição de 10^{-7} . As plantas foram inoculadas com 1mL de cada diluição (1mL por saco plástico) e foram utilizadas 3 repetições por diluição (3 sacos plásticos com plantas de siratro para cada diluição). Dois tratamentos controle sem inoculação foram adicionados, uma

testemunha com Nitrogênio mineral e uma testemunha sem N e sem inoculação (testemunha absoluta), para garantia da ausência de contaminação e para comparação com as plantas inoculadas. As testemunhas com nitrogênio mineral receberam nitrogênio na forma de uma solução de nitrato de potássio (KNO₃), de modo que cada saco plástico tivesse 70 mg de nitrogênio N- KNO₃, (Vincent, 1970).

Para estimativa da densidade da população de BNL utilizou-se a técnica do número mais provável (NMP) (Woomer et al., 1994), através do programa *Most Probable Number Enumeration System* – MPNES (Bennett et al., 1990).

2.2.4 Avaliação da eficiência das populações de BNL

Para avaliação da eficiência das populações de BNL foram consideradas as plantas inoculadas com a diluição de 10⁻¹. O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado (DIC), com três repetições e 6 tratamentos (6 diferentes SUT). Dois tratamentos controles foram adicionados, uma testemunha com Nitrogênio mineral e uma testemunha sem N e sem inoculação (testemunha absoluta), para garantia da ausência de contaminação e para comparação com as plantas inoculadas. As plantas foram colhidas 30 dias após a montagem do experimento, quando foi determinado o peso da matéria seca da parte aérea e avaliado o número de nódulos.

Após o destacamento manual, os nódulos das raízes foram contados e imediatamente utilizados para o isolamento das estirpes de BNL. Portanto, não foi analisado o peso de nódulos. A parte aérea foi acondicionada em sacos de papel e levada para estufa de circulação forçada (65 a 70°C) até peso constante, para determinação do peso da matéria seca. A eficiência relativa de cada tratamento foi calculada segundo a fórmula (Bergensen et al., 1971):

$$ER = \frac{MSPAinoculada}{MSPAcomN} \times 100$$

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

2.2.5 Análise dos Dados

As amostras foram consideradas separadamente para efeito de contagem de células de BNL no solo (densidade) e do cálculo de eficiência das populações. Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o programa SISVAR, versão 4.3 (Ferreira, 2000). Para cada tratamento (sistemas de uso da terra - SUTs) foi realizada a análise dos dados referentes ao crescimento e à nodulação do siratro através da ANAVA. Para a análise do número de nódulos, os dados foram transformados para log de x acrescido de uma unidade. Os efeitos dos tratamentos foram comparados pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Posteriormente foram realizados MANAVA, coeficientes de correlação, contrastes, agrupamento utilizando a distância de Mahalanobis, avaliação simultânea das relações entre as variáveis através da análise de variáveis canônicas (VC) e análise de correlação canônica, provenientes de um modelo inteiramente casualizado multivariado, em que se realizou a correlação entre o grupo formado pelos atributos edáficos (P, K, Ca, Mg, H+Al, Al, m, T, CTC, P-rem, Zn, Fe, B, SB, t, Mn, Cu, S, matéria orgânica, areia, argila) e o grupo formado pelas variáveis relacionadas ao crescimento e à nodulação das plantas de siratro (MSPA, número de nódulos (NN), número de nódulos na diluição 10^{-1} (NN10)) e de densidade de BNL (NMP).

Todas as técnicas multivariadas foram realizadas no programa SAS (SAS Institute, Cary, NC 1999-2000) com o objetivo de determinar quais atributos químicos edáficos influenciaram o crescimento e a nodulação das populações de BNL.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Densidade populacional de BNL

Em todos os pontos de todos os SUTs foi detectada a presença de bactérias que nodulam siratro e os resultados do número de repetições que apresentaram nódulos em cada diluição (seqüência), do número mais provável (NMP) de células de BNL e do número de nódulos (NN) os diferentes SUTs encontram-se na Tabela 2. Os valores de NMP encontrados variaram de 3,6 células a 4×10^4 células por grama de solo (Figura 3). Os maiores valores médios foram observados para agrofloresta (A), $3,96 \times 10^3$ células por grama de solo, que variou de 3,6 a $4,00 \times 10^4$ células por grama de solo, seguida por floresta secundária estágio avançado de regeneração (FA), com valor médio de $2,9 \times 10^3$, variando de 42 a $2,5 \times 10^4$ células por grama de solo; floresta secundária estágio inicial de regeneração (FI), com valor médio de $2,9 \times 10^3$, variando de 4 a $4,00 \times 10^4$ células por grama de solo; agricultura (AG), $1,724 \times 10^3$, variando de 15 a $2,3 \times 10^3$ células por grama de solo; e pastagem (P), $4,8 \times 10^2$, variando de 4 a $1,466 \times 10^3$ células por grama de solo. Os menores valores observados foram para floresta primária (F), 85×10^2 células, variando de 15 a $424,54 \times 10^2$ células por grama de solo. Devido à grande variabilidade entre os dados, não houve diferença entre as áreas estudadas, pois houve sobreposição do intervalo de confiança. Não foi detectada a presença de nódulos nas testemunhas com e sem N, demonstrando que não houve contaminação. Os maiores valores $4,00 \times 10^4$ células de BNL ($\log_{10} 4,6021$ células por grama de solo) foram encontrados em três pontos da janela 2: Agricultura (AG) ponto 22 e floresta secundária estágio inicial de regeneração (FI) pontos 29 e 30.

Jesus et al. (2005), trabalhando com solos da Amazônia da mesma região deste estudo, encontraram maiores valores de densidade em floresta e pupunha e menores para mandioca. Pereira (2000), em estudo com solos da

Amazônia de outra região, encontrou valores de densidade maiores para monocultura, floresta, capoeira e pastagem.

Apesar de o menor valor médio ter sido observado em floresta primária (F), 85 células por grama de solo, os menores valores, 3,5658 células de BNL (\log_{10} 0,5523 células por grama de solo), foram encontrados em oito pontos: ponto 42 da janela 3, floresta secundária estágio avançado de regeneração (FA); pontos 49, 50 e 55 da janela 4, todos agricultura (AG); pontos 68A e 73 da floresta secundária estágio inicial de regeneração (FI); ponto 72 da janela 5, agricultura (AG); e ponto 82 da janela 6, pastagem (P), valores mais baixos do que os encontrados por Jesus et al.(2005) e Pereira (2000). Tendo em vista que os valores de NMP para floresta variaram de 15 a 424×10^2 células de BNL, Pereira (2000) encontrou populações de BNL em floresta variando de 210 a 1684 células e Jesus et al (2005), valores em torno de 63 a 85 células por grama de solo. Considerando os intervalos de confiança encontrados por estes autores e o encontrado neste trabalho, apenas o NMP de uma das áreas de floresta estudada por Pereira (2000) difere realmente do NMP de células de BNL encontradas por este trabalho e por Jesus et al. (2005).

Os baixos valores de BNL em floresta podem ser explicados por condições desfavoráveis à nodulação (Magalhães et al., 1982), devido às quais há relatos de que raramente encontram-se nódulos em floresta primária de terra firme (Bonetti et al., 1984; Magalhães et al., 1982; Moreira et al., 1992; Sylvester-Bradley et al., 1980) por este se tratar de um sistema em que a demanda de nitrogênio pode ser suprida por ciclagem e, devido a isso, não há estímulo a FBN por fatores limitantes do solo (Moreira et al., 1992; Moreira, 1995), pela presença de uma grande variedade de compostos secundários, muitos dos quais substâncias de defesa contra predadores e parasitas (Janzen, 1980), e pela presença de antagonistas (Handelsman & Brill, 1985; Pugashett et al., 1982; Vicent, 1970).

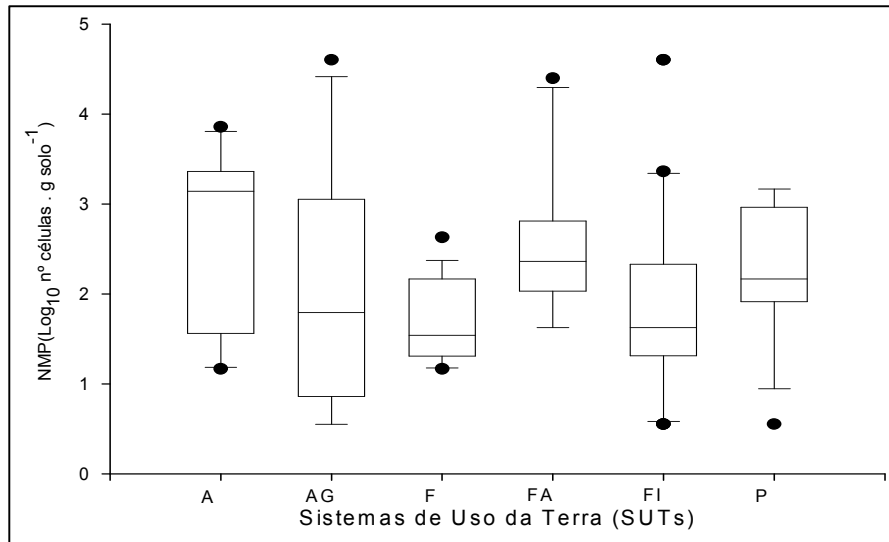


FIGURA 3 Número mais provável (NMP) de células de BNL e respectivos limites de confiança em Agrofloresta (A), Agricultura (AG), Floresta Tropical (F), Floresta Secundária Estágio Avançado de Regeneração (FA), Floresta Secundária Estágio Inicial de Regeneração (FI) e Pastagem (P) na Região do Alto Solimões – AM.

TABELA 2 Número mais provável (NMP), logaritmo do NMP (Log NMP), Número de Nódulos (NN) de BNL, Sequência do número de repetições que apresentaram nódulos em cada diluição (Sequência), em cada janela, ponto, dos sistemas de Uso da Terra (SUT) na Região do Alto Solimões – AM.

SUT	Janela	Ponto	Sequência	NMP	Log NMP	NN
A	2	17	3-3-2-2-0-0-0	2090,6	3,3203	19
A	2	20	3-0-0-0-0-0-0	23,025	1,3622	7
A	2	21	3-3-3-0-0-0-0	2305,5	3,3628	68
A	2	24	3-3-3-1-1-0-0	7187,8	3,8566	68
A	2	25	3-3-2-0-0-0-0	918,88	2,9633	23
A	2	17A	3-3-3-0-0-0-0	2305,5	3,3628	43
A	2	24A	3-3-3-0-0-0-0	2305,5	3,3628	63
A	5	66	2-1-0-0-0-0-0	14,662	1,1662	7
A	5	67	3-1-0-0-0-0-0	42,385	1,6272	10
A	5	67A	3-1-0-0-0-0-0	42,385	1,6272	9
AG	2	18	3-3-3-3-0-0-0	25000	4,3979	77
AG	2	19	3-3-3-2-0-0-0	2090,6	3,3203	39
AG	2	22	3-3-3-3-1-0-0	40000	4,6021	104
AG	2	26	3-2-0-0-0-0-0	91,781	1,9628	31
AG	2	27	3-2-3-3-0-0-0	524,02	2,7193	77
AG	2	28	3-3-2-0-0-0-0	918,88	2,9633	64
AG	2	32	3-3-0-0-0-0-0	230,16	2,362	31
AG	2	19A	3-3-3-2-0-0-0	2090,6	3,3203	70
AG	3	33	3-3-0-0-0-0-0	230,16	2,362	61
AG	3	44	1-1-1-0-0-0-0	11,168	1,048	5
AG	4	49	1-0-0-0-0-0-0	3,5668	0,5523	1
AG	4	50	1-0-0-0-0-0-0	3,5668	0,5523	1
AG	4	51	3-1-0-0-0-0-0	42,385	1,6272	4
AG	4	55	1-0-0-0-0-0-0	3,5668	0,5523	1
AG	4	58	3-1-0-0-0-0-0	42,385	1,6272	7
AG	4	59	2-1-1-0-0-0-0	20,433	1,3103	6
AG	5	72	1-0-0-0-0-0-0	3,5668	0,5523	1
AG	5	78	2-0-0-0-0-0-0	9,1626	0,962	2
F	1	3	1-1-2-0-0-0-0	15,09	1,1787	6
F	1	4	2-1-1-0-0-0-0	20,433	1,3103	6
F	1	5	2-1-1-0-0-0-0	20,433	1,3103	6
F	1	6	3-2-1-0-0-0-0	146,63	2,1662	6
F	1	7	2-1-1-0-0-0-0	20,433	1,3103	5
F	1	8	1-2-1-0-0-0-0	15,37	1,1867	6
F	1	9	2-1-1-0-0-0-0	20,433	1,3103	6
F	1	10	3-1-1-0-0-0-0	73,968	1,869	8
F	1	14	2-1-1-0-0-0-0	20,433	1,3103	7
F	1	15	3-1-1-0-0-0-0	73,968	1,869	10
F	1	16	2-1-0-0-0-0-0	14,662	1,1662	4
F	3	39	3-1-0-0-0-0-0	42,385	1,6272	9
F	3	40	3-3-1-0-0-0-0	424,54	2,6279	16
F	3	41	3-2-1-0-0-0-0	146,63	2,1662	8
F	4	57	3-2-1-1-0-0-0	204,38	2,3104	11
F	4	61	3-2-1-0-0-0-0	146,63	2,1662	7
F	4	62	2-2-1-1-0-0-0	34,573	1,5387	15

... continua ...

TABELA 2, Cont.

SUT	Janela	Ponto	Sequência	NMP	Log NMP	NN
FA	2	23	3-3-0-0-0-0-0	230,16	2,362	15
FA	3	37	3-3-1-0-0-0-0	424,54	2,6279	14
FA	4	60	3-1-0-0-0-0-0	42,385	1,6272	4
FA	5	77	3-1-0-0-0-0-0	42,385	1,6272	5
FA	5	70A	3-2-1-0-0-0-0	146,63	2,1662	8
FA	6	81	3-3-0-0-0-0-0	230,16	2,362	16
FA	6	88	3-3-3-0-0-0-0	2305,5	3,3628	17
FA	6	90	3-2-1-1-0-0-0	204,38	2,3104	18
FA	6	81A	3-3-3-3-0-0-0	25000	4,3979	50
FA	6	88A	3-3-0-0-0-0-0	230,16	2,362	13
FI	1	1	3-1-0-0-0-0-0	42,385	1,6272	8
FI	1	2	3-0-0-0-0-0-0	23,025	1,3622	7
FI	2	29	3-3-3-3-1-0-0	40000	4,6021	106
FI	2	30	3-3-3-3-1-0-0	40000	4,6021	104
FI	2	31	3-3-3-0-0-0-0	2305,5	3,3628	42
FI	3	34	3-2-2-0-0-0-0	210,18	2,3226	24
FI	3	35	3-3-1-1-0-0-0	738,23	2,8682	13
FI	3	36	3-3-0-0-0-0-0	230,16	2,362	19
FI	3	38	3-1-0-0-0-0-0	42,385	1,6272	1
FI	3	42	1-0-0-0-0-0-0	3,5668	0,5523	5
FI	4	52	3-0-0-0-0-0-0	23,025	1,3622	8
FI	4	53	1-1-1-0-0-0-0	11,168	1,048	5
FI	4	54	3-3-2-1-0-0-0	1465,7	3,166	14
FI	4	56	3-1-0-0-0-0-0	42,385	1,6272	8
FI	4	63	3-0-0-0-0-0-0	23,025	1,3622	6
FI	4	64	3-1-1-0-0-0-0	73,968	1,869	8
FI	5	65	3-1-1-0-0-0-0	73,968	1,869	8
FI	5	68	3-1-0-0-0-0-0	42,385	1,6272	7
FI	5	69	3-2-0-0-0-0-0	91,781	1,9628	9
FI	5	70	3-1-1-0-0-0-0	73,968	1,869	12
FI	5	71	3-3-1-0-0-0-0	424,54	2,6279	10
FI	5	73	1-0-0-0-0-0-0	3,5668	0,5523	1
FI	5	74	2-0-0-0-0-0-0	9,1626	0,962	3
FI	5	75	2-1-0-0-0-0-0	14,662	1,1662	5
FI	5	76	3-1-1-0-0-0-0	73,968	1,869	10
FI	5	79	1-1-0-0-0-0-0	7,3473	0,8661	2
FI	5	80	3-1-0-0-0-0-0	42,385	1,6272	9
FI	5	66A	3-0-0-0-0-0-0	23,025	1,3622	11
FI	5	68A	1-0-0-0-0-0-0	3,5668	0,5523	1
FI	5	71A	3-1-0-0-0-0-0	42,385	1,6272	5

... continua...

TABELA 2, Cont.

SUT	Janela	Ponto	Sequência	NMP	Log NMP	NN
P	6	82	1-0-0-0-0-0-0	3,5668	0,5523	1
P	6	83	3-3-2-1-0-0-0	1465,7	3,166	35
P	6	84	3-2-1-0-0-0-0	146,63	2,1662	11
P	6	85	3-2-0-0-0-0-0	91,781	1,9628	5
P	6	86	3-3-1-0-0-0-0	424,54	2,6279	13
P	6	87	3-2-1-0-0-0-0	146,63	2,1662	16
P	6	89	3-3-2-0-0-0-0	918,88	2,9633	10
P	6	91	3-2-1-0-0-0-0	146,63	2,1662	20
P	6	92	3-3-2-0-0-0-0	918,88	2,9633	30
P	6	93	3-1-1-0-0-0-0	73,968	1,869	13
P	6	94	3-3-1-0-0-0-0	424,54	2,6279	18
P	6	95	3-3-2-1-0-0-0	1465,7	3,166	29
P	6	96	2-2-2-0-0-0-0	34,685	1,5401	18

2.3.2 Eficiência das populações de BNL na promoção do crescimento de plantas de siratro

As médias de número de nódulos da diluição 10^{-1} (NN10), matéria seca da parte aérea (MSPA) e eficiência relativa (ER) induzidas pelas populações de BNL em cada SUT e a média dos SUTs encontram-se nas figuras 4, 5 e 6, respectivamente. Os maiores números de nódulos foram encontrados para agrofloresta e agricultura e os menores, para a floresta primária. Todas as populações de BNL induziram aumento no crescimento das plantas de siratro em relação à testemunha absoluta (testemunha sem nitrogênio e sem inoculação). Os acúmulos de MSPA induzidos pelas populações nativas não diferiram estatisticamente entre si, o mesmo observado para os dados de eficiência relativa, e o maior peso de matéria seca da parte aérea ocorreu nas plantas que receberam nitrogênio mineral. As populações nativas de BNL foram pouco eficientes na promoção do crescimento das plantas de siratro. Jesus et al. (2005) observaram populações ineficientes em promover o crescimento do siratro em solos da mesma região, nos SUT que estudaram (floresta, mandioca e pupunha).

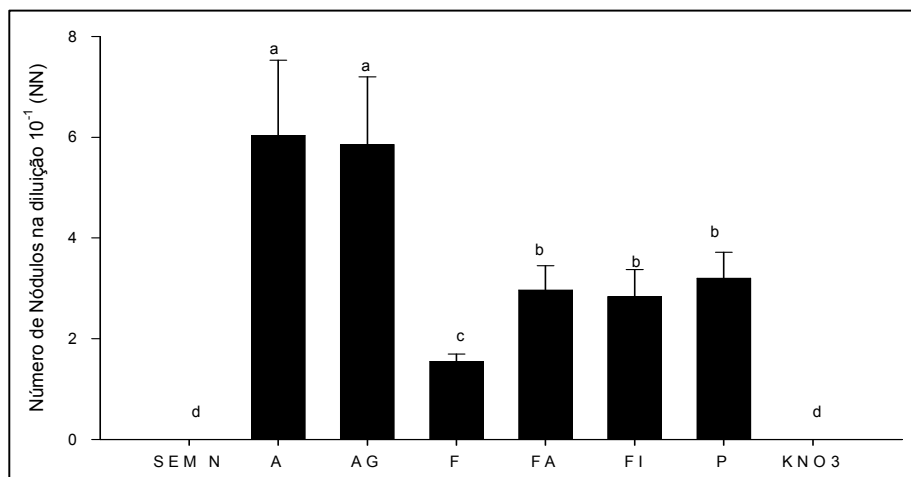


FIGURA 4 Número de Nódulos das plantas de siratro induzidas por populações de BNL da diluição 10⁻¹ dos solos dos sistemas de uso da terra (SUT) estudados. Letras iguais indicam que não houve diferença pelo teste de Scott-knott ao nível de 5% de probabilidade.

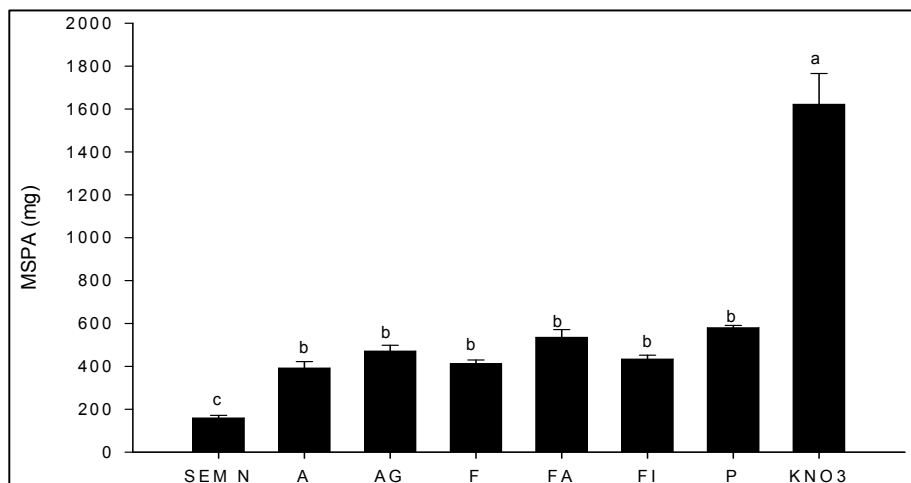


FIGURA 5 Matéria seca da parte aérea (MSPA) das plantas de siratro induzidas por populações de BNL dos sistemas de uso da terra (SUT) estudados. Letras iguais indicam que não houve diferença pelo teste de Scott-knott ao nível de 5% de probabilidade.

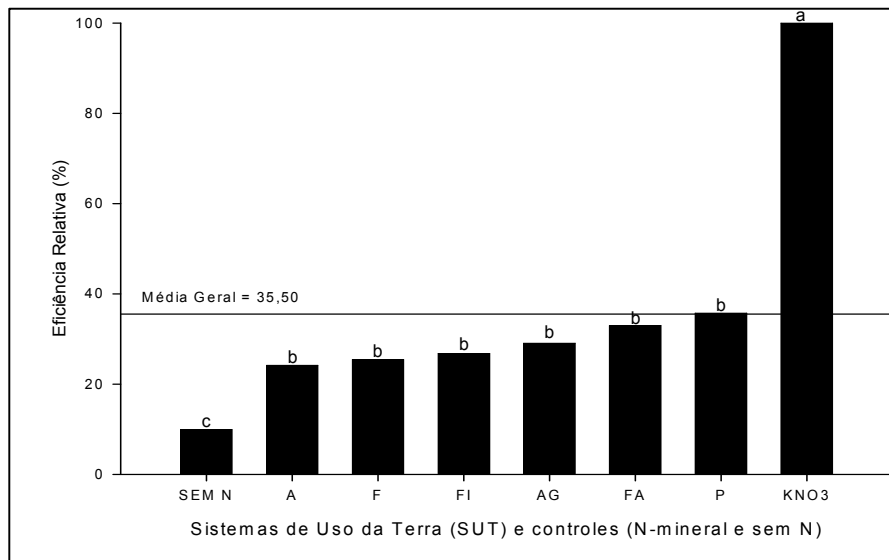


FIGURA 6 Eficiência Relativa das populações de BNL dos sistemas de uso da terra (SUT) estudados na promoção do crescimento do siratro. Letras iguais indicam que não houve diferença pelo teste de Scott-knott ao nível de 5% de probabilidade.

2.3.3 Análise Multivariada dos Dados

A MANOVA apresentou os testes de hipótese de igualdade dos vetores das médias dos SUTs significativos para todos os critérios: Wilks, Pillai's, Hotelling-Lawley e de Roy. Os coeficientes parciais de correlação da matriz SQP do erro significativos para as variáveis relacionadas ao crescimento e nodulação das plantas de siratro (MSPA, número de nódulos (NN) e de densidade de BNL (NMP) encontram-se na Tabela 3.

O NMP teve coeficiente significativo e positivo com cálcio, soma de bases, CTC a pH natural, CTC a pH 7 e com o número de nódulos, com o qual apresentou a maior correlação, 0,78, a qual está diretamente relacionada com a densidade de BNL no solo. O número de nódulos obteve coeficiente negativo com P e Zn e positivo com Ca, Al, HAl, tPHnat, CTC, B, argila e NMP. Finalmente, os coeficientes da matéria seca da parte aérea, apesar de serem baixos, tiveram coeficiente negativo com pH e V e positivo com Al, HAl, argila.

As correlações com os teores de cálcio no solo foram positivas para NMP e NN. Jesus (2004) também verificou correlação positiva entre a densidade de células de BNL e teores de cálcio no solo, indicando uma tendência de se encontrar maior densidade de BNL associadas a maiores teores de cálcio. Há muito já se sabe que o cálcio tem efeito sobre a nodulação de leguminosas. Andrade et al. (2002) mostraram que a densidade e a diversidade de BNL tendem a aumentar com o aumento nos teores de cálcio em solo do Paraná cultivados com feijão.

Estudos verificaram que altos teores de alumínio e baixos valores de pH estão correlacionados com baixa densidade e diversidade de BNL (Andrade et al., 2002; Bala et al. 2003). Em nosso estudo, essas condições não afetaram as populações de BNL, visto que os teores de alumínio tiveram correlação positiva para as variáveis relacionadas ao crescimento e nodulação das plantas de siratro

(MSPA, NN) e à densidade de BNL (NMP). Estudo em alguns solos da Amazônia com altos teores de alumínio extraível verificou que as plantas não apresentavam sintomas de toxidez nem queda de produtividade (Gamma & Kiehl, 1999) porque, nestes solos, o teor de alumínio extraível encontrado não tem correlação com o alumínio disponível na solução do solo (Marques et al., 2002; Schroth et al., 2000).

O dendrograma utilizando distância de Mahalanobis de todas as variáveis relacionadas ao crescimento (MSPA) e nodulação (NN) das plantas de siratro e densidade de BNL (NMP) e atributos edáficos (P, K, Ca, Mg, H+Al, Al, m, T, CTC, P-rem, Zn, Fe, B, SB, t, Mn, Cu, S, matéria orgânica, areia e argila) mostrou que a maior distância (0,607129) ocorreu entre floresta primária e pastagem e a menor distância (0,086979), entre A e AG; e mostrou a pastagem separada dos demais SUTs e dois grupos formados, um com A e AG e o outro com as florestas; o mesmo comportamento foi observado quando se construiu um dendrograma apenas com os dados de MSPA, NN e NMP (Figuras 7 e 8 e Tabelas 4 e 5).

TABELA 3 Coeficientes parciais de correlação da matriz SQP do erro/probabilidade > r, número mais provável (NMP) de células de BNL, Número de Nódulos (NN) e Matéria seca da parte aérea (MSPA), atributos edáficos (P, K, Ca, Mg, H+Al, Al, m, t, CTC, Prem, Zn, B, V, argila).

NMP		
Ca	0,249718	0,0158
SB	0,210446	0,0429
T	0,302959	0,0032
T	0,219661	0,0344
NN	0,776077	<,0001
NN10	0,410397	<,0001
NN		
P	-0,20734	0,0461
Ca	0,210142	0,0432
Al	0,226634	0,0289
HAl	0,290576	0,0047
SB	0,1878	0,0714
T	0,38655	0,0001
t	0,408303	<,0001
Zn	-0,21001	0,0433
B	0,279358	0,0067
Argila	0,255919	0,0133
NMP	0,776077	<,0001
NN10	0,811623	<,0001
MSPA		
pH	-0,21095	0,0424
Al	0,21126	0,0421
HAl	0,234481	0,0237
v	-0,20992	0,0434
Argila	0,228555	0,0276

pH em água; P fósforo em mg dm^{-3} ; Ca cálcio em $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; Al alumínio em $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; H + Al hidrogênio + alumínio em $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; SB soma de bases trocáveis em $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; t CTC efetiva em $\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$; T CTC em pH 7; V saturação de bases da CTC a pH 7; m saturação de Al da CTC efetiva; em porcentagem (%); Zn zinco em mg dm^{-3} ; B boro em mg dm^{-3} ; e argila em porcentagem.

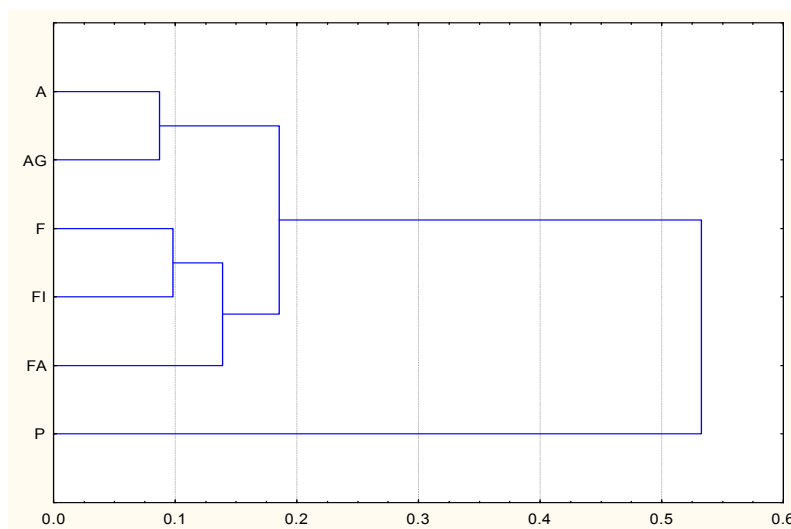


FIGURA 7 Dendrograma de similaridade/dissimilaridade utilizando a distâncias de Mahalanobis entre os sistemas de uso da terra (SUT) agrofloresta (A), agricultura (AG), floresta primária (F), florestas secundárias estágios inicial e avançado de regeneração (FA e FI) e pastagem (P) dos atributos edáficos (P, K, Ca, Mg, H+Al, Al, m, T, CTC, P-rem, Zn, Fe, B, SB, t, Mn, Cu, S, matéria orgânica, areia, argila) e das variáveis relacionadas ao crescimento e nodulação das plantas de siratro (MSPA, número de nódulos (NN)) e de densidade de BNL (NMP).

TABELA 4 Matriz das distâncias de Mahalanobis entre os sistemas de uso da terra (SUT) agrofloresta (A), agricultura (AG), floresta primária (F), florestas secundárias estágios inicial e avançado de regeneração (FA e FI) e pastagem (P) dos atributos edáficos (P, K, Ca, Mg, H+Al, Al, m, T, CTC, P-rem, Zn, Fe, B, SB, t, Mn, Cu, S, matéria orgânica, areia, argila) e das variáveis relacionadas ao crescimento e nodulação das plantas de siratro (MSPA, número de nódulos (NN)) e de densidade de BNL (NMP).

SUT	A	AG	F	FA	FI	P
A	0	0,086979	0,217137	0,17382	0,125962	0,532823
AG	0,086979	0	0,283499	0,176781	0,134405	0,537405
F	0,217137	0,283499	0	0,129789	0,098026	0,607129
FA	0,17382	0,176781	0,129789	0	0,147682	0,47037
FI	0,125962	0,134405	0,098026	0,147682	0	0,515904
P	0,532823	0,537405	0,607129	0,47037	0,515904	0

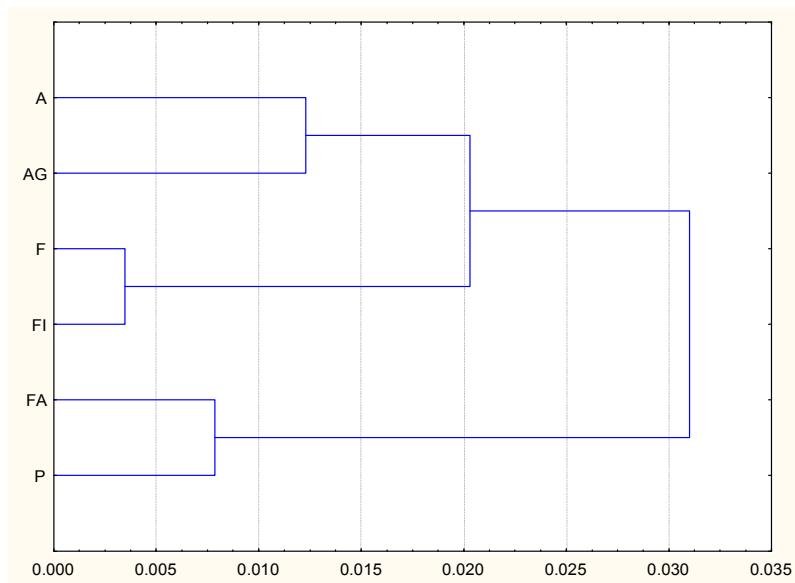


FIGURA 8 Dendrograma de similaridade/dissimilaridade utilizando as distâncias de Mahalanobis entre os sistemas de uso da terra (SUT) agrofloresta (A), agricultura (AG), floresta primária (F), florestas secundárias estágios inicial e avançado de regeneração (FA e FI) e pastagem (P) das variáveis relacionadas ao crescimento e nodulação das plantas de siratro (MSPA, número de nódulos (NN)) e de densidade de BNL (NMP).

TABELA 5 Matriz das distâncias de Mahalanobis entre os sistemas de uso da terra (SUT) agrofloresta (A), agricultura (AG), floresta primária (F), florestas secundárias estágios inicial e avançado de regeneração (FA e FI) e pastagem (P) das variáveis relacionadas ao crescimento e nodulação das plantas de siratro (MSPA, número de nódulos (NN)) e densidade de BNL (NMP).

SUT	A	AG	F	FA	FI	P
A	0	0,012288	0,021162	0,039188	0,020486	0,05138
AG	0,012288	0	0,025049	0,015341	0,014517	0,024135
F	0,021162	0,025049	0	0,021471	0,003475	0,044776
FA	0,039188	0,015341	0,021471	0	0,013944	0,007856
FI	0,020486	0,014517	0,003475	0,013944	0	0,03775
P	0,05138	0,024135	0,044776	0,007856	0,03775	0

As variáveis mais correlacionadas com a primeira variável canônica foram a MSPA, seguida do NMP, com índices de correlação de -0,8287 e 0,4093; respectivamente; para a segunda, as características relevantes para ordenação foram NN e NMP, com índices de correlação 0,9802 e 0,6799 (Tabela 7). Os valores dos vetores foram utilizados para o cálculo dos “scores” de cada SUT para cada variável estudada e estes foram utilizados para plotar o gráfico da figura 25.

TABELA 6 Correlação entre as variáveis independentes com cada variável

	Can1	Can2
NMP ⁽¹⁾	0,4093	0,6799
NN ⁽²⁾	0,0485	0,9802
MSPA ⁽³⁾	-0,8287	0,0922

⁽¹⁾ Número mais provável (NMP). ⁽²⁾ Número de nódulos (NN). ⁽³⁾ e Matéria seca da parte aérea (MSPA).

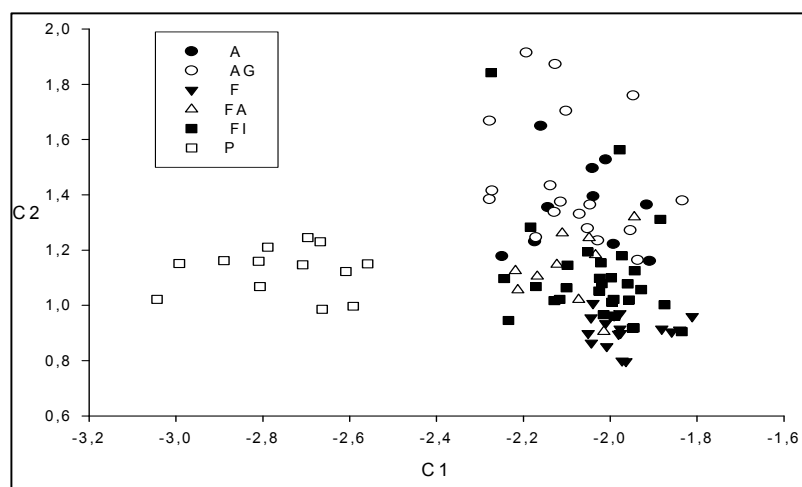


FIGURA 9 Diagrama de ordenação das variáveis de crescimento do siratro (MSPA, NN) e de densidade de BNL (NMP) relacionadas com os atributos edáficos. SUTs analisados: FI: A: agrofloresta, AG: agricultura, F: floresta primária, FA: floresta secundária em estágio avançado de regeneração; FI: floresta secundária em estágio inicial de regeneração e P: pastagem.

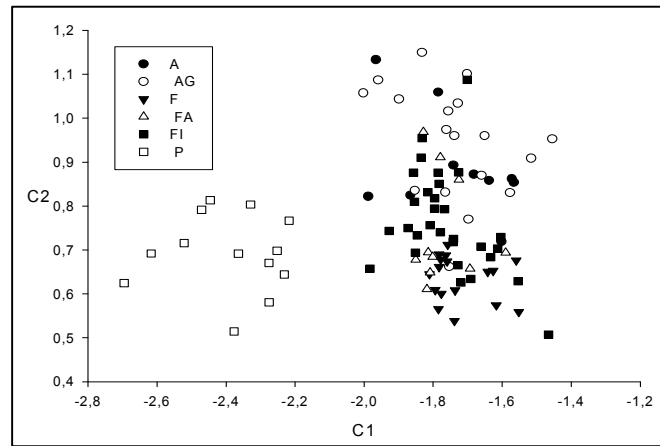


FIGURA 10 Diagrama de ordenação dos atributos edáficos. SUTs analisados: FI: A: agrofloresta, AG: agricultura, F: floresta primária, FA: floresta secundária em estágio avançado de regeneração; FI: floresta secundária em estágio inicial de regeneração e P: pastagem.

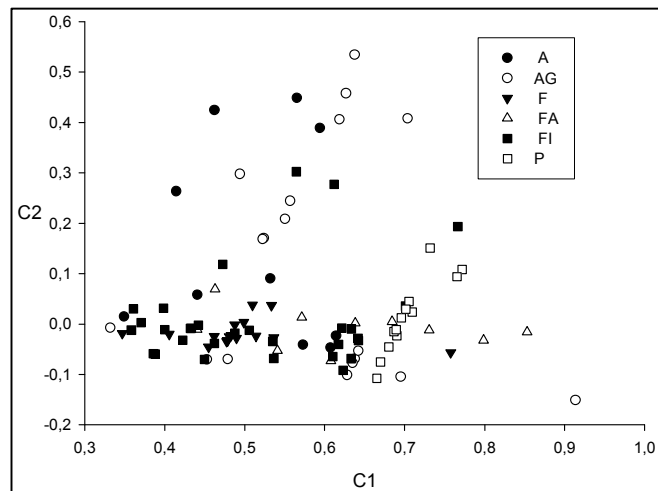


FIGURA 11 Diagrama de ordenação das variáveis de crescimento do siratro (MSPA, NN) e de densidade de BNL (NMP). SUTs analisados: FI: A: agrofloresta, AG: agricultura, F: floresta primária, FA: floresta secundária em estágio avançado de regeneração; FI: floresta secundária em estágio inicial de regeneração e P: pastagem.

O resultado dos diagramas de ordenação das variáveis confirmou os resultados encontrados pela análise de agrupamento, pois separou a pastagem dos demais SUTS, agrupou as florestas e a agrofloresta com a agricultura e mostrou como os atributos edáficos influenciam.

De modo geral, observa-se um agrupamento da pastagem diferenciando-se dos demais sistemas de uso, uma discriminação sutil, o que pode ser indicativo de uma certa homogeneidade entre as florestas e a agrofloresta com a agricultura. Contudo, alguns pontos amostrados dos sistemas de uso floresta primária e floresta secundária em estágio avançado de regeneração ficaram correlacionados, o que ilustra um comportamento similar entre as variáveis consideradas. Dentre estes sistemas, a floresta secundária em estágio avançado de regeneração, após ter sido cultivada no passado, apresentou os atributos químicos dos solos, em geral, mais próximos aos dos solos da floresta primária (Nóbrega et al., em preparação). A vegetação atual dos solos, caracterizada por Fidalgo et al. (2005), expressa também a maior proximidade com floresta primária.

Nas áreas de agricultura que pertencem à comunidade Nova Aliança, os solos eram cultivados por ciclos de intensidade média, com pousios de dois a cinco anos. Os pontos 22, 29 e 30, localizados na comunidade Guanabara II, onde o cultivo foi classificado como itinerante com pousio longo (de 4 a 5 anos), o que envolve o abandono de áreas cultivadas, permitindo a regeneração natural (Fidalgo et al., 2005), apresentaram maior densidade de BNL. Isto possivelmente favoreceu o aumento das populações de bactérias que nodulam leguminosas, uma vez que o N é de fundamental importância para a nutrição das plantas na sucessão vegetal, havendo, assim, maior estímulo para o estabelecimento das associações e simbioses entre plantas e bactérias fixadoras de N e pressão seletiva para estirpes eficientes.

A diversidade vegetal na agrofloresta, observada por Fidalgo et al. (2005), pode estimular a sobrevivência e multiplicação das populações de bactérias fixadoras de N no solo, uma vez que muitas plantas têm habilidade para modificar o pH rizosférico, favorecendo maior disponibilidade de nutrientes (Muofhe & Dakora, 2000) e excreção de ácidos orgânicos para solubilização de minerais, e outras podem tanto estimular quanto inibir determinados grupos de microrganismos, favorecendo ou desfavorecendo a ocorrência e/ou competição entre eles (Hartwing et al., 1991; Siqueira et al., 1991; Tsai & Phillips, 1991).

2.3.4 Correlação canônica entre atributos edáficos e variáveis relacionadas ao crescimento e nodulação da planta

O primeiro par canônico U_1 e V_1 , dado por $r_{U_1, V_1} = 0,7452$, e o segundo, U_2 e V_2 , dado por $r_{U_2, V_2} = 0,5991$, foram produzidos através das estimativas das variáveis canônicas dos grupos de variáveis que representam o crescimento e nodulação da plantas U_1 (Tabela 8 a) e os atributos edáficos V_1 (Tabela 8 b).

Entre as variáveis referentes ao crescimento e nodulação do siratro, o NN apresentou a maior importância, que foi medida pela sua correlação (0,9508) com a variável canônica V_1 , seguida da MDNN (0,7598) (Tabela 8a).

Para as variáveis referentes aos atributos edáficos, a CTC pH 7, com 0,6249, e a CTC pH natural, com 0,4907, apresentaram as maiores correlações com a variável canônica W_1 . Já os demais atributos edáficos analisados tiveram menor importância, ou seja, menor correlação com a variável canônica (Tabela 8b).

TABELA 7 Correlação das variáveis canônicas referentes relacionadas ao crescimento e nodulação das plantas de siratro (MSPA, NN, média do número de nódulos (MDNN)) e de densidade de BNL (NMP e LogNMP) (U_1) (a) e dos atributos edáficos (V_1) (b).

(a)	U1	U2	U3	U4
NMP	0.6915	-0.3424	-0.5783	0.2648
NN	0.9508	-0.1604	0.0114	0.265
MDNN	0.7598	-0.5661	0.2124	-0.2391
MSPA	0.2934	0.372	-0.455	-0.7541

(b)	V1	V2	V3	V4
pH	-0.3204	-0.2684	-0.3079	0.4562
P	-0.329	0.1334	0.0194	0.3219
K	-0.1615	0.407	0.0761	0.2041
Ca	0.1857	-0.236	-0.1619	0.4794
Mg	0.1936	0.1117	-0.1001	0.4091
Al	0.4051	0.1853	0.1739	-0.3632
HA1	0.5028	0.2198	0.225	-0.3818
SB	0.1655	-0.1345	-0.1306	0.4913
tPHnat	0.4903	-0.0241	-0.0269	0.3142
CTC	0.6249	0.1791	0.1599	-0.1476
V	-0.3222	-0.1746	-0.2681	0.486
m	0.2595	0.1706	0.0997	-0.3409
MO	-0.1288	0.124	-0.0984	0.0226
PRE	-0.3446	-0.1587	-0.3629	0.352
Zn	-0.2566	0.2023	-0.1608	-0.059
Fe	-0.0169	-0.0164	0.0209	-0.0219
Mn	0.1078	0.0535	-0.2395	0.1533
Cu	-0.2709	-0.2805	0.223	-0.1556
B	0.3149	-0.1314	0.209	0.3668
S	0.0911	0.4104	0.1889	0.3619
areia	-0.2322	0.0852	0.0916	0.3106
silte	-0.1929	-0.1415	-0.1081	0.0213
argila	0.4271	0.0177	-0.0172	-0.3768

Considerando a correlação entre as variáveis referentes ao crescimento e nodulação da plantas e as que representam os atributos edáficos (U_i x atributos edáficos), verifica-se que o NN, com 0,7085, foi a variável com maior correlação com V_1 (Tabela 9), e que a CTC a pH 7, entre os atributos químicos, apresentou a maior correlação com a variável canônica U_1 (0,4657) (Tabela 10). Os demais atributos apresentaram correlações menores.

TABELA 8 Correlação das variáveis referentes ao crescimento e nodulação de siratro e atributos edáficos (W_1).

	W1	W2	W3	W4
NMP	0.5153	-0.2052	-0.301	0.1186
NN	0.7085	-0.0961	0.006	0.1186
MDNN	0.5662	-0.3392	0.1105	-0.107
MSPA	0.2186	0.2229	-0.2368	-0.3375

TABELA 9 Correlação dos atributos edáficos variáveis referentes ao crescimento e nodulação do siratro (V_1).

	V1	V2	V3	V4
pH	-0.2388	-0.1608	-0.1602	0.2042
P	-0.2452	0.0799	0.0101	0.1441
K	-0.1204	0.2439	0.0396	0.0913
Ca	0.1384	-0.1414	-0.0843	0.2146
Mg	0.1443	0.0669	-0.0521	0.1831
Al	0.3019	0.111	0.0905	-0.1626
HA1	0.3747	0.1317	0.1171	-0.1709
SB	0.1233	-0.0806	-0.068	0.2199
tPHnat	0.3654	-0.0144	-0.014	0.1407
CTC	0.4657	0.1073	0.0832	-0.0661
V	-0.2401	-0.1046	-0.1395	0.2176
m	0.1933	0.1022	0.0519	-0.1526
MO	-0.096	0.0743	-0.0512	0.0101

...continua ...

TABELA 9, Cont.

PRE	-0.2568	-0.0951	-0.1889	0.1575
Zn	-0.1912	0.1212	-0.0837	-0.0264
Fe	-0.0126	-0.0098	0.0109	-0.0098
Mn	0.0803	0.032	-0.1247	0.0686
Cu	-0.2019	-0.1681	0.1161	-0.0697
B	0.2347	-0.0787	0.1088	0.1642
S	0.0679	0.2459	0.0983	0.162
areia	-0.173	0.051	0.0477	0.139
silte	-0.1437	-0.0848	-0.0563	0.0095
argila	0.3182	0.0106	-0.0089	-0.1687

Devido ao estímulo por parte das plantas cultivadas (Venkateswarlu et al., 1997), a exploração do solo pelas raízes e a exudação de compostos orgânicos na rizosfera podem controlar parâmetros abióticos do solo, como concentração de nutrientes e umidade, que podem modificar indiretamente a atividade e a diversidade microbiana (Paul & Clark, 1989), assim como serem fonte de carbono e energia, estimulando as populações de organismos. No entanto, apesar de as populações de bactéria fixadoras de nitrogênio nodulíferas de siratro estarem presentes em solos sob sistemas de SUT no Alto Rio Solimões, Amazônia, e de alguns pontos apresentarem alta densidade de BNL, não houve diferença entre as áreas estudadas, pois houve sobreposição do intervalo de confiança.

As populações de bactéria fixadoras de nitrogênio nodulíferas de siratro, em solos sob diferentes SUT, foram, em média, pouco eficientes na promoção do crescimento das plantas de siratro. Pereira (2000) atribuiu a baixa eficiência das populações nativas de BNL de regiões da Amazônia às condições químicas estressantes, as quais limitam a capacidade saprofíticas de populações de rizóbios e levam à perda da eficiência simbiótica (Denton et al., 2000; Graham, 1992). Nóbrega (2006), em estudo com solos da mesma região, também submetidos a diferentes sistemas de uso, identificou que os principais fatores

limitantes ao cultivo foram baixos teores de fósforo e de boro e altos valores de acidez ativa.

2.4 CONCLUSÕES

Populações de bactéria fixadoras de nitrogênio nodulíferas de siratro estão presentes em solos sob diferentes SUT no Alto Rio Solimões, Amazônia, com densidades que não diferem.

As populações de bactéria fixadoras de nitrogênio nodulíferas de siratro, em solos sob diferentes SUT, foram, em média, pouco eficientes na promoção do crescimento das plantas de siratro.

A pastagem formou um grupo distinto dos demais SUTs, um grupo da floresta primária com as florestas secundária estágio avançado e inicial de regeneração e um da agrofloresta com a agricultura, através dos atributos edáficos e das variáveis de crescimento e nodulação do siratro e densidade de BNL analisadas conjuntamente.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, D. S.; MURPHY, P. J.; GILLER, K. E. The diversity of *Phaseolus*-nodulating rhizobial populations is altered by limiting of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brasil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 1, p. 4025-4034, Jan. 2002

BALA, A.; MURPHY, P.; GILLER, K. E. Occurrence and genetic diversity of rhizobia noduling *Sesbania sesban* in African soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 34, n. 11, p. 1759-1768, Nov. 2002.

BENNETT, J. E.; WOOMER, P. L.; YOST, R. S. **User manual for MPNES most-probable-number enumeration system ver. 1. 0**. NifTAL project and University of Hawaii, 1990.

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**, Hangeue, v. 46, p. 3-16, 1971. Supplement 1.

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

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

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

COUTINHO, H. L. C.; OLIVEIRA, V. M.; LOVATO, A.; MAIA, A. H. N.; MANFIO, G. P. Evaluation of the diversity of rhizobia em Brazilian agricultural soils cultivated with soybeans. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 13, n. 2, p. 159-167, Oct. 1999.

DENTON, M. D.; CONVENTRY, D. R.; BELLOTTI, W. D.; HOWIESON, J. G. Distribution, abundance and symbiotic effectiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. Trifolii from alkaline pasture soils in South Australia. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Collingwood, v. 40, n. 1, p. 25-35, Jan. 2000

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

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

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

GRAHAM, P. H. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, n. 5, p. 475-484, May 1992.

HANDELSMAN, J.; BRILL, W. J. *Erwinia herbicola* isolates from alfafa plants may play a role in nodulation of alfafa by *Rhizobium meliloti* **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 49,n. 4,p. 818-821, Apr. 1985.

HARTWING, U. A.; JOSEPH, C. M.; PHILLIPS, D. A. Flavonoids release naturally from alfafa seeds enhance growth of *Rhizobium meliloti*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 95, n. 3, p. 797-803, Mar. 1991.

JANZEN, D. H. **Ecologia vegetal nos trópicos** São Paulo: EPU, Editora da Universidade de são Paulo, 1980. 79 p.

JESEN, H. L. Nitrogen fixation in leguminous plants. I General characters of root-nodule bactéria isolated from species of *Medicago* and *Trifolium* in Australia. **Proceddings of the Linnean Society of New South Wales**, Sidney, v. 66, p. 98-1058, 1942.

JESUS, E. da C.; FLORENTINO, L. A.; RODRIGUES, M. I. D.; OLIVEIRA, M. S. de; MOREIRA, F. M. de S. 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

KAHINDI, J. H. P.; WOOMER, P.; GEORGE, T.; MOREIRA, F. M. DE S.; KARANJA, N. K.; GILLER, K. E. Agricultural intensification, soil biodiversity and ecosystem function in the tropics: the role of nitrogen-fixing-bacteria. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 6, n. 1, p. 55-76, Aug. 1997.

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

MARQUES, J. J.; TEIXEIRA, W. G.; SCHULZE, D. G.; CURTI, N. Mineralogy of soils with unusually high exchangeable AL from the western Amazon Region. **Clay Minerals**, London, v. 37, n. 4, p. 651-661, Dec. 2002.

MOREIRA; F. M. S.; BIGNELL, D. E. **Standard methods for assessment of soil biodiversity in the context of land-use practice**. Nairobi, Quênia, 2006. (no prelo).

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

MOREIRA, F. M. S. et al. Biodiversidade de ecossistemas naturais: Projeto Conservação e Manejo Sustentável da Biodiversidade do Solo – BiosBrasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO SOLOS: sustentabilidade e qualidade ambiental, 30., 2005, Recife, PE. **Solos: sustentabilidade e qualidade ambiental**. Viçosa: SBCS, 2005. p. 1-41. Disponível em: <<http://www.biosbrasil.ufla.br/>>. Acesso em: 2007.

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

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. AND BRUSSAARD, L. **SOIL Biodiversity in Amazonian and Other Brazilian Ecosystems**. CABI Publishing, 2005 280 p.

MUOFHE, M. I.; DAKORA, F. D. Modification of rhizosphere pH by the symbiotic legume *Aspalathus linearis* growing in a sandy acidit soil. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 27, n. 12, p. 1169-1173, 2000.

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. 188 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PAUL, E. A.; CLARK, F. E. **Soil microbiology and biochemistry**. San Diego, CA: Academic, 1989. 275 p.

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

PUGASHETTI, B. K.; ANGLE, J. S.; WAGNER, G. H. Soils microorganisms antagonist towards *Rhizobium japonicum*, **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 45-49, Jan. 1982.

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

SIQUEIRA, J. O.; SAFIR, G. R.; NAIR, M. G. Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and growth of white clover by flavonoid compounds. **New Phytologist**, Cambridge, v. 118, n. 1, p. 87-93, May 1991.

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

TSAI, S. M. PHILLIPS, D. A. Flavonoids released naturally from alfafa promote development of symbiotic *Glomus* spores in vitro. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 5, p. 1485-1488, May 1991.

VENKATESWARLU, B.; HARI, K.; KATYAL, J. C. Influence of soil and crop factors on the native rhizobial populations in soils under dryland farming. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 7, n. 1, p. 1-10, Dec. 1997.

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

WOOMER, P. L. Most Probable Number Counts. In: WEAVER, R. W.; ANGLE, S.; BOTTOMLEY, P.; BEZDICEK, D.; SMITH, S.; TABATABAI, A.; WOLLUM, A. (Ed.). **Methods of soil analysis. Part 2. Microbiological and biochemical properties.** Madison: Soil Science Society of America, 1994. p. 59-79. (SSSA Book Series, 5).

CAPÍTULO 3

RESUMO

LIMA, A.S. Diversidade de bactérias que podem fixar nitrogênio em simbiose com siratro (*Macrotidium atropurpureum*) de solos sob diferentes usos na Amazônia. In: _____. **Densidade, Eficiência e Diversidade de Bactérias Fixadoras de N₂ que Nodulam o Siratro (*Macrotidium atropurpureum*) de Solos sob Diferentes Usos na Amazônia Ocidental**. 2006. Cap.3, 167p. Tese (Doutorado em Ciência do Solos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Com o objetivo de avaliar a diversidade de bactérias que podem fixar nitrogênio em simbiose com siratro (*Macrotidium atropurpureum*) de solos sob diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia, coletaram-se 98 amostras de solo na camada de 0-20 cm, distribuídas nos sistemas de uso da terra (SUTs) pastagem (P), agricultura (AG), agrofloresta (A), floresta secundária em estágio inicial de regeneração (FI), floresta secundária em estágio avançado de regeneração (FA) e floresta primária (FP), localizados no Alto Rio Solimões, AM. Instalou-se o experimento para a captura das bactérias nativas em sacos plásticos, no Laboratório de Microbiologia do Solo/DCS/UFLA, de abril a maio de 2004, utilizando como planta-isca o siratro. Foram obtidos 1890 isolados em cultura pura, sendo 474 isolados obtidos na FI, 547 na AG, 354 na A, 219 na P, 160 isolados na FA e 136 isolados na F. Combinando as características de modificação do pH do meio e tempo de aparecimento das colônias, foram encontrados 5 tipos culturais principais nos diferentes SUTs. Dos 1890 isolados de BNL obtidos, 790 apresentaram crescimento rápido e acidificaram; 596 apresentaram crescimento rápido e não modificaram o pH do meio; 125 apresentaram crescimento intermediário e não modificaram o pH do meio; 109 apresentaram crescimento intermediário e alcalinizaram o pH do meio; e 270 tiveram crescimento lento e alcalinizaram o meio. Através dos dendrogramas construídos com base nas 20 características culturais e analisando os grupos formados a 87% de similaridade, obteve-se a riqueza das espécies observada e estimada através do índice Chao 2. Pôde-se observar uma grande diversidade baseada nas análises fenotípicas por todas as características culturais, inclusive entre os isolados dos SUTs manejados. Os SUTs alteraram a riqueza das populações de bactérias que nodulam siratro, uma vez que os sistemas submetidos ao cultivo e com maior diversidade vegetal tiveram maior riqueza, observada e estimada na seguinte ordem: A > AG > FI > P > FA > F. As análises de seqüenciamento e filogenética mostraram que o siratro foi capaz de capturar bactérias de vários gêneros e mostrou uma grande diversidade entre os isolados.

¹Orientadora: Fátima Maria de Souza Moreira – UFLA.

ABSTRACT

LIMA, A.S. Diversity of nitrogen-fixing bacteria able to nodulate siratro from soils under different uses in Amazon In: _____. **Density, efficiency and diversity of nitrogen-fixing bacteria nodulating siratro (*Macropitium atropurpureum*) from soils under different uses in Western Amazon region.** 2006. Chap. 3, 167p. Thesis (Doctorate in Soil Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Geraais, Brazil.¹

Aiming to evaluate diversity of nitrogen-fixing bacteria able to nodulate siratro (NFBNS) species, 98 composed soil samples were collected in 0-20 cm depth, distributed in the land use systems (LUSs): pasture (P), agriculture (AG), agroforestry (A), Young secondary forest (FI), old secondary forest (FA) and pristine forest (F) located in Upper Solimões river region, AM. No one of these areas received introduction of exotic (NFBNS), by use of inoculants. Experiments to trap (NFBNS), were carried out in plastic pouches, at Laboratório de Microbiologia do Solo/DCS/UFLA, from April to May, 2004, by using the promiscuous species siratro as trap host. A total of 1891 isolates were gotten, distributed among LUS as follows: 474 isolates from FI, 547 from AG, 354 from A, 219 from P, 160 from FA, and 136 from F. By the combination of pH characteristics and time of appearance of isolated colonies, from the 1891 isolates of LBN, 790 presented fast growth and were acidifiers, 596 presented fast growth and did not change medium pH; 125 presented intermediary growth and did not change medium pH; 109 presented intermediary growth were alcalinizers; and 270 presented slow growth and were alcalinizers. A dendrogram were constructed based on 20 cultural characteristics and groups formed at 87% similarity analyzed. Observed and estimated species richnesses (Chao 2 index) and acumulation curves were calculated. The LUSs changed the population species richness of BNL, and those with highest plant species diversity were those with highest species diversity (estimated and observed) in the following order: A > AG > FI > P > FA > F. The sequeces and phylogenetic analyses showed that siratro was able to catch different bacteria genera and presented a high diversity among isolates.

¹Guidance Committee : Fátima Maria de Souza Moreira – UFLA.

3.1 INTRODUÇÃO

O solo pode ser considerado um dos habitats mais complexos, heterogêneos e dinâmicos quando comparado aos demais. Devido a estas características peculiares, serve de meio para uma grande diversidade de organismos que são capazes de conviver em equilíbrio dinâmico. Estes organismos muitas vezes estabelecem relações de sobrevivência, que podem ser tanto negativas quanto positivas, limitando as explosões populacionais e estimulando a diversidade (Moreira & Siqueira, 2006).

Entre os procariotos edáficos estão as comunidades bacterianas, que são altamente diversas (Torsvik & Ovreas, 2002), havendo uma riqueza de informações genéticas desconhecidas (Borneman & Triplett, 1997), e podem sofrer mudanças, as quais incluem rearranjos extensivos das seqüências de nucleotídeos, duplicação e deleção de genes individuais, ou mesmo de grandes partes do genoma e transferência de partes de um cromossomo para o outro, entre outras (Alberts, 1999). Além disso, os ambientes edáficos são extensos e diversos e apenas 1 % dos microrganismos que neles habitam são observados ao microscópio, cultivados e caracterizados (Moreira & Siqueira, 2006).

O equilíbrio dinâmico das populações na comunidade microbiana dos solos também pode sofrer modificações influenciadas pelas interações benéficas e/ou antagônicas dos microrganismos, determinando a composição qualitativa e quantitativa da comunidade (Raverkar & Konde, 1988). Práticas agrícolas, como a calagem, têm resultado em alteração na composição das populações na comunidade microbiana, principalmente de populações de rizóbios (Andrade et al., 2002). O conhecimento do equilíbrio dinâmico e dos efeitos das práticas agrícolas sobre as populações na comunidade bacteriana é importante devido às inúmeras funções que esses microrganismos desempenham (Pereira et al., 1996).

Os microrganismos, pela sua diversidade e dinâmica, e por estarem continuamente mudando e se adaptando às alterações ambientais, representam indicadores sensíveis às mudanças no solo, oriundas de modificações no seu manejo (Kennedy & Papendick, 1995) e também do tipo de cobertura vegetal (Prasad et al., 1994). A perda da biodiversidade pode ocasionar a perda de estirpes inoculantes potenciais, assim como a diminuição do potencial de fixação de nitrogênio dos solos, prejudicando o desenvolvimento de práticas de recuperação e conservação dos solos (Pereira, 2000).

No processo de seleção de estirpes é fundamental que se tenha variabilidade do microssimbionte para que se aumente a probabilidade de sucesso da simbiose hospedeiro-rizóbio. Assim, a grande diversidade, inclusive de leguminosas, encontrada nos vários sistemas de uso da terra (capoeira, pastagem tradicional, sistema agroflorestal, floresta e monocultura) da Amazônia, pode abrigar também uma grande variabilidade de rizóbios, adaptados a condições de baixos valores de pH e temperaturas elevadas (predominantes nos solos brasileiros), que inclui estirpes de alta eficiência simbiótica (Moreira et al., 1993; Pereira, 2000).

O conhecimento sobre a biodiversidade presente nos diferentes ecossistemas é a base do progresso biotecnológico esperado em diferentes áreas da ciência aplicada e pode fornecer informações importantes sobre a ecologia destes microrganismos.

Neste contexto, o objetivo específico deste trabalho foi avaliar a diversidade fenotípica e genotípica de bactérias que podem fixar nitrogênio em simbiose com siratro (*Macroptilium atropurpureum*) de solos sob diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho faz parte do projeto “*Conservation and Sustainable Management of Below-Ground Biodiversity*”, financiado pelo GEF e implementado pelo “*United Nations Environment Programme (UNEP)*”, que está sendo executado em sete países, Brasil, Costa do Marfim, Índia, Indonésia, Kênia, México e Uganda, cujo objetivo é despertar a consciência e a compreensão sobre a biodiversidade do solo, importante para a produção agrícola sustentada em áreas tropicais, através da demonstração de métodos para a conservação e manejo sustentado (Projeto GF/2715-02).

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

Na primeira quinzena de março de 2004 (período úmido e com maior intensidade pluviométrica), coletaram-se 98 amostras de solo na camada de 0-20 cm, utilizando-se trado de rosca, totalizando 30 pontos amostrados na floresta secundária em estágio inicial de regeneração (FI), 10 pontos na floresta secundária em estágio avançado de regeneração (FA), 17 pontos na floresta primária (F), 13 pontos na pastagem (P), 18 na agricultura (AG) e 10 na agrofloresta (A), sendo que em nenhuma das áreas houve introdução de estirpes exóticas através da inoculação. A descrição detalhada da coleta das amostras de solos, seguindo as normas instituídas do projeto para todos os países envolvidos, encontra-se em Moreira & Bignell (2006), e também www.biosbrasil.ufla.br, assim como a caracterização das áreas de estudo, em Fidalgo et al. (2005), e as análises química e física do solo, em Nóbrega et al (em preparação).

Para captura de BNL, um experimento foi montado na casa-de-vegetação do Laboratório de Microbiologia do Solo – DCS – UFLA, de abril a maio de 2004, em sacos plásticos estéreis da *Nasco*[®] de 300 mL, com solução nutritiva de Jensen isenta de nitrogênio (K_2HPO_4 0,2 g L⁻¹; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g L⁻¹;

¹, NaCl 0,2 g L⁻¹, CaHPO₄ 1 g L⁻¹, FeCl₃.6H₂O 0,1 g L⁻¹; H₃BO₃ 2,86 mg L⁻¹; MnSO₄.4H₂O 2,03 mg L⁻¹; ZnSO₄.7H₂O 0,22 mg L⁻¹; CuSO₄.5H₂O 0,08 mg L⁻¹ e Na₂MoO₄.H₂O 0,09 mg L⁻¹), diluída quatro vezes e esterilizada (Jensen, 1942; Vincent, 1970). Foram colocadas duas plantas de siratro (*Macroptilium atropurpureum*) por saco, as quais foram inoculadas com suspensões das 98 amostras de solo. Decorridos 30 dias de crescimento e nodulação das plantas, foram avaliadas e calculadas as densidades das populações de BNL.

Após o destacamento manual, todos os nódulos das raízes de cada planta-isca foram utilizados para o isolamento das BNL. Para a desinfestação superficial, estes foram 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), sendo o material espalhado em forma de estrias compostas para a obtenção de colônias isoladas. De cada nódulo se obteve apenas um isolado.

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 características culturais avaliadas para cada isolado foram: taxa de crescimento medida pelo tempo de aparecimento de colônias isoladas (rápido - 2 a 3 dias; intermediário - 4 a 5 dias; lento - 6 a 10 dias; muito lento > 10 dias); diâmetro médio das colônias isoladas; modificação do pH do meio (acidificação, alcalinização e neutralização), conforme Moreira (1991), e ainda forma do bordo (circular, irregular; inteiro, ondulado); elevação do bordo (lente, convexo, plano), superfície (liso, concêntrico), produção de muco (escasso, pouco, moderado, abundante), consistência (elástico, gomoso, butírico, aquoso) absorção de indicador, transmissão de luz (opaco, brilhante, translúcido) e coloração das colônias, conforme Jesus (2004).

Com exceção da característica tempo em dias, para visualização das colônias, as demais foram avaliadas após 5, 8, 12 e 15 dias de aparecimento das colônias isoladas para os isolados de crescimento rápido, intermediário, lento e muito lento, respectivamente.

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

3.2.2. Análise dos dados

Cinco matrizes binárias dos dados foram construídas para o agrupamento com os isolados separados pelas características referentes ao tempo de aparecimento das colônias isolados e quanto à modificação do pH, utilizando todas as características culturais avaliadas. Para cada característica foram atribuídos valores 1 ou 0, indicando presença ou ausência da mesma. Os

dendrogramas foram construídos pelo método UPGMA (método da média aritmética não ponderada), com a utilização do coeficiente de similaridade de Jaccard e do programa estatístico NTSYS (Numerical Taxonomic and Multivariate Analysis System, version 2.0, Applied Biostatistics, New York).

Os grupos culturais formados a 87% de similaridade foram utilizados no cálculo do índice de diversidade de Shannon e na análise de rarefação, com o auxílio do programa EstimateS, versão 7.5 (Cowell, 2006). Através dele foi possível contabilizar a riqueza de tipos culturais e também estimá-la através do índice riqueza Chao 2 (Chao, 1987), dado pela expressão $Chao\ 2 = S + L^2/2M$, em que L é o número de tipos culturais que ocorrem somente em uma amostra (espécies únicas) e M corresponde ao número de tipos culturais que ocorrem nas amostras. O programa selecionou os isolados ao acaso de modo a constituir amostras com um, até o número total de isolados, sendo que os dados foram aleatorizados mil vezes. Foram construídas curvas com a variação do índice Chao 2 em função do número de amostras (esforço de amostragem). O programa também calculou o número de Singletons (grupos com apenas um indivíduo), Doubletons (grupos com apenas dois indivíduos), Uniques (grupos que ocorrem em apenas uma amostra) e Duplicates (grupos que ocorrem em apenas duas amostras) (Colwell & Coddington, 1994).

3.2.3 Amplificação e sequenciamento do gene 16S do DNA ribossomal

Os isolados foram crescidos em meio 79. Colônias isoladas de 112 representantes dos grupos, que foram autenticados, obtidos pela caracterização cultural em meio 79, foram retiradas, colocadas em micro tubos de 1,5 mL contendo 1 mL de água ultra pura estéril e aquecidas por 10 minutos a 95°C. Uma alíquota de 10 µL foi utilizada para a reação em cadeia da polimerase (PCR), para um volume final de 50 µL por reação. A concentração final dos reagentes por reação foram de 0,2µM de cada oligonucleotídeo iniciadores 27F

(5AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT), 2,5 Mm de cloreto de magnésio, tampão 1x para PCR, 0,2 μ M de cada dNTP e 0,02 U Taq DNA polimerase (Taq DNA polimerase, Invitrogen). A reação de amplificação foi realizada no termociclador Eppendorf Mastercycle[®], Alemanha. As temperaturas do ciclo de amplificação foram uma desnaturação inicial de 94°C por 5min., 30 ciclos de desnaturação (94°C por 40s), anelamento (55°C por 40s), extensão (72°C por 1,5 min) e uma extensão final de 72° por 7 min. A reação de PCR do r DNA 16S (50 μ L) foi corrida em gel de agarose 1% (p/v), com tampão TAE e corada em brometo de etídeo (5 μ g mL⁻¹). As amostras foram congeladas e liofilizadas e enviadas para a empresa Macrogen, República da Coréia, para realização do sequenciamento. O sequenciamento direto foi realizado utilizando o oligonucleotídeo iniciador 27F.

3.2.4 Pesquisa por similaridade

As seqüências dos isolados de siratro foram comparadas com seqüências depositadas no GenBank, banco de seqüências público (www.ncbi.nlm.nih.gov). Para a pesquisa no Genbank, foi utilizado o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), que compara várias seqüências simultaneamente, contidas em um único arquivo, contra um banco de dados de nucleotídeos. Este programa é utilizado para comparar as seqüências que diferem muito pouco (Zhang et al., 2000). Sendo assim, todas as seqüências individuais, e seqüências contíguas de outras regiões do gene 16SrDNA, foram reunidas em um arquivo após terem sido editadas. Este arquivo foi utilizado na pesquisa por similaridade. O Genbank mantém todos os tipos de seqüências, além do 16S rDNA, e todos os tipos de estirpes. Na busca realizada pelo programa Blast, muitas opções podem ser modificadas pelo usuário. Estas opções incluem as formatações de saída do resultado da busca, em formato

HTML, texto e outros formatos e opções avançadas de busca, como a opção de modificar o maior valor de *expect* e *wordsize*.

3.2.5 Alinhamento das seqüências e análise filogenética

Com a obtenção das seqüências 27F dos isolados de nódulos de siratro utilizadas neste trabalho, construíram-se árvores filogenéticas para avaliar a proximidade destas estirpes de outras espécies. Inicialmente utilizou-se o programa BIOEDIT para formatar e editar as seqüências, e depois o programa ClustalW para alinhar todas as seqüências dos isolados do siratro com as respectivas seqüências de espécies mais similares. As seqüências alinhadas foram usadas para análise filogenética, através do método Neighbour-Joining, o teste de filogenia *bootstrap* com um mínimo de 2000 replicações a partir de uma matriz de distâncias com o número de diferenças entre os pares de seqüências alinhadas pelo modelo de nucleotídeo *Jukes-Cantor* (Jukes & Cantor, 1969). O programa MEGA3 (Kumar et al., 2004) foi utilizado para construir estas árvores.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Isolamento e caracterização cultural de Bactérias que Nodulam Leguminosas.

Foram obtidos 1890 isolados em cultura pura, sendo 474 isolados obtidos na floresta secundária em estágio inicial de regeneração (FI), 160 isolados na floresta secundária em estágio avançado de regeneração (FA), 136 isolados na floresta primária (FP), 219 na pastagem (P), 547 na agricultura (AG) e 354 na agrofloresta (A). O maior número de isolados foi obtido na agricultura e o menor número de isolados, na floresta primária. Como neste trabalho todos os nódulos foram utilizados para o isolamento, e de cada nódulo obteve-se apenas um isolado, então pode-se relacionar o baixo número de isolados à baixa densidade, e conseqüentemente a uma baixa freqüência de nodulação, o que foi observado notadamente na FP. Estudos em floresta clímax na Amazônia encontraram baixas freqüências de nodulação (Magalhães et al., 1982; Nóbrega, 2006) e baixas densidades (Bonetti et al., 1984; Jesus et al., 2005; Moreira & Franco, 1994). O mesmo foi observado em floresta tropical úmida na África (Fening & Danso, 2002). Pereira (2000) encontrou maiores populações de rizóbios em solos da Amazônia utilizados para pastagem, até mesmo maiores que em área cultivada com feijoeiro e menores na floresta.

Combinando as características de pH e tempo de aparecimento das colônias, foram encontrados 5 tipos culturais principais nos diferentes sistemas de uso da terra, que possuem características semelhantes aos gêneros dos rizóbios, podendo ser um indicativo da presença destes gêneros nos diferentes SUT's estudados. Dos 1890 isolados de BNL obtidos, 790 apresentaram crescimento rápido e acidificaram (RA); 596 apresentaram crescimento rápido e não modificaram o meio (RN); 125 apresentaram crescimento intermediário e não modificaram o meio (IN); 109 apresentaram crescimento intermediário e alcalinizaram (IAL); e 270 tiveram crescimento lento e alcalinizaram o meio

(LAL) (Figuras 2 e 3). Os isolados que apresentaram crescimento rápido e acidificaram (RA) podem pertencer aos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium* ou *Burkholderia*, os RN podem pertencer aos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*, os que apresentaram crescimento do tipo IN podem indicar a presença do gênero *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 2002), os isolados que apresentaram crescimento IAL podem ser indicativos do gênero *Azorhizobium* e, finalmente, os que apresentaram crescimento lento e reação alcalina do pH do meio podem pertencer ao gênero *Bradyrhizobium* .

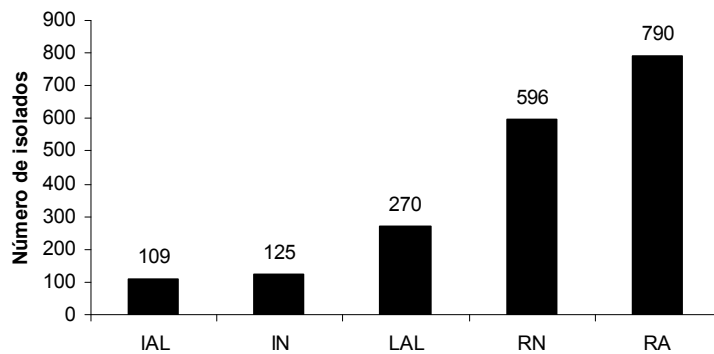


FIGURA 1 Distribuição dos isolados de bactérias que nodulam siratro em 5 tipos culturais baseados na alteração dos pH do meio de cultura e no tempo de aparecimento de colônias isoladas; apresentaram crescimento rápido e acidificaram (RA); crescimento rápido e não modificaram o meio (RN); crescimento intermediário e não modificaram o meio (IN); crescimento intermediário e alcalinizaram (IAL); e crescimento lento e alcalinizaram o meio (LAL).

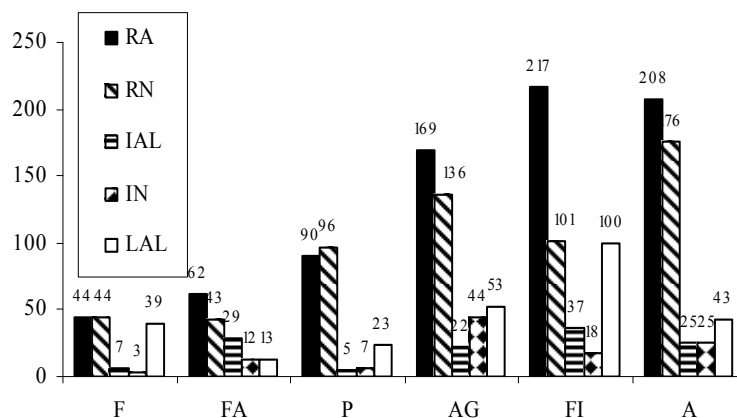


FIGURA 2 Distribuição dos isolados de bactérias que nodulam siratro, isoladas de diferentes sistemas de uso da terra, em 5 tipos culturais baseados na alteração dos pH do meio de cultura e no tempo de aparecimento de colônias isoladas; apresentaram crescimento rápido e acidificaram (RA); crescimento rápido e não modificaram o meio, (RN); crescimento intermediário e não modificaram o meio (IN); crescimento intermediário e alcalinizaram (IAL); e crescimento lento e alcalinizaram o meio (LAL).

Todos os sistemas de uso da terra estudados apresentaram isolados dos 5 tipos culturais baseados na alteração dos pH do meio de cultura e no tempo de aparecimento de colônias isolada. Na floresta primária (F), a quantidade de isolados de crescimento rápido que acidificam o meio e a de crescimento rápido que não modificam o meio se igualaram. Na pastagem (P), a maioria dos isolados foi de crescimento rápido, que não modificam o meio. Cerca de 32% dos isolados apresentaram crescimento rápido e não modificaram o pH do meio de cultivo, 14% tiveram crescimento lento e alcalinizaram o meio e os que apresentaram crescimento intermediário e alcalinizaram o meio e crescimento intermediário e neutralizaram o meio foram cerca de 7 e 6%, respectivamente.

A maioria dos isolados (41%) apresentaram crescimento rápido e acidificaram o meio. A predominância de isolados de crescimento rápido e que acidificam o meio, entre as BNL, foi também relatada em estudo usando caupi como planta isca na mesma área em estudo, 49,2% dos isolados acidificaram o meio (Nóbrega, 2006), o que também ocorreu em uma área próxima ao local deste estudo, estudada por Jesus et al. (2005), os quais, ao avaliarem a densidade de BNL utilizando siratro como plantas isca, encontraram 58 % de isolados de crescimento rápido em solos sob floresta primária e 53 % em monocultura da mandioca. Somente na monocultura da pupunha é que a maior parte foi constituída de isolados de crescimento lento e que alcalinizam o meio de cultura. Neste estudo, a pastagem foi o SUT com maior número de isolados que acidificaram o meio de cultivo em relação aos demais SUTs. Pereira (2000) encontrou grande proporção de isolados que acidificam o meio em solos sob floresta localizada em Theobroma, Rondônia.

3.3.2 Agrupamento e diversidade dos isolados de BNL

Para uma análise detalhada da riqueza dos isolados de BNL, todas as 20 características culturais avaliadas dos 1890 isolados (Anexo 1A) foram

consideradas para o agrupamento e formação dos grupos culturais. Assim, através do agrupamento realizado por meio do dendrograma cultural analisado a 87% de similaridade, foi possível encontrar 112 grupos culturais (Anexo 2A), e quando estes foram distribuídos dentro dos SUTs de origem, obtiveram-se 34 na FI, 27 grupos na FA, 16 grupos na F, 33 na P, 57 grupos na AG e 57 na A. Os resultados obtidos pelo programa estimateS encontram-se na Tabela 1.

TABELA 1 Número de pontos coletados, com isolados, isolados obtidos de indivíduos estimados, Riqueza de grupos culturais*, Espécies observadas, Chao2**, Singletons, Doubletons, Uniques, Duplicates, Shannon, de bactérias que nodulam e fixam nitrogênio isoladas de siratro.

	FI ⁽¹⁾	FA ⁽²⁾	F ⁽³⁾	P ⁽⁴⁾	AG ⁽⁵⁾	A ⁽⁶⁾
Nº. de pontos coletados	30	10	17	13	18	10
Nº. de pontos com isolados	30	10	17	13	18	10
Nº. de isolados obtidos	474	160	136	219	547	354
Nº de indivíduos estimados	476,37	159,7	135,88	220,69	552,17	357,07
Riqueza de grupos culturais*	34	27	16	33	57	57
Espécies observadas	27	27	16	24	48	28
Chao 2**	38,6	31,73	17,11	33,56	61,91	68,76
Singletons	2,39	1,00	1,20	4,56	5,88	4,88
Doubletons	5,36	1,95	1,25	6,95	9,92	11,59
Uniques	8,9	5,62	3,78	9,33	15	17,97
Duplicates	5,94	7,11	2,55	6,72	9,79	11,93
Shannon	2,58	2,13	1,45	2,41	2,89	2,91

⁽¹⁾ Floresta secundária em estágio inicial de regeneração (FI). ⁽²⁾ Floresta secundária em estágio avançados de regeneração (FA). ⁽³⁾ Floresta primária (FP). ⁽⁴⁾ Pastagem (P). ⁽⁵⁾ Agricultura (AG). ⁽⁶⁾ Agrofloresta (A). * Riqueza observada. ** Riqueza estimada

Foi possível obter isolados de todos os 98 pontos de amostragem. O maior número de indivíduos estimados foi para AG e o menor, para F, que foi aproximadamente igual ao número de isolados obtidos para FI, AG e A; o número de indivíduos estimados foi maior que o número dos isolados obtidos. O número de Singletons (grupos com apenas um indivíduo) foi maior na agricultura, ocorrendo 5,88 grupos com apenas um indivíduo, e menor na

floresta secundária em estágio avançado de regeneração, apenas um grupo com um indivíduo (FA). A agrofloresta teve, uma média, 11,59 grupos com apenas dois indivíduos (Doubletons) e a floresta, 1,25. A agrofloresta obteve a maior quantidade de Uniques (grupos que ocorrem em apenas uma amostra) e de Duplicates (grupos que ocorrem em apenas duas amostras) e a floresta, as menores. Agricultura obteve o maior número de tipos culturais (riqueza) observados e a floresta, o menor; a quantidade de espécies observadas foi igual para FI e FA. Com o cálculo de índice Chao 2, verifica-se que a riqueza total estimada, isto é, que inclui espécies não presentes na amostra, assim como a observada, que inclui somente as espécies da amostra, obedeceram à seguinte ordem: A > AG > FI > P > FA > F (Tabela 1).

A diversidade calculada pelo índice de Shannon seguiu a mesma ordem daquela obtida pelo índice de Chao 2, indicando que mudanças de uso da terra alteraram a diversidade de BNL.

Menor diversidade de isolados de bactérias que nodulam leguminosas em amostras de solo sob floresta primária, em relação à agricultura de pupunheira e mandioca em locais próximos ao do presente estudo, já foi verificada por Jesus et al. (2005) utilizando siratro como planta isca. Os autores atribuíram a menor diversidade neste sistema ao menor número de isolados obtidos em relação aos demais sistemas de uso, concluindo que a diversidade foi subestimada.

Nas florestas, as populações de BNL encontram-se em baixa densidade por este se tratar de um sistema em equilíbrio em que a baixa demanda de nitrogênio é suprida por ciclagem, não havendo estímulo à fixação biológica de nitrogênio (Magalhães et al., 1982), e que, devido a estas, há relatos de que raramente encontram-se nódulos em floresta primária de terra firme (Bonetti et al., 1984; Magalhães et al., 1982; Moreira et al., 1992; Sylvester-Bradley et al., 1980) por fatores limitantes do solo (Moreira et al., 1992; Moreira, 1995), por

uma grande variedade de compostos secundários, entre os quais muitos são deles substâncias de defesa contra predadores e parasitas (Janzen, 1980), e pela presença de antagonistas (Handelsman & Brill, 1985; Pugashett et al., 1982; Vicent, 1970).

Já nos demais SUTs, como agrofloresta, florestas secundárias e pastagem, que se encontram em fase de sucessão (Fidalgo et al., 2005) e demandam mais nitrogênio, há maior estímulo para a ocorrência de populações mais eficientes e diversas de BNL. A carência de nitrogênio gera a pressão seletiva para a fixação biológica do nitrogênio atmosférico e, desta forma, conduz a uma adaptação das populações de bactérias em que elementos genéticos móveis podem ser transferidos horizontalmente, entre gêneros de bactérias, conferindo-lhes a capacidade de fixação biológica. O estímulo por parte das plantas cultivadas (Venkateswarlu et al., 1997); através da exploração do solo pelas raízes e exudação de compostos orgânicos na rizosfera, pode controlar parâmetros abióticos do solo, como concentração de nutrientes e umidade, que podem modificar indiretamente a atividade e a diversidade microbiana (Paul & Clark, 1989), assim como ser fonte de carbono e energia, estimulando as populações de organismos.

Com relação à riqueza de BNL na região, a curva de variação do índice de Chao 2, construída com todos os isolados obtidos nos 98 pontos amostrados, tendeu a atingir a assíntota para cada SUT (Figura 3).

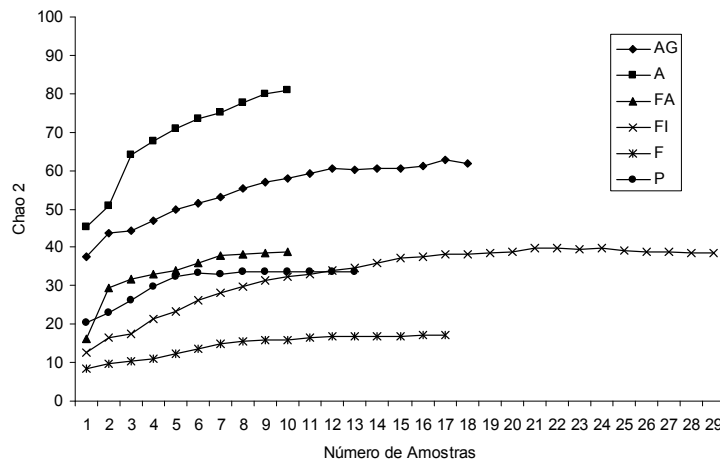


FIGURA 3 Variação do índice Chao 2 em função do número de amostras coletadas (esforço de amostragem) em solos sob floresta secundária em estágio inicial de regeneração (FI), floresta secundária em estágio avançados de regeneração (FA), floresta primária (FP), pastagem (P), agricultura (AG) e agrofloresta (A).

Pôde-se verificar que mesmo nos SUTs que tiveram maior número de pontos amostrados (esforço de amostragem), como a floresta secundária em estágio inicial de regeneração, com 30 pontos, e a floresta primária, com 17, assim como nos demais SUTs, a riqueza de tipos culturais de BNL capturadas permaneceu constante após a sétima amostra, indicando que a amostragem realizada foi representativa para o estudo destes microrganismos, já que se atingiu assíntota, corroborando Nóbrega (2006), que em estudo na mesma área utilizando caupi como planta isca, também atingiu assíntota, apesar de ter maior riqueza de tipos culturais.

3.3.3 Ajustes de modelos de abundância de tipos culturais às populações de BNL

As curvas de variação para o índice de Shannon tendem a atingirem a assíntota (Figura 4). Este resultado comprova o encontrado anteriormente, o que indica que a amostragem realizada foi representativa para o estudo destes microrganismos, já que se atingiu assíntota, e significa que a coleta de mais amostras seria desnecessária para realizar a estimativa da diversidade de rizóbios que nodulam siratro com base neste índice, pois estirpes já identificadas poderiam ser reamostradas. Em estudo de comunidades de rizóbios em solos cultivados observou-se que a variação do valor do índice de Shannon em relação aos SUT foi a melhor determinação da diversidade em cada uma das áreas estudadas (Coutinho et al., 1999), apesar de estes autores terem uma amostra de apenas 31 isolados.

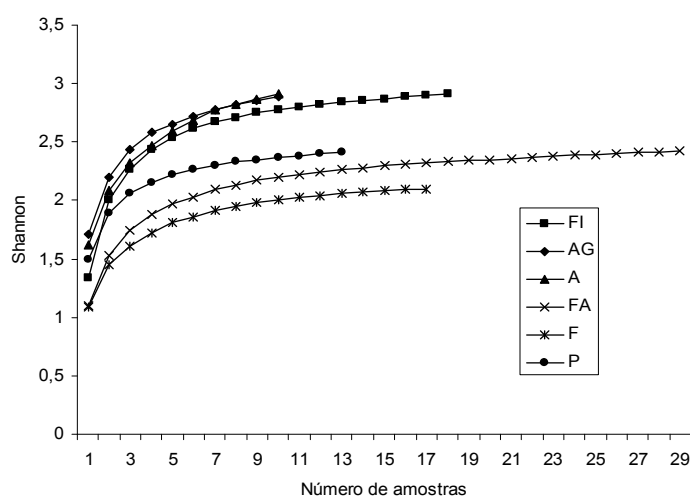


FIGURA 4 Valores de Shannon (H') para os isolados de BNL em função do número de amostras coletadas (esforço de amostragem) em solos sob floresta secundária em estágio inicial de regeneração (FI), floresta secundária em estágio avançados de regeneração (FA), floresta primária (FP), pastagem (P), agricultura (AG) e agrofloresta (A).

Jesus et al. (2005) encontraram uma ampla diversidade de grupos culturais de BNL em solos cultivados com pupunha, mandioca e da floresta primária na região do Alto Solimões, na Amazônia. Nas áreas cultivadas com mandioca foi registrada a maior diversidade, indicando que os sistemas de uso alteraram e estimularam a diversidade das comunidades de BNL.

Pereira (2000), avaliando diferentes manejos do solo, como monocultura, sistema agroflorestal, pastagem capoeira e floresta na Amazônia, sobre a diversidade cultural e eficiência de populações de bactérias que nodulam leguminosas, verificaram que a pastagem foi o sistema de manejo que proporcionou maiores valores para estas variáveis. Na floresta primária, a autora obteve o menor número de isolados, porém houve maior diversidade de espécies que nodulam leguminosas em relação aos demais sistemas de uso. Isto pode ser devido ao fato de que solos sob floresta não estão submetidos a praticamente nenhuma perturbação antrópica, e ainda à adaptação de populações de bactérias que nodulam leguminosas a estresses químicos edáficos, pois, na natureza, a seleção de organismos é conduzida para sobrevivência e não para eficiência. No entanto, os dados deste trabalho não mostram o mesmo; obtiveram-se, na floresta primária, os menores valores, tanto de densidade quanto de diversidade, o que se deve ao fato já mencionado da falta de estímulo à FBN nestes ambientes (Bonetti et al., 1984; Magalhães et al., 1982; Moreira et al., 1992; Sylvester-Bradley et al., 1980) por fatores limitantes do solo (Moreira et al., 1992; Moreira, 1995). A mesma autora ressalta que estas interpretações precisam ser criteriosas, uma vez que a planta isca utilizada para o isolamento das bactérias influencia nos resultados encontrados. Tal fato pode ser atribuído ao estímulo ou não para o estabelecimento da simbiose, que tem como etapas fundamentais a pré-infecção (envolve o reconhecimento e interação entre a espécie de planta hospedeira e o simbiote), a infecção da planta pela bactéria e a formação e funcionamento do nódulo (fixação biológica do nitrogênio).

3.3.4. Amplificação e sequenciamento do gene 16S do DNA ribossomal

A amplificação parcial do 16S rDNA dos 112 isolados BNL que nodularam o siratro foi bem sucedida em 96. Destes, 74 foram seqüenciados com o oligonucleotídeo iniciador 27 no sentido “forward”, que amplifica a região inicial do gene 16S. Os rDNA 16S de 22 isolados não tiveram qualidade suficiente para serem seqüenciados, ou seja, não obtiveram um número suficiente de bases seqüenciadas, que é acima de 400 bases. As seqüências foram submetidas ao GenBank, banco de seqüências público (www.ncbi.nlm.nih.gov). Para a pesquisa no Genbank foi utilizado o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), que compara várias seqüências simultaneamente, contidas em um único arquivo, contra um banco de dados de nucleotídeos. Os resultados do número de pares de bases para os isolados representantes dos grupos, os respectivos gêneros, a porcentagem de similaridade e o número do acesso encontram-se na tabela 1.

TABELA1 Sequenciamento dos isolados representantes dos grupos culturais com seus respectivos SUT, tipo cultural, números de pares de bases, número do acesso mais similar encontrados no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), porcentagem de similaridade idênticas ao acesso.

G	NI	Isolados	SUT*	Tipo**	Pb	Microrganismo	%	NA
1	13	J2-28-1-19	AG	RA	846	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	95	NC_006351.1
2	16	J4 62-2-1	F	RA	851	<i>Rhizobium leguminosarum bv. viciae</i>	86	NC_008380.1
3	27	J47-1-1	F	RA	855	<i>Mesorhizobium loti</i>	94	BA000012.4
4	134	J2 29-2-1	FI	RA	793	<i>Mesorhizobium sp.</i>	94	NC_008254.1
5	58	J2-22-1-23	A	RA	844	<i>Burkholderia sp.</i>	99	DQ777733.1
6	35	J4 10-1-2	F	RA	856	<i>Mesorhizobium sp.</i>	94	CP000390.1
7	481	J2-24-2-23	A	RA	818	<i>Rhizobium sp.</i>	98	AF514801.1
8	9	J6 88-1-1	FA	RA	885	<i>Burkholderia sp.</i>	98	U37342.1
9	4	J2-28-1-25	AG	RA	826	<i>Rhizobium sp.</i>	99	EF035062.1
21	4	J2 17A-1-5	A	RN	857	<i>Rhizobium etli</i>	96	NC_007761.1
22	2	J2-28-1-32	AG	RN	1040	<i>Rhizobium leguminosarum bv. viciae</i>	96	NC_008380.1
23	1	J2 24A-3-4	A	RN	820	<i>Rhizobium leguminosarum bv. viciae</i>	96	AM236080.1
24	1	J2-21-2-16	AG	RN	855	<i>Rhizobium etli</i>	95	NC_007761.1
25	1	J2-22-1-27	A	RN	838	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	98	NC_007435.1
26	3	J2-22-1-33	A	RN	846	<i>Rhizobium leguminosarum bv. viciae</i>	96	NC_008380.1
27	2	J5 67-1-2	A	RN	815	<i>Rhizobium sp.</i>	94	DQ267108.1
28	2	J2-28-1-13	AG	RN	989	<i>Rhizobium sp.</i>	90	D14510.1
29	2	J45-1-2	F	RN	848	<i>Burkholderia sp.</i>	95	DQ777739.1
31	2	J2 19A-2-11	A	RN	848	<i>Mesorhizobium sp.</i>	93	AF509918.1
32	11	J2 19A-2-13	A	RN	824	<i>Rhizobium sp.</i>	98	AF325770.1
33	11	J2 19A-2-14	A	RN	851	<i>Burkholderia sp.</i>	99	DQ777739.1
35	2	J2-22-1-36	A	RN	821	<i>Rhizobium sp.</i>	98	EF035074.1
36	28	J2-22-1-38	A	RN	823	<i>Sinorhizobium medicae</i>	95	DQ423248.1
37	13	J2 21-1-2	AG	RN	857	<i>Rhizobium galegae</i>	99	X67226.2
38	4	J2-22-1-40	A	RN	845	<i>Sinorhizobium sp.</i>	96	AJ846889.1
39	37	J2-22-1-41	A	RN	853	<i>Sinorhizobium sp.</i>	97	AY500253.1
40	10	J2-22-2-12	A	RN	816	<i>Burkholderia sp.</i>	96	AB212227.1
41	69	J2 17-2-2	A	RN	845	<i>Burkholderia sp.</i>	96	AY610937.1
43	1	J3 37-1-1	FA	RN	858	<i>Rhizobium sp.</i>	97	EF035072.1
44	2	J5 67-1-7	A	RN	885	<i>Rhizobium sp.</i>	97	EF035071.1
45	1	J2-28-1-26	AG	RN	958	<i>Rhizobium sp.</i>	97	AF064016.1
46	12	J6 94-1-8	P	RN	856	<i>Rhizobium leguminosarum bv. viciae</i>	98	DQ835294.1
47	2	J2 26-1-2	AG	RN	863	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	96	NC_003047.1
48	8	J2 30-1-5	FI	RN	856	<i>Rhizobium sp.</i>	99	AY500260.1

... continua...

TABELA1, Cont.

49	9	J2 24A-1-5	A	RN	846	<i>Burkholderia sp.</i>	99	DQ777739.1
50	1	J2-28-1-42	AG	RN	854	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>Phaseoli</i>	97	EF141340.1
51	4	J2 17A-1-13	A	RN	845	<i>Rhizobium etli</i>	99	AY117632.1
52	2	J2 18-1-6	AG	RN	851	<i>Sinorhizobium sp.</i>	97	AJ846889.1
53	1	J2 26-1-4	AG	RN	846	<i>Rhizobium sp.</i>	97	AY500260.1
54	1	J2-32-1-13	AG	RN	852	<i>Burkholderia sp.</i>	96	DQ777739.1
55	2	J2 19A-2-20	A	RN	852	<i>Rhizobium sp.</i>	99	EF035071.1
56	2	J2 22-3-4	A	RN	857	<i>Rhizobium etli</i>	99	AY117632.1
58	2	J2-29-2-24	FI	RN	859	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	97	DQ835305.1
59	10	J2-27-1-11	AG	RN	843	<i>Rhizobium galegae</i>	96	X67226.2
60	1	J5 67A-1-2	A	RN	851	<i>Burkholderia sp.</i>	99	DQ777739.1
61	1	J2 24A-2-14	A	RN	858	<i>Rhizobium sp.</i>	99	EF035072.1
62	1	J2-22-4-10	A	IN	855	<i>Azorhizobium sp.</i>	99	DQ664248.1
63	4	J2-27-1-12	AG	IN	828	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	98	EF070134.1
64	7	J2 24A-2-15	A	IN	857	<i>Rhizobium sp.</i>	97	EF035060.1
70	3	J3-33-1-23	AG	IN	851	<i>Azorhizobium sp.</i>	96	DQ664248.1
74	1	J2-22-1-13	A	IN	847	<i>Azorhizobium sp.</i>	97	DQ664248.1
76	3	J2 19-3-2	AG	IN	856	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	99	DQ354614.1
77	1	J2 23-1-5	FA	IN	857	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	95	AF510596.1
78	27	J2-18-1-28	AG	IN	857	<i>Azorhizobium sp.</i>	99	DQ664248.1
81	3	J2-24-2-15	A	IN	858	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	99	DQ485704.1
82	2	J2 23-2-7	FA	IN	858	<i>Azorhizobium sp.</i>	99	DQ664248.1
83	25	J2-29-1-13	FI	IN	856	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	99	AB231926.1
85	3	J2 26-1-5	AG	IN	834	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	95	AY490114.1
86	13	J2-27-1-20	AG	IN	856	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	97	AY490115.1
87	18	J2-21-1-29	AG	IN	856	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	100	EF070134.1
88	23	J2-24-1-18	A	IAL	859	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	96	DQ485704.1
89	2	J2 17A-2-1	A	IAL	859	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	99	AJ810378.1
90	1	J6 92-2-4	P	IAL	789	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	96	AF510623.1
92	1	J2 20-1-5	A	IAL	856	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	99	AY490115.1
93	2	J2-24-1-26	A	IAL	847	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	97	DQ354619.1
94	4	J4 62-3-3	F	IAL	858	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	100	DQ485704.1
95	3	J2 24-2-4	A	IAL	856	<i>Azorhizobium sp.</i>	97	DQ664248.1
96	5	J2 19A-3-2	A	IAL	854	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	97	AY490122.1
97	3	J6 81A-3-9	FA	IAL	815	<i>Azorhizobium doebereineriae</i>	98	AY626222.1
98	1	J48-1-3	F	IAL	841	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	99	AY490122.1
101	6	J2 19A-3-6	A	IAL	856	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	99	DQ354614.1
102	1	J2 19-2-4	AG	IAL	847	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	100	EF070134.1
103	4	J2 22-3-5	A	IAL	852	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	99	DQ485704.1
104	2	J2 27-2-3	AG	IAL	844	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	100	EF070134.1

... continua ...

TABELA1, Cont.

105	22	J2-26-1-10	AG	IAL	837	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	89	EF035057.1
106	2	J5 80-1-5	FI	IAL	855	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	99	DQ485704.1
107	2	J5 76-3-1	FI	IAL	856	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	99	AB231926.1
108	8	J2 26-2-2	AG	L	852	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	98	DQ485704.1
111	209	J3 36-2-4	FI	L	841	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	100	EF070134.1
112	4	J3-33-1-15	AG	L	855	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	99	AB231926.1

*SUT- Sistema de uso da Terra (AG- Agricultura, A- Agrofloresta, F- Floresta Primária, FI- Floresta secundária estágio inicial de regeneração; FA Floresta secundária estágio avançado de regeneração, P – Pastagem).**Tipo - tipo cultural (RA- Rápido ácido, RN- Rápido neutro, IN – Intermediário neutro, IAL – Intermediário alcalino, L – Lento)

Os resultados obtidos pelas análises das seqüências mostraram que há diversidade de gêneros de BNL entre os isolados representantes dos grupos culturais. Dos 74 isolados seqüenciados, onze pertencem ao gênero *Burkholderia* sp. e dois deles foram identificados com sendo *Burkholderia pseudomallei* (G1 e G25). Dentro do gênero *Burkholderia*, por exemplo, ocorrem tanto espécies benéficas, capazes de fixar nitrogênio ou produzir fitormônios como AIA (ácido indol acético), como a *B. tropica* (Reis, 2004) e outras espécies (Chen et al., 2003; Moulin et al., 2001), quanto espécies patogênicas, tanto de plantas quanto de animais, como a *B. cepacia*, originalmente conhecida como agente causador do apodrecimento de cebolas e posteriormente encontrada em pacientes com fibrose cística, juntamente com outras espécies recentemente descritas, como *B. multivorans*, *B. stabilis*, *B. vietnamiensis* e *B. ambifaria* (Cystic Fibrosis Worldwide Website, 2006). Silva (2006), em estudo com meios NFb, FAM e LGI inoculados com suspensões de solos da Amazônia sob diferentes SUT da mesma região deste estudo, identificou seis isolados dos 22 isolados como pertencentes ao gênero *Burkholderia*. Van Pelt et al. (1999) fazem comparação de diversos tipos de abordagens experimentais para identificação de estirpes de *Burkholderia*, um grupo de particular interesse comercial, pois há um potencial uso deste gênero como biopesticidas, promotores de crescimento em plantas e degradantes de

poluentes ambientais. Quanto a meios seletivos, estes autores comentam que estirpes de *B. cepacia* não podem ser identificadas com base em meio específico, pois outras bactérias além desta pode crescer neste meio; portanto, esta metodologia deve ser utilizada apenas como uma primeira abordagem, e não como identificação definitiva.

Vintee sete isolados pertencem ao gênero *Rhizobium* sp., sendo seis identificados como *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (G2, G22, G23, G26, G46 e G59) e o isolado representante do grupo 50, como *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. Quatro isolados pertencem ao gênero *Mesorhizobium* sp., sendo o isolado do G3 identificado como *Mesorhizobium loti*; cinco ao gênero *Sinorhizobium* sp., *Sinorhizobium medicae* (G36) e *Sinorhizobium meliloti* (G47); e sete ao gênero *Azorhizobium* sp.. O isolado do grupo 97 foi identificado como sendo *Azorhizobium doebereineriae*, e vinte seis pertencem ao gênero *Bradyrhizobium* sp, sendo seis *Bradyrhizobium elkanii* (G81, G88, G94, G103, G106 e G108) e três *Bradyrhizobium japonicum*.(G83, G107, G112).

3.3.5 Análise filogenética

Na análise filogenética pretendeu-se avaliar a proximidade dos isolados utilizadas neste trabalho com outros grupos de bactérias, sendo utilizadas as estirpes tipo de cada um dos grupos e as estirpes que possuíam a maior similaridade com isolados representantes dos grupos culturais de bactérias que nodulam o siratro. Para a construção das árvores alinhou-se, inicialmente, as seqüência de estirpes Tipo, obtidas no site GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), com as seqüências dos isolados deste trabalho. Outras que ficaram próximas aos isolados utilizados neste estudo foram também utilizadas. Os isolados que apresentaram seqüências com uma similaridade próxima de 100 % indicaram tratar-se do mesmo gênero, mas

podem ser de espécies diferentes. Para estes isolados muito similares, apenas uma seqüência representativa foi usada para criar um agrupamento e utilizada para a construção da árvore.

Na árvore filogenética, os isolados semelhantes a *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, *Rhizobium tropici*, ficaram próximos da estirpe tipo de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, mas não possuem semelhança entre os outros isolados, formando grupos com *Rhizobium* sp e *R. galegae* e com os formados por *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. e *Rhizobium etli*. Aguilar et al. (2006) estudaram a filogenia e a molécula sinalizadora de nodulação capazes de nodular feijão comum em solos da Argentina predominantes com *Rhizobium etli*; os autores analisaram genes simbióticos e encontraram grupo com *R. tropici* junto com *Rhizobium* sp isolado de leucena e de feijão e grupo com *R. tropici* junto com *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii*. Os mesmos autores encontraram *Rhizobium etli* junto com *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*. Andrade et al. (2002) analisaram 16S-23S ITS (internally transcribed spacer) e 16SrRNA de populações de rizóbio em nódulos de feijão comum e encontraram isolados que se alinharam com *Rhizobium tropici* IIB e *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli*, predominantes independentemente da aplicação de calcário.

Os isolados semelhantes a *Sinorhizobium*, sendo *Sinorhizobium medicae* (G36) semelhantes a *Sinorhizobium* sp; e diferente do gênero *Sinorhizobium meliloti* (G47). Os vinte cinco isolados pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* sp., seis *Bradyrhizobium elkanii* (G81, G88, G94, G103, G106 e G108), três *Bradyrhizobium japonicum*.(G83, G107, G112) e os outros, ficaram próximos. Os seis seqüências semelhantes ao gênero *Azorhizobium* sp., e o isolado do grupo 97 foi identificado como sendo *Azorhizobium doebereinae* também ficaram próximos. Os isolados semelhantes ao gênero *Burkholderia* sp. ficaram um pouco distante dos dois que foram identificados com sendo *Burkholderia*

pseudomallei (G1 e G25). E os isolados pertencentes ao gênero *Mesorhizobium* sp. ficaram bastante distantes do isolado do G3 que foi identificado como *Mesorhizobium loti*.

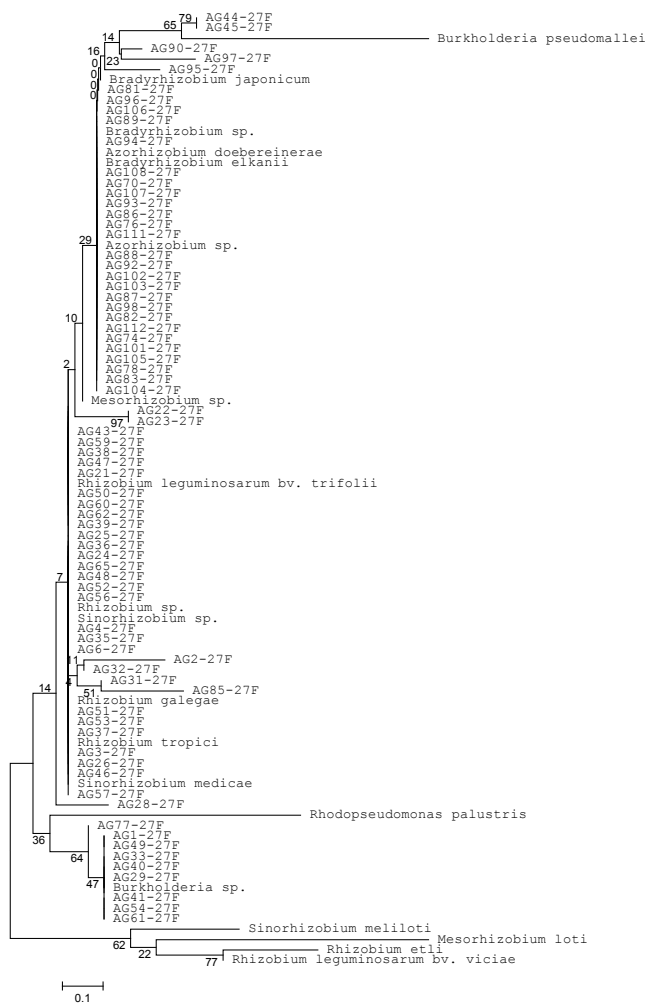


FIGURA 7 Neighbour-joining filogenia para 16S rDNA de isolados de siratro representantes dos grupos culturais e de estirpes tipo de bactérias que nodulam leguminosas, com base em seqüências do 16S rDNA. A árvore não foi enraizada. O tamanho do alinhamento foi de 540 pb., as posições com gaps foram omitidas. A porcentagem de suporte de bootstrap foi de 2000 repetições.

Como já mencionado, o siratro é considerado uma leguminosa promíscua, pois nodula com bactérias de vários gêneros, como *Bradyrhizobium* (Jordan, 1984), *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (Bromfield & Barran, 1990; Trinick et al., 1991), *Azorhizobium doebereineriae* (syn. *A. johannae*) (Moreira et al., 2006) (Gonçalves & Moreira, 2004), *Mesorhizobium loti* (Jordan et al., 1984) e *Burkholderia sp.* (Moulin et al., 2001). As análises de seqüenciamento e filogenética realizadas neste trabalho corroboraram dados, mostrando que o siratro foi capaz de capturar bactérias de vários gêneros. Através destas técnicas foi possível verificar grande diversidade entre os isolados.

3.4 CONCLUSÕES

Os SUTs alteraram a riqueza das populações de bactérias que nodulam siratro, uma vez que os sistemas submetidos ao cultivo e com maior diversidade vegetal tiveram maior riqueza, observada e estimada na seguinte ordem: A > AG > FI > P > FA > F.

Pôde-se observar uma grande diversidade baseada nas análises fenotípicas pelas características culturais, inclusive entre os isolados dos sistemas de uso manejados. Essa diversidade indica a resiliência das bactérias às modificações implementadas pelas mudanças de uso da terra após a renovação da floresta.

A riqueza de tipos culturais de BNL capturadas nos SUTs atingiu a assintota, indicando que a amostragem realizada foi representativa para o estudo destes microrganismos.

As análises de seqüenciamento e filogenética mostraram que o siratro foi capaz de capturar bactérias de vários gêneros, verificando-se uma grande diversidade entre os isolados.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. et al. **Fundamentos da biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula.** Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 1999. 756 p.

AGUILAR, O. M.; LÓPEZ, M. V.; DONATO, M.; MORÓN, B. N.; SORIDIAZ, M. E.; MATEOS, C.; GIL-SERRANO, SOUSA, A. C.; MEGÍAS, M. Phylogeny and nodulation signal molecule of rhizobial populations able to nodulate common beans—other than the predominant species *Rhizobium etli*—present in soils from the northwest of Argentina **Soil Biology & Biochemistry** Oxford, v. 38, n. 3, p. 573–586, Mar. 2006

ANDRADE, D. S.; MURPHY, P. J.; GILLER, K. E. The diversity of *Phaseolus*-nodulating rhizobial populations is altered by limiting of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brasil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 8, p. 4025-4034, Aug. 2002

BIOEDIT. Disponível em: < <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html> > Acesso em: 05 de jan. 2007.

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

BROMFIELD, E. S. P.; BARRAN, L. R. Promiscuous nodulation of *Phaseolus vulgaris*, *Macroptilium atropurpureum*, and *Leucaena leucocephala* by indigenous *Rhizobium meliloti*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 36, n. 5, p. 369–372, May 1990.

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

CHAO, A. Estimating the population size for capture- recapture data with unequal catchability. **Biometrics**, Washington, v. 43, n. 3, p. 783-791, Sept. 1987.

CHEN W. M.; LAEVENS S.; LEE, T. M.; COENYE, T.; DE VOS P.; MAX MERGEAY, M.; VANDAMME, P. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated

from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, n. 5, 1729–1735, Sept. 2001.

CHEN, W. M.; MOULIN, L.; BONTEMPS, C.; VANDAMME, P.; BENA, G.; BOIVIN-MASSON, C. Legume Symbiotic Nitrogen Fixation by β -Proteobacteria Is Widespread in Nature. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 185, n. 24, p. 7266–7272, Dec. 2003.

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

CLUSTALW. Disponível em: < <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>> Acesso em: 05 de jan. 2007.

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

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

COUTINHO, H. L. C.; OLIVEIRA, V. M.; LOVALO, A.; MAIA, A. H. N.; MANFIO, G. P. Evaluation of the diversity of rhizobia in Brazilian agricultural soils cultivated with soybeans. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 13, n. 2, p. 159-167, Oct. 1999.

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

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

FENING, J. O.; DANSO, S. K. A. Variation in symbiotic effectiveness of cowpea bradyrhizobia indigenous to Ghanaian soils. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 21, n. 1, p. 23-29, July/Aug. 2002.

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

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

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

GONÇALVES, M.; MOREIRA, F. M. S. Specificity of the Legume *Sesbania virgata* (Caz.)Pers. and Its Nodule Isolates *Azorhizobium johanna*e with other Legume Hosts and Rhizobia. I **Symbiosis**, Rehovot, v. 36, n. 1, p. 57-68, 2004.

GRAHAM, P. H.; VANCE C. P. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, n. 2/3, p. 93-106, Mar. 2000.

HANDELSMAN, J.; BRILL, W. J. *Erwinia herbicola* isolates from alfafa plants may play a role in nodulation of alfafa by *Rhizobium meliloti* **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 49, n. 4, p. 818-821, Apr. 1985.

JANZEN, D. H. **Ecologia vegetal nos trópicos**. São Paulo: EPU, Editora da Universidade de são Paulo, 1980. 79 p.

JARVIS, B. D. W.; VAN BERKUM, P.; CHEN W. X.; NOUR, S. M.; FERNANDES, M. P.; CLEYET-MAREL, J. C.; GILLIS, M. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *rhizobium mediterraneum* and *Rhizobium tianshanense* to *Mesoorhizobium* gen. nov. **International Journal Systematic Bacteriology**, Reading, v. 47, n. 3, p. 895-898, July 1997.

JESEN, H. L. Nitrogen fixation in leguminous plants. I General characters of root-nodule bactéria isolated from species of *Medicago* and *Trifolium* in Australia. **Proceddings of the Linnean Society of New South Wales**, Sidney, v. 66, p. 98-1058, 1942

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

JESUS, E. C.; 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. *Bradyrhizobium*. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1984. v. 1, p. 242–244.

JORDAN, D. C. *Rhizobiaceae* Conn. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.), **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1984. v. 1, p. 242–244.

JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. Evolution of protein molecules. In: Munro, H. N. (Ed.). **Mammalian protein metabolism**. New York: Academic Press, 1969. p. 21-132.

KAWAI, F.; ZHANG, D.; SUGIMOTO, M. Isolation and characterization of acid and Al-tolerant microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 189, n. 2, p. 143-147, Aug. 2000.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA3: Integrated Software for MolecularEvolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. **Briefings in Bioinformatics**, London, v. 5, n. 2, p. 150-163, June 2004.

KENNEDY, A. C.; PAPENDICK, R. I. Microbial characteristics of soil quality. **Journal of Soil and Water Conservation**, Ankeny, v. 50, n. 3, p. 243-248, May/June 1995.

MAGALHÃES, F. M. M. et al. Ocorrência de nodulação em leguminosas florestais de terra firme nativas da região de Manaus, AM. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 12, n. 3, p. 509-514, set. 1982.

MEGA – MOLECULAR EVOLUTIONARY GENETICS ANALYSIS.
Disponível em: <<http://www.megasoftware.net/>> Acesso em: 06 jan. 2007.

MOREIRA, F. M. S. **Caracterização de estirpes de rizóbio isoladas de espécies florestais pertencentes a diversos grupos de diversos grupos de**

divergência de Leguminosae introduzidas ou nativas da Amazônia e Mata Atlântica. 1991. 152 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, RJ.

MOREIRA, F. M. S. Nodulação e crescimento de leguminosas em dois solos da Amazônia. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 197-204, maio/ago. 1995.

MOREIRA, F. M. S.; BIGNELL, D. E. **Standard methods for assessment of soil biodiversity in the context of land-use practice.** Nairobi, Quênia, 2006. (no prelo).

MOREIRA, F. M. S.; CRUZ, L. M.; FARIA, S. M.; MARSH, T.; MARTINEZ-ROMERO, E.; PEDROSA, F. O.; PITARD, R.; YOUNG, P. J. W. *Azorhizobium doebereineriae* sp nov. microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. **Systematic and Applied Microbiology**, New York, v. 29, n. 2, p. 197-206, 2006.

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

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

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

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

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOLVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of beta sub-class of Proteobacteria. **Nature**, London, v. 411, n. 2840, p. 948-950, June 2001.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION- BLAST< Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> Acesso em: 05 jan. 2007.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION-TAXONOMY. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html>> Acesso em: 6 jan. 2007

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. 188 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

NTSYSpc: versão. 2. 0, Software. ROHLF, F. J. Numerical taxonomy system, 2002.

PAUL, E. A.; CLARK, F. E. **Soil microbiology and biochemistry**. San Diego, CA: Academic, 1989. 275 p.

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

PEREIRA, J. C.; NEVES, M. C. P.; DROZDOWICZ, A. Quantificações das populações de bactérias em geral, de bactérias resistentes a antibióticos e de actinomicetos em solos. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1996. 20 p. (EMBRAPA-CNPAB. Documentos, 26).

PRASAD, P.; BASU, S.; BEHERA, N. A comparative account of the microbiological characteristics of soils under natural forest, grassland and crop field from Eastern India. **Plant and Soil**, The Hague, v. 175, n. 1, p. 85-91, Aug. 1994.

PUGASHETTI, B. K.; ANGLE, J. S.; WAGNER, G. H. Soils microorganisms antagonist towards *Rhizobium japonicum*, **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 45-49, Jan. 1982.

RAVERKAR, K. P.; KONDE, B. K. Effect of Rhizobium and Azospirillum lipoferum inoculation on the nodulation, yield and nitrogen uptake of peanut cultivars. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 106, p. 294-252, 1988.

REIS, V. M.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO S.; VOGEL J.; STOFFELS M.; GUYON S.; MAVINGUI P.; BALDANI, V. L. D.; SCHMID M.; BALDANI J. I.; BALANDREAU J.; HARTMANN A.; CABALLERO-MELLADO J. : *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-

fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, n. 6, p. 2155-2162, Aug. 2004.

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

SILVA, K. **Diversidade e Caracterização de bactérias diazotróficas associativas oriundas de diferentes sistemas de uso da terra na região Amazônica**. 2006. 73 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

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

TORSVIK, V.; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 5, n. 3, p. 240–245, June 2002.

TRINICK, M. J.; MILLER, C.; HADOBAS, P. A Formation and structure of root nodules induced on *Macroptilium atropurpureum* inoculated with various species of *Rhizobium*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 69, n. 7, p. 1520–1532, July 1991.

TRIPLETT, E. W.; BARTA, T. M. Trifolitoxin production and nodulation are necessary for the expression of superior nodulation competitiveness by *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii strain T24 on clover. **Plant Physiology**, Rockville, v. 85, n. 2, p. 335-342, Oct. 1987.

TRIPLETT, E. W.; SADOWSKY, M. J. Genetics of competition for nodulation of legumes. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 46, p. 399-428, 1992.

TSAI, S. M.; BARAIBAR, A. V. L.; ROMANI, V. L. M. Efeito de fatores do solo. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. (Ed.). **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 59-72.

VAN PELT, C.; VERDUIN, C. M.; GOESSENS, W. H. F.; VOS, M. C.; TUMMLER, B.; SEGONDS, C.; REUBSAET, F.; VERBRUGH, H.; ALEX VAN BELKUM. Identification of *Burkholderia* spp. in the Clinical

Microbiology Laboratory: Comparison of Conventional and Molecular Methods
Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 37, n. 7, p. 2158–2164, July 1999.

VENKATESWARLU, B.; HARI, K.; KATYAL, J. C. Influence of soil and crop factors on the native rhizobial populations in soils under dryland farming.
Applied Soil Ecology, Amsterdam, v. 7, n. 1, p. 1-10, Dec. 1997.

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

ZHANG, Z.; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **Journal of Computational Biology**, Larchmont, v. 7, n. 1/2, p. 203-214, Feb. 2000.

ZILLI, J. E.; VALISHESKI, R. R.; FREEIRE, F. R.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Assessment of cowpea *Rhizobium* diversity in cerrado areas of northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 281-287, Oct./Dec. 2004.

CAPÍTULO 4

RESUMO

LIMA, A.S. Eficiência simbiótica de isolados de bactérias que podem fixar nitrogênio em simbiose com siratro (*Macroptilium atropurpureum*) de solos sob diferentes usos na Amazônia. In: _____. **Densidade, Eficiência e Diversidade de Bactérias Fixadoras de N₂ que Nodulam o Siratro (*Macroptilium atropurpureum*) de Solos sob Diferentes Usos na Amazônia Ocidental**. 2006. Cap.2, 167p. Tese (Doutorado em Ciência do Solos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.¹

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência de isolados de bactérias que nodulam leguminosas (BNL) capazes de estabelecer simbiose com siratro (*Macroptilium atropurpureum*), como planta isca, de diferentes sistemas de uso da terra (SUT): floresta primária (F); floresta secundária em estágio avançado de regeneração (FA); floresta secundária em estágio inicial de regeneração (FI); agricultura (AG); agrofloresta (A) e pastagem (P). Em nenhuma das áreas dos SUT, estirpes exóticas foram introduzidas pelo uso de inoculantes. Foram coletadas amostras de solo em 98 pontos amostrais, na camada de 0-20 cm, utilizando trado de rosca, distribuídas em seis janelas de 9 ha cada, no Alto do Rio Solimões, AM. A distância entre pontos foi de geralmente 100 m (ou 50m para alguns deles); foram realizados quatro experimentos, um utilizando sacos plásticos estéreis (350 mL) e três utilizando garrafas escuras “long neck” (350 mL) recicladas com solução nutritiva de Jesen, os quais foram instalados em casa-de-vegetação do Laboratório de Microbiologia do Solo/DCS/UFLA, de Fevereiro a Março de 2006, usando siratro, que foi inoculado com 522 isolados de BNL. Depois de um mês, as plantas foram pesadas e a matéria seca da parte aérea, o número de nódulos, o peso seco de nódulos e a eficiência relativa foram avaliados em relação às plantas que receberam adubação nitrogenada e às que foram inoculadas com estirpes de referência. Um total de 478 isolados foram capazes de nodular o siratro. Os isolados, independentemente dos sistemas de uso da terra, apresentaram-se ineficientes ou com baixa, média e alta eficiência na fixação de N₂. Embora as populações nativas de BNL sejam pouco eficientes, são constituídas por isolados com eficiência variável, que incluem isolados ineficientes, pouco a muito eficientes, e podem ser recomendadas para testes de eficiência agronômica.

¹Orientadora: Fátima Maria de Souza Moreira – UFLA.

ABSTRACT

LIMA, A.S. Symbiotic efficiency of nitrogen-fixing bacteria able to nodulate siratro from soils under different uses in Amazon In: _____. **Density, efficiency and diversity of nitrogen-fixing bacteria nodulate siratro (*Macroptilium atropurpureum*) from soils under different uses in Western Amazon region.** 2006. Chap. 2, 167p. Thesis (Doctorate in Soil Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.¹

This paper aimed to evaluate efficiency of nitrogen-fixing bacteria (NFB) isolates able to establish symbiosis with siratro (*Macroptilium atropurpureum*), from soils under the land use systems (LUSs): primary forest, young secondary forest, old secondary forest, agriculture, agroforestry and pasture. In no one of the areas in each LUSs, exotic strains were introduced by using inoculants. Composed samples were collected at 0-20 cm depth in 98 sampling points distributed in 6 sampling grids (windows) with about 9 ha each, in Upper Solimões river – AM. Distance between points was usually 100 m (or 50 m for a few of them). Four experiments, one with plastic pouches and three with recycle dark long neck bottles (350 mL) with Jensen nutrient solution, were carried out in at Soil Microbiology Laboratory /DCS/UFLA, from February to March, 2006, by using siratro inoculated with 522 NFB isolates. After one month, plants were harvest and shoot dry matter weight, nodule number and relative efficiency were evaluated in relation to plants receiving mineral nitrogen and to plants inoculated with reference strains. A total of 478 isolates were able to establish symbiosis with siratro. Although, NFB populations were inefficient in promoting siratro growth, they owned isolates with variable efficiency from which some of them may be recommend for agronomic efficiency assays.

¹Guidance Committee : Fátima Maria de Souza Moreira – UFLA.

4.1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio constitui o macroelemento mais limitante na produtividade das culturas e o uso fertilizantes nitrogenados é um dos fatores de mais altos custos da agricultura. Um dos objetivos para a agricultura sustentável é o aproveitamento eficiente do N atmosférico (Graham & Vance, 2000). Dentre os sistemas biológicos capazes de aproveitar o nitrogênio diretamente da atmosfera, a simbiose rizóbio leguminosas tornou-se o sistema mais especializado, sendo responsável por 22% de todo N incorporado ao ecossistema terrestre (Peoples et al., 1995).

Grande parte dos solos da Amazônia apresenta sérias limitações ao cultivo devido à baixa fertilidade (Cochrane & Sanches, 1982; Demattê, 1988), não só são deficientes em nitrogênio e fósforo (Sanchez et al., 1982) como apresentam alguma deficiência em micronutrientes como cobre, ferro, manganês e zinco (Moreira et al., 2004). Nóbrega (2006), em estudo com solos submetidos a diferentes sistemas de uso no noroeste da Amazônia, identificou que os principais fatores limitantes ao cultivo são os baixos teores de fósforo e de boro e os altos valores de acidez ativa. No entanto, a calagem e a adubação química na Amazônia são bastante onerosas para os agricultores locais, geralmente pouco capitalizados, em função dos custos dos produtos, importados de outras regiões do país (Noda, 1998).

A utilização de estirpes tolerantes a fatores estressantes (Kawai et al., 2000; Watkin et al., 2000) e adaptadas a condições de baixos valores de pH e temperaturas elevadas (predominantes nos solos brasileiros), cujo imenso potencial ainda é pouco conhecido (Moreira et al., 1993; Pereira, 2000), pode aumentar a fixação biológica em solos ácidos e reduzir a adubação de acordo com os princípios da agricultura ecológica e economicamente sustentável.

Esforços na obtenção de estirpes mais eficientes têm aumentado, seja por seleção, seja pelo emprego de novas técnicas de biologia molecular (Peres et

al., 1984; Triplett & Sadowsky, 1992; Vargas et al., 1992). Estudos com as bactérias incluem também a seleção ou a construção genética de estirpes com maior eficiência de fixação do N₂ e capacidade competitiva, a inoculação de estirpes em concentrações elevadas e inoculações maciças por períodos prolongados (Dunigan et al., 1984; Oliveira & Vidor, 1984; Triplett & Sadowsky, 1992). Para solucionar o problema da competitividade e melhorar o desempenho simbiótico, vêm sendo empregadas estratégias que envolvem estudos com a planta e com as bactérias.

O Siratro (*Macroptilium atropurpureum*) como resultado da interação com bactérias que nodulam leguminosas (BNL) forma nódulos e fixa nitrogênio em uma taxa de fixação biológica de N₂ que varia de 70 a 181 (kg/ha/ano) (Moreira & Siqueira, 2006). É considerado uma leguminosa promíscua, pois nodula com bactérias de vários gêneros, como *Bradyrhizobium* (Jordan, 1984), *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (Bromfield & Barran, 1990; Trinick et al., 1991), *Azorhizobium doebereineriae* (syn. *A. johannae*) (Moreira et al., 2006) (Gonçalves & Moreira, 2004), *Mesorhizobium loti* (Jordan et al., 1984) e *Burkholderia sp.* (Moulin et al., 2001); é de fácil manuseio e, assim, pode ser utilizado com sucesso em estudos que tenham como objetivo a captura destas.

Devido à diversidade de espécies, microrganismos e condições dos solos da Amazônia, estudos devem ser intensificados para que se compreenda melhor esta associação, a fim de favorecer o aumento da eficiência e da viabilidade ecológica e econômica de sistemas agrícolas e agroflorestais implantados na Amazônia. A seleção de isolados de rizóbio que possuam alta capacidade fixadora de nitrogênio, resistência à acidez e ao alumínio tóxico é fundamental para a produção e utilização de inoculantes pelos agricultores para o incremento na produção de leguminosas não só na região Amazônica, mas também em outras regiões do Brasil.

Diante disto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência simbiótica e a diversidade genotípica de bactérias que fixam nitrogênio em simbiose com siratro (*Macropodium atropurpureum*) em solo sob diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Amostragem, captura através de planta isca e isolamento de Bactérias que Nodulam Leguminosas (BNL)

Os isolados foram obtidos através do método de inoculação de planta isca, siratro (*Macropodium atropurpureum*), com suspensões de amostras de solo, coletadas em 98 pontos amostrais na camada de 0-20 cm, utilizando-se trado de rosca, totalizando 30 pontos amostrados na floresta secundária em estágio inicial de regeneração (FI), 10 pontos na floresta secundária em estágio avançado de regeneração (FA), 17 pontos na floresta primária (FP), 13 pontos na pastagem (P), 18 na agricultura (AG) e 10 na agrofloresta (A). As áreas compreendem as comunidades de Guanabara II e de Nova Aliança e a cidade de Benjamim Constant, situadas a aproximadamente 1.100 km a oeste de Manaus, na base do Rio Solimões. Após o destacamento manual, todos os nódulos das raízes de cada planta-isca foram utilizados para o isolamento das BNL. A descrição detalhada dos tratamentos e coleta das amostras de solos, assim como da caracterização das áreas de estudo, e as análises química e física do solo e de diversidade dos isolados de BNL encontram-se nos capítulos 2 e 3.

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

No experimento de captura foram obtidos 1890 isolados, distribuídos em 112 grupos de acordo com suas características culturais. Foi feita uma seleção de isolados que contemplasse representantes de todos os grupos representativos de todos os sistemas de uso da terra (SUT). Então, foram realizados três sorteios de 3 isolados de cada grupo para os grupos que possuíam número total de indivíduos menor ou igual a 9; para os grupos que possuíam o número total de isolados menor do que 9, todos foram selecionados. Obtiveram-se 266 isolados no primeiro sorteio, 139 no segundo e 117 no terceiro, totalizando 522 isolados.

Os 522 isolados foram autenticados com o objetivo de verificar a capacidade de nodular no hospedeiro de origem, siratro, e para isso foram instalados quatro experimentos sucessivos, um utilizando sacos plásticos estéreis e três utilizando garrafas escuras “*long neck*” (350 mL) com solução nutritiva (Anexo 3A).

O primeiro experimento foi conduzido em casa-de-vegetação do Laboratório de Microbiologia do Solo – DCS – UFLA, de abril a maio de 2005, em sacos plásticos estéreis da Millipore de 300 mL, com solução nutritiva de Jensen isenta de nitrogênio (K_2HPO_4 0,2 g L⁻¹; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g L⁻¹, NaCl 0,2 g L⁻¹, $CaHPO_4$ 1 g L⁻¹, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,1 g L⁻¹; H_3BO_3 2,86 mg L⁻¹; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 2,03 mg L⁻¹; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,22 mg L⁻¹; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,08 mg L⁻¹ e $Na_2MoO_4 \cdot H_2O$ 0,09 mg L⁻¹) diluída quatro vezes e esterilizada (Jensen, 1942; Vincent, 1970). Foram colocadas duas plantas de siratro (*Macroptilium atropurpureum*) por saco, as quais foram inoculadas com 163 isolados de BNL. O experimento foi constituído de 178 tratamentos, sendo 163 isolados mais controles positivos, constituídos pela inoculação de 13 estirpes tipo e de referência e mais dois controles negativos (com nitrogênio e sem inoculação e sem nitrogênio e sem inoculação) (Anexo 3A).

As plantas foram inoculadas com 1mL de culturas crescidas em meio de cultura 79 (Fred & Waksman, 1928) semi-sólido de cada isolado ou estirpes na fase log de seu crescimento (quatro dias de cultivo a 28°C para as de crescimento rápido e seis dias para os de crescimento lento), em cada semente, e foram utilizadas 3 repetições por diluição (3 sacos plásticos com plantas de siratro para cada diluição). Dois tratamentos controle foram adicionados, uma testemunha com nitrogênio mineral e testemunha sem N e sem inoculação (testemunha absoluta), para garantia da ausência de contaminação e para comparação com as plantas inoculadas. As testemunhas com nitrogênio mineral receberam nitrogênio na forma de uma solução de nitrato de potássio (KNO₃), de modo que cada saco plástico tivesse 70 ppm de nitrogênio ou 0,5% de KNO₃ (Vincent, 1970).

Também na casa-de-vegetação do Laboratório de Microbiologia do Solo – DCS – UFLA foram montados 3 experimentos: de janeiro a fevereiro de 2006, em garrafas “*long neck*” (350 mL) escuras e recicladas. Para a montagem das garrafas foram utilizados papel de filtro, fita adesiva e papel alumínio. O papel de filtro foi cortado de forma a apresentar a mesma altura da garrafa para servir como suporte às raízes. Posteriormente, estas foram autoclavadas por 60 minutos a uma pressão de 1,5 kg/cm², a 127°C com papel de filtro mais a solução nutritiva de Jensen modificada (K₂HPO₄ 0,2 g L⁻¹; MgSO₄·7H₂O 0,2 g L⁻¹, NaCl 0,2 g L⁻¹, CaHPO₄ 1 g L⁻¹, FeCl₃·6H₂O 0,1 g L⁻¹; H₃BO₃ 2,86 mg L⁻¹; MnSO₄·4H₂O 2,03 mg L⁻¹; ZnSO₄·7H₂O 0,22 mg L⁻¹; CuSO₄·5H₂O 0,08 mg L⁻¹ e Na₂MoO₄·H₂O 0,09 mg L⁻¹), diluída quatro vezes. As sementes foram desinfestadas e escarificadas com ácido sulfúrico puro por 10 minutos e com lavagens sucessivas em água destilada estéril. Posteriormente, foram imersas em água estéril por 2 horas e colocadas em placas de Petri com algodão umedecido (autoclavado) por 12 horas, em câmara de crescimento a 28°C. Deste lote, vinte sementes também foram colocadas em meio de cultura sólido 79 para a

verificação de possíveis contaminações. As sementes pré-germinadas foram inseridas manualmente no orifício da garrafa com auxílio de uma pinça, que estava coberta com papel alumínio. O primeiro experimento foi constituído de 66 tratamentos, sendo 51 isolados, mais controles positivos, constituídos pela inoculação de 13 estirpes tipo e de referência, mais dois controles negativos (com nitrogênio e sem inoculação e sem nitrogênio e sem inoculação). O segundo experimento foi constituído de 177 tratamentos, sendo 162 isolados mais os controles. O terceiro experimento teve 160 tratamentos, sendo 145 isolados mais os controles (Anexo 3A).

Os quatro experimentos foram instalados em casa-de-vegetação durante 30 dias, utilizando delineamento inteiramente casualizado, todos com 3 repetições por tratamento. Para a composição dos tratamentos inoculou-se 1 mL de meio 79 semi-sólido com os isolados na fase log de seu crescimento (quatro dias de cultivo a 28°C para os de crescimento rápido e seis dias para os de crescimento lento) em cada semente. Nos controles sem inoculação e sem adição de nitrogênio foi inoculado apenas 1 mL de meio 79 sem inóculo, e nos controles com N mineral, aplicaram-se 70 mg de N (NH_4NO_3) na solução nutritiva, no dia do plantio.

Estas foram comparadas a estirpes tipo e de referência:

- SEMIA 5019/ BR29, estirpe recomendada como inoculante para a soja (*Glycine max* (L.)Merrill) pela RELARE (Reunião de laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbiológicos de interesse agrícola) e identificada como *Bradyrhizobium elkanii*;
- ATCC 10324^T (BR 111), estirpe tipo de *Bradyrhizobium japonicum*;
- USDA 76^T (BR113), estirpe tipo de *Bradyrhizobium elkanii*;

- SEMIA 6145/ BR2001, estirpe previamente recomendada pela RELARE para inoculação de caupi;
- INPA 0311B, estirpe isolada da Amazônia eficiente para caupi em vasos de Leonard (Lacerda et al.,2004), vasos com solo e campo (Lacerda et al., 2004; Soares et al., 2006), atualmente recomendada como inoculante para caupi pela RELARE;
- BR5401^T, estirpe tipo de *Azorhizobium doebereinae*;
- NZP2213^T (BR7801) *Mesorhizobium loti*;
- ATCC 14482^T (BR 10052), estirpe tipo de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*;
- ATCC 14480^T (BR 7606), estirpe tipo de *R. leguminosarum* bv *trifolii*;
- CNF42^T (BR10026), estirpe tipo de *R. etli*;
- CIAT 899^T (BR322), estirpe tipo de *R. tropici* type II B;
- NZP 4027^T (BR7411), estirpe tipo de *Sinorhizobium meliloti*;
- USDA 205^T (BR112), estirpe tipo *S. fredii* cv *fredii*.

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

$$ER = \frac{MSPA_{inoculada}}{MSPA_{comN}} \times 100$$

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

4.2.3 Análise dos Dados

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o programa SISVAR, versão 4.3 (Ferreira, 2000). Os efeitos dos tratamentos foram comparados pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

No experimento de autenticação por meio da inoculação no hospedeiro original, os 164 isolados inoculados nos sacos plásticos estéreis, 139 isolados nodularam e 25 não nodularam siratro (Anexo 3 A). A eficiência entre os tratamentos do experimento em sacos plásticos, comparada pelo crescimento das plantas e número de nódulos, foi comprometida devido ao desenvolvimento de fungos e algas. Por esse motivo não foi avaliada a eficiência simbiótica dos isolados e os outros experimentos foram conduzidos em garrafas que, por serem de cor âmbar, ou seja, escuras, impedem o desenvolvimento de algas, além de possuírem a vantagem de serem mais baratas e de fácil manuseio.

No primeiro experimento utilizando as garrafas, foram inoculados 51 isolados; 49 isolados nodularam e 2 não nodularam siratro. No segundo, 162 isolados foram inoculados nas garrafas; 153 isolados nodularam e 9 não nodularam siratro (Anexo 3 A). Finalmente, no terceiro dos 145 isolados inoculados, 137 isolados nodularam e oito isolados não nodularam o siratro (Anexo 3 A), totalizando 478 isolados que nodularam o siratro. A autenticação dos isolados nos três experimentos foi melhor que com sacos plásticos, pois 95% dos isolados inoculados nodularam o hospedeiro de origem, enquanto nos sacos plásticos este percentual foi de 85%. Portanto, a utilização de garrafas “long

neck”(350 mL) como vasos pode ser recomendada com o objetivo de autenticar os isolados de BNL pela praticidade e baixo custo.

Os experimentos foram analisados separadamente. As médias da matéria seca da parte aérea (MSPA), eficiência relativa (ER), média do número e matéria seca de nódulos (NN e NSM), por experimento, encontram-se nas tabelas 9,10 e 11 do anexo 3A.

Não foi verificada a presença de nódulos nas testemunhas com e sem nitrogênio, comprovando que não houve contaminação dos experimentos. No primeiro experimento, 27 isolados (53%), 11 da agricultura e da agrofloresta, um da floresta primária e da floresta secundária estágio avançado de regeneração e 3 da floresta secundária estágio inicial de regeneração, e as referências BR7411, INPA0311B, BR7606, BR7801, BR322, BR10026, BR10052 e BR111, tiveram o crescimento das plantas igualado ao controle absoluto (testemunha sem nitrogênio e sem inoculação) (Figura). Quanto ao número de nódulos, a maioria dos isolados tiveram número de nódulos acima de 20, apenas 5 tiveram número de nódulos em torno de 10 e a Br322 teve apenas 5 nódulos, mas a maioria dos nódulos dos isolados e das estirpes de referência e tipo tiveram MSN variando de 25 a por volta de 58 mg. BR7411, BR10026, BR10052, BR7801, BR322 tiveram NN e MSN altos, porém baixa MSPA. No entanto, a BR 5401 e a BR2001 tiveram NN e MSN bons e alta MSPA.

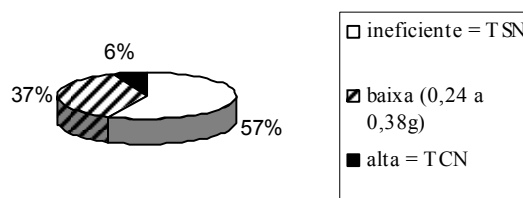


FIGURA 1 Porcentagem de isolados de bactérias capazes de nodular o siratro do primeiro experimento com garrafas de 350 mL por categoria de eficiência.

No segundo experimento, a maioria dos tratamentos, 55 isolados (34%), 17 da agricultura, 22 da agrofloresta, 2 da floresta secundária estágio avançado de regeneração, 11 da floresta secundária estágio inicial de regeneração e 2 da pastagem, e as referências INPA0311B, BR7411, em média, tiveram número de nódulo igual ou superior a 25 e MSN variando de 10 a 37 mg. A BR7606 e o isolado J1-10-1-3 tiveram considerável NN e MSN e alta MSPA, superior à testemunha nitrogenada.

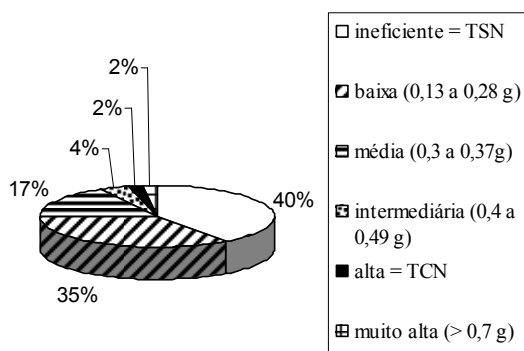


FIGURA 2 Porcentagem de isolados de bactérias capazes de nodular o siratro do segundo experimento com garrafas de 350 mL por categoria de eficiência.

No terceiro experimento, 58 isolados (40%), 25 da agricultura, 9 da agrofloresta, 8 da floresta primária, 2 da floresta secundária estágio avançado de regeneração, 10 da floresta secundária estágio inicial de regeneração e 4 da pastagem, e as referências BR322, BR7411, INPA0311B, BR7606, BR 5401 e BR2001, também tiveram o crescimento das plantas igualado ao controle absoluto (testemunha sem nitrogênio e sem inoculação). A maioria teve, em média, número de nódulo igual ou superior a 26 e MSN variando de 27 a 82 mg. Porém, observando a estirpe INPA0311b, que apresentou, em média, 12 nódulos com média da MSN em torno de 62 mg, mas baixa MSPA, o mesmo se repetiu para as estripes BR322, BR7411 e BR7606, entre outras; já BR29, BR113 e o isolado J2-22-3-1 tiveram, em média, NN igual ou superior a 12, com MSN acima de 19 mg e alta MSPA.

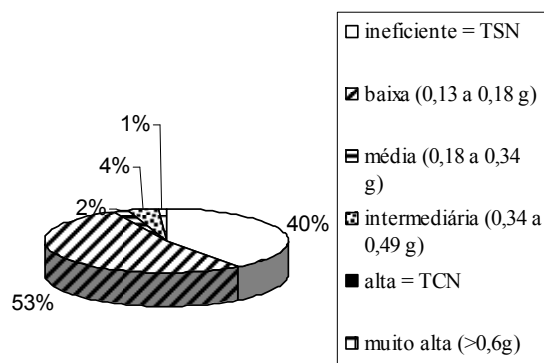


FIGURA 3 Porcentagem de isolados de bactérias capazes de nodular o siratro do terceiro experimento com garrafas de 350 mL por categoria de eficiência.

Estes dados indicam que mesmo tendo nódulos e uma razoável matéria seca de nódulos, a maioria das plantas apresentaram uma carência de N, indicada por uma clorose, capaz de comprometer o crescimento, em especial da parte aérea, como expressam os dados de MSPA e ER. Possivelmente, o aporte de nitrogênio dependente unicamente da fixação simbiótica não foi capaz de

atender às necessidades da planta para que esta tivesse um melhor desenvolvimento; então, estes isolados foram ineficientes para estabelecer simbiose com o siratro.

Por outro lado, no primeiro experimento, 19 isolados (37%); no segundo 93 isolados (57%); e no terceiro (55%), 80 isolados, proporcionaram boa nodulação (NN e MSN), com aumento no rendimento de matéria seca da parte aérea (MSPA) e ER em relação ao controle (testemunha sem nitrogênio e sem inoculação), mas inferior ao controle com nitrogênio e sem inoculação, sendo estes isolados considerados pouco eficientes na promoção do crescimento das plantas de siratro. Estes isolados pouco eficientes foram a maioria no segundo e no terceiro experimento. Todos estes isolados vieram de populações também pouco eficientes.

As figuras de 4 a 9 mostram os isolados que mais se destacaram, comparados com as testemunhas e as estirpes de referência. Os isolados J2-19A-1-18 (agrofloresta), J4-62-1-5(floresta), J2-17A-1-1 (agrofloresta) e as referências BR2001 e BR5401, do primeiro experimento, a referência BR7606 do segundo e o isolado J2-27-2-11 (agricultura) e a referência BR113 tiveram o crescimento das plantas igualado ao controle com nitrogênio e sem inoculação, sendo considerados eficientes, ou de média eficiência. E os isolados J1-10-1-3 (floresta) do segundo experimento, e J2-22-3-1 (agricultura) e a referência Br29 do terceiro experimento, foram eficazes para o acúmulo de matéria seca da parte aérea do siratro em comparação com o tratamento com fertilização mineral, tendo o crescimento das plantas superior a este controle, sendo, então, consideradas muito eficientes, ou seja, de eficiência alta. As MSPA das testemunhas sem inoculação e com e sem nitrogênio nos três experimentos foram muito semelhantes, e as estirpes tipo e de referência também não variaram muito entre os experimentos, com exceção BR7606, que no primeiro e no segundo experimentos foi ineficiente, mas no terceiro experimento foi eficiente;

e a BR29, que no primeiro e segundo experimentos foi pouco eficiente, mas no terceiro foi muito eficiente. Estas variações não comprometeram os resultados, indicando que os experimentos, apesar de terem sido conduzidos em épocas diferentes, tiveram um desempenho semelhante.

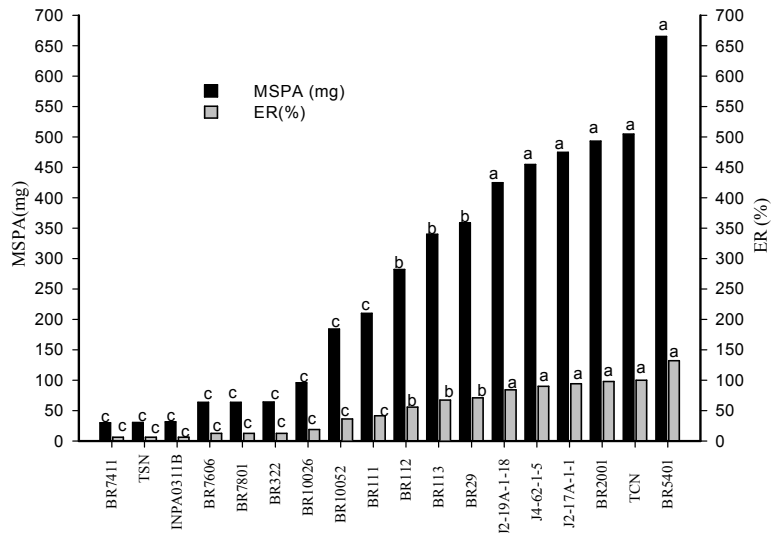


FIGURA 4 Matéria seca da parte aérea (MSPA), em mg, e eficiência relativa (ER), em porcentagem, induzida pelos tratamentos no primeiro experimento com siratro em garrafas “long neck” (350 mL).

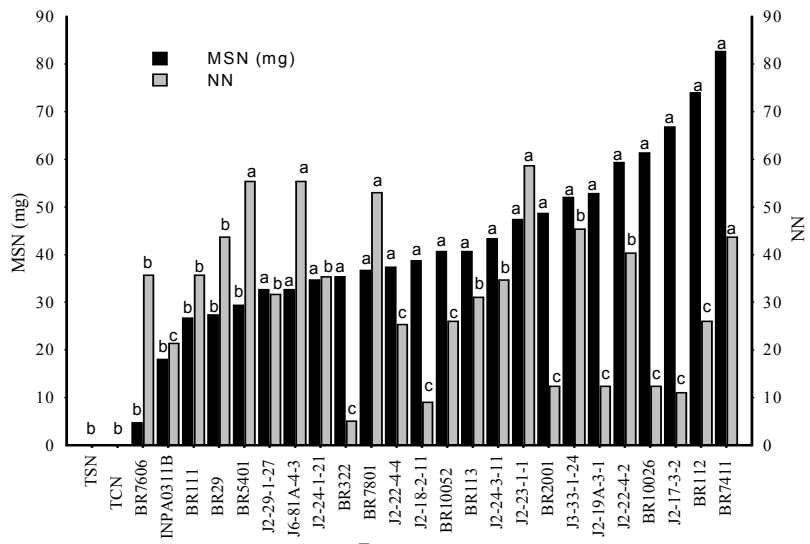


FIGURA 5 Número de nódulos (NN) e matéria seca de nódulos (MSN) em mg, induzida pelos tratamentos no primeiro experimento com siratro em garrafas “long neck” (350 mL).

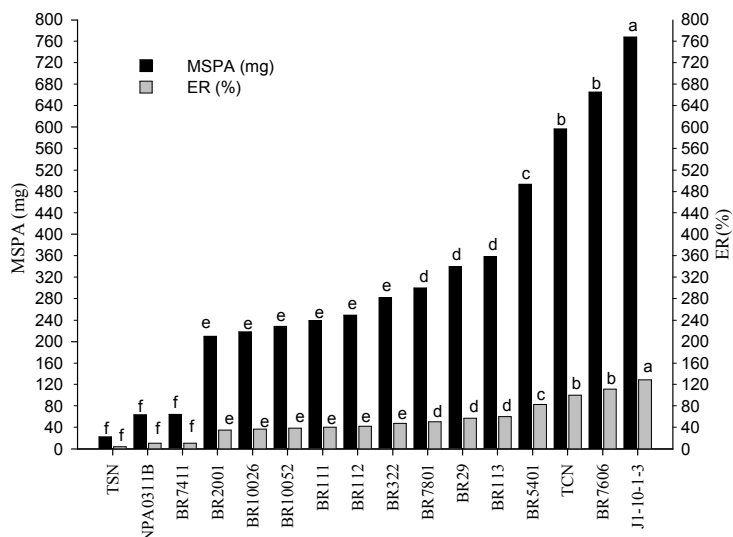


FIGURA 6 Matéria seca da parte aérea (MSPA), em mg, e eficiência relativa (ER), em porcentagem, induzida pelos tratamentos no segundo experimento com siratro em garrafas “long neck” (350 mL).

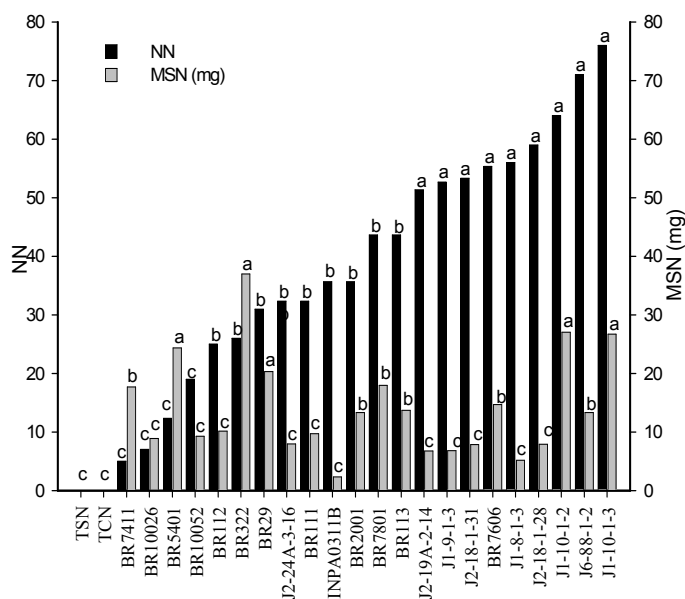


FIGURA 7 Número de nódulos (NN) e matéria seca de nódulos (MSN) em mg, induzida pelos tratamentos no segundo experimento com siratro em garrafas “long neck” (350 mL).

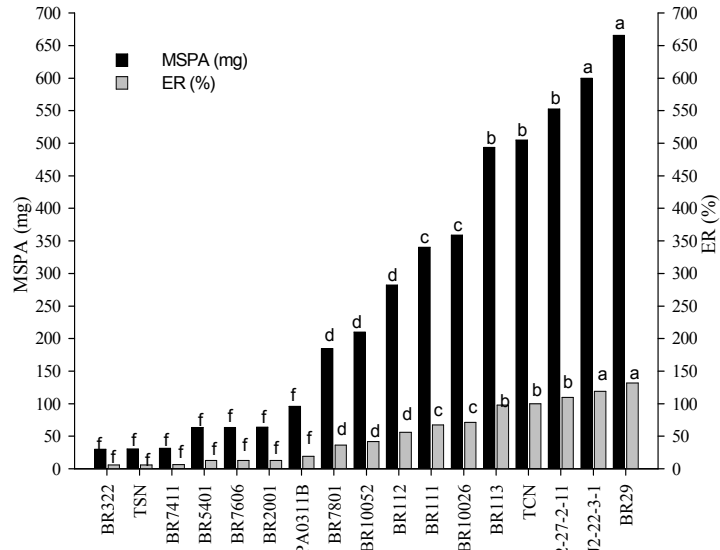


FIGURA 8 Matéria seca da parte aérea (MSPA), em mg, e eficiência relativa (ER), em porcentagem, induzida pelos tratamentos no terceiro experimento com siratro em garrafas “long neck” (350 mL).

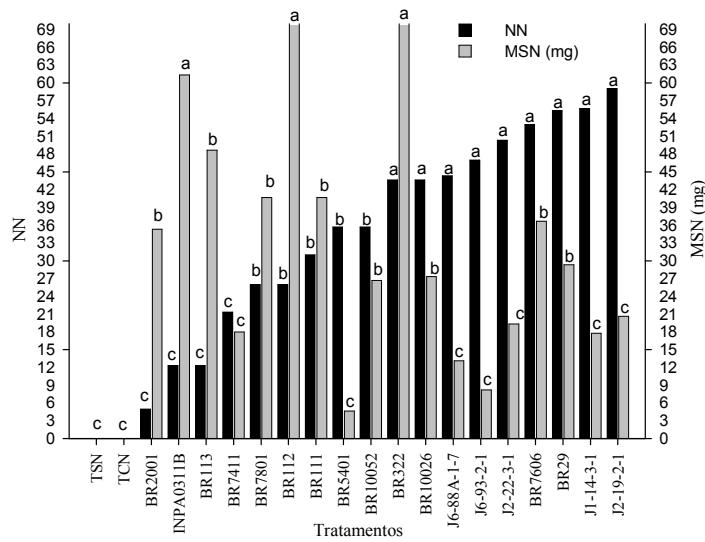


FIGURA 9 Número de nódulos (NN) e matéria seca de nódulos (MSN) em mg, induzida pelos tratamentos no terceiro experimento com siratro em garrafas “long neck” (350 mL).

Trabalhos desenvolvidos com leguminosas tropicais em geral mostram que rizóbio nativo é ineficaz ou de baixa eficácia (Stamford et al., 1995; Thies et al., 1991; Vidor et al., 1979). Martins et al. (1997) também encontraram isolados de rizóbios nativos da região Nordeste do Brasil com baixa, média e alta eficiência na fixação de N_2 . Apesar de serem oriundos de populações nativas pouco eficientes, os isolados, independentemente dos sistemas de uso da terra, apresentaram baixa, média e alta eficiência na fixação de N_2 .

A maioria dos isolados mostrou-se promissora para a produção de inoculantes, pois proporcionou boa nodulação (NN e MSN), com aumento no rendimento de matéria seca da parte aérea (MSPA). Isolados de rizóbio eficientes na fixação do N_2 podem contribuir para aumentar a produção de grãos e reduzir os custos com fertilizantes nitrogenados no Brasil.

4.4 CONCLUSÕES

Os isolados, independentemente dos sistemas de uso da terra, apresentaram baixa, média e alta eficiência na fixação de N₂.

As populações nativas de BNL pouco eficientes são constituídas por isolados com eficiência variável que incluem estirpes ineficientes, pouco a muito eficientes, e que podem ser recomendadas para testes de eficiência agrônômica.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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**, Hague, v. 46, p. 3-16, 1971. Supplement 1.

BROMFIELD, E. S. P.; BARRAN, L. R. Promiscuous nodulation of *Phaseolus vulgaris*, *Macroptilium atropurpureum*, and *Leucaena leucocephala* by indigenous *Rhizobium meliloti*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 36, n. 5, p. 369–372, May 1990.

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

DEMATTE, J. L. I. **Manejo dos solos ácidos dos trópicos úmidos: Região Amazônica**. Campinas: Fundação Cargil, 1988. 251 p.

DUNIGAN, E. P.; BOLLIICH, P. K.; HUTCHINSON, R. L.; HICKS, P. M.; ZAUNBRECHER, F. C.; SCOTT, S. G.; MOWERS, R. P. Introduction and survival of an inoculant strain of *Rhizobium japonicum* in soil. **Agronomy Journal**, Madison, v. 76, n. 3, p. 463-466, May/June 1984.

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

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

GONÇALVES, M.; MOREIRA, F. M. S. Specificity of the Legume *Sesbania virgata* (Caz.)Pers. and Its Nodule Isolates *Azorhizobium johannae* with other Legume Hosts and Rhizobia. I **Symbiosis**, Rehovot, v. 36, n. 1, p. 57-68, 2004.

GRAHAM, P. H.; VANCE C. P. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, n. 2/3, p. 93-106, Mar. 2000.

JESEN, H. L. Nitrogen fixation in leguminous plants. I General characters of root-nodule bacteria isolated from species of *Medicago* and *Trifolium* in

Australia. **Proceedings of the Linnean Society of New South Wales**, Sidney, v. 66, p. 98-1058, 1942

JORDAN, D. C. *Rhizobiaceae* Conn. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1984. p. 242-244.

KAWAI, F.; ZHANG, D.; SUGIMOTO, M. Isolation and characterization of acid and Al-tolerant microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 189, n. 2, p. 143-147, Aug. 2000.

MARTINS, L. M. U.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the northeast of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, n. 5/6, p. 1005-1010, May/June 1997.

MOREIRA, F. M. S.; CRUZ, L. M.; FARIA, S. M.; MARSH, T.; MARTINEZ-ROMERO, E.; PEDROSA, F. O.; PITARD, R.; YOUNG, P. J. W. *Azorhizobium doebereineriae* sp nov. microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. **Systematic and Applied Microbiology**, New York, v. 29, n. 2, p. 197-206, 2006.

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

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

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOLVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of beta sub-class of Proteobacteria. **Nature**, London, v. 411, n. 2840, p. 948-950, June 2001.

NÓBREGA, R. S. A. **Efeito de sistemas de uso da terra na Amazônia sobre atributos do solo, ocorrência, eficiência e diversidade de bactérias que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]**. 2006. 188 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

- OLIVEIRA, L. A.; VIDOR, C. Capacidade competitiva de estirpes de *Rhizobium japonicum* em solos com alta população deste *Rhizobium*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 8, n. 1, p. 49-55, jan./abr. 1984.
- PEOPLES, M. B.; HERRIDGE, D. F.; LADHA, J. K. Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 174, n. 1/2, p. 23-28, July 1995.
- PEREIRA, E. G. **Diversidade de rizóbios isolados de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia**. 2000. 93 p. Tese (Doutorado)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- PERES, J. R. R.; VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R. Variabilidade de eficiência em fixar nitrogênio entre isolados de uma mesma estirpe de *Rhizobium japonicum*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 8, n. 2, p. 193-196, maio/ago. 1984.
- SANCHEZ, P. A.; BANDY, D. E.; VILLACHICA, J. H.; NICHOLAIDES, J. J. Amazon basin soils: management for continuous crop production. **Science**, Washington, v. 216, n. 4548, p. 821-827, 1982.
- STAMFORD, N. P.; MEDEIROS, R.; MESQUITA, J. C. P. Avaliação de estirpes de rizóbio para jacatupé em regime de temperatura elevada. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 19, n. 1, p. 49-54, jan./abr. 1995
- THIES, J. E. et al. Subgroups of de Cowpea miscellany: symbiotic specificity within Bradyrhizobium spp. for *Vigna unguiculata*, *Phaseolus lunatus*, *Arachis hypogaea* and *Macroptilium atropurpureum*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 5, p. 1540-1545, May 1991.
- TRINICK, M. J.; MILLER, C.; HADOBAS, P. A Formation and structure of root nodules induced on *Macroptilium atropurpureum* inoculated with various species of *Rhizobium*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 69, n. 7, p. 1520-1532, July 1991.
- TRIPLETT, E. W.; BARTA, T. M. Trifolitoxin production and nodulation are necessary for the expression of superior nodulation competitiveness by *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii strain T24 on clover. **Plant Physiology**, Rockville, v. 85, n. 2, p. 335-342, Oct. 1987.

TRIPLETT, E. W.; SADOWSKY, M. J. Genetics of competition for nodulation of legumes. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 46, p. 399-428, 1992.

VARGAS, M. A. T.; MENDES, I. de C.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R. **Duas novas estirpes de rizóbio para a inoculação da soja**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1992. 3 p. (EMBRAPA-CPAC. Comunicado técnico 62).

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

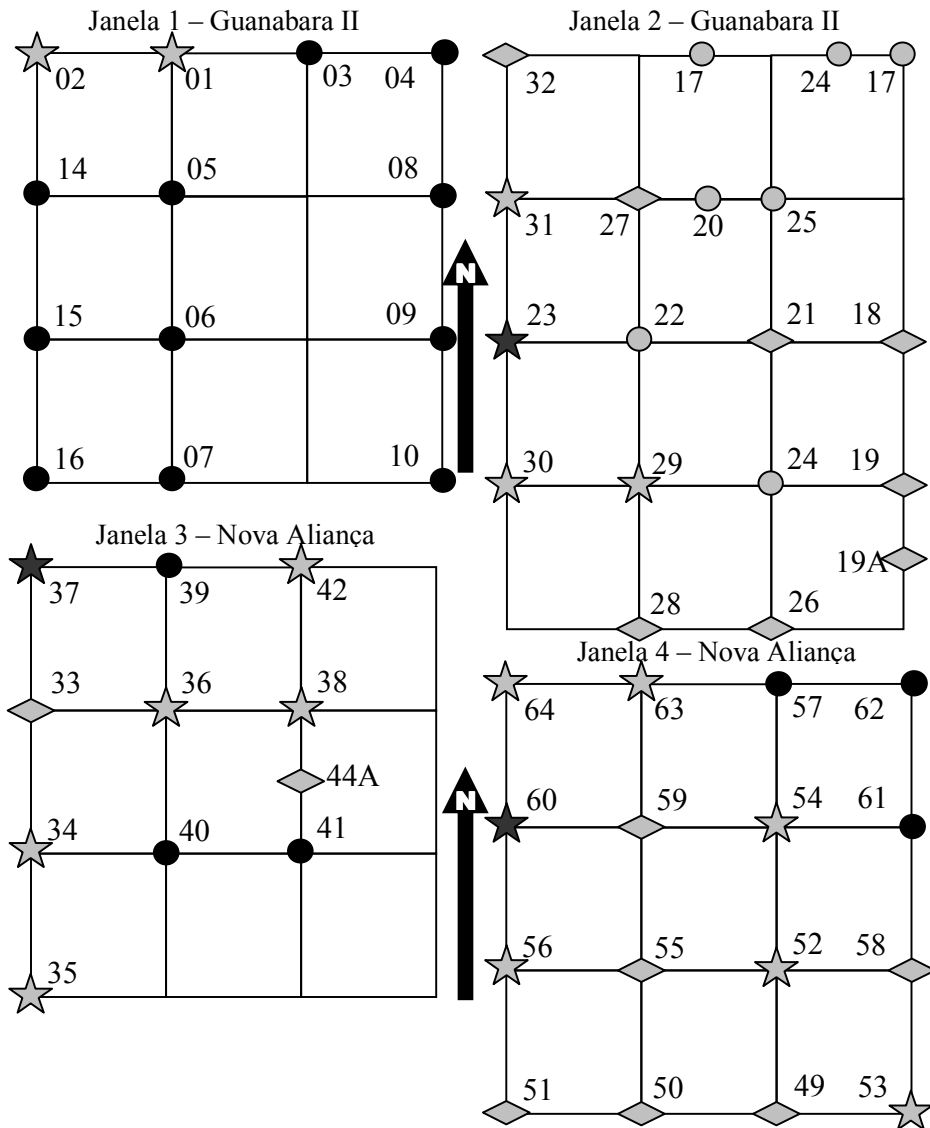
VIDOR, C.; BROSE, E.; PEREIRA, J. S. Competição por sítios de infecção nodular entre estirpes de *Rhizobium japonicum* em cultivares de soja (*Glycine Max* (L) Merrill.). **Agronomia Sulriograndense**, Porto Alegre, v. 15, n. 2, p. 227-238, 1979.

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

ANEXOS

ANEXO A		Página
1A	Croqui de campo das áreas amostradas-----	143
2A	Caracterização cultural -----	145
3A	Tratamentos e Resultados do experimento de autenticação-----	148

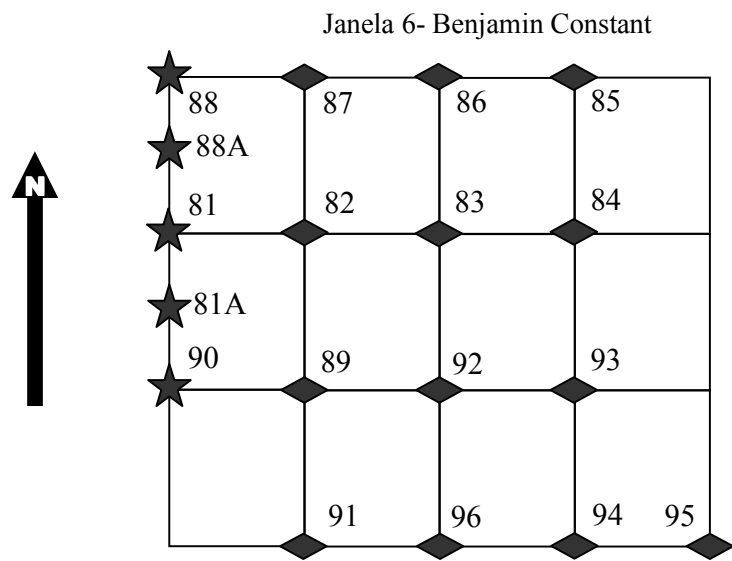
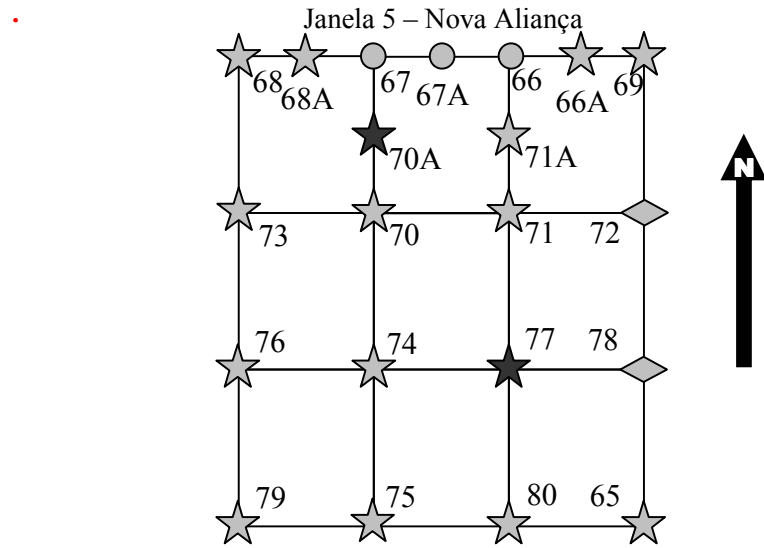
1A Croqui de campo dos pontos amostrados.



LEGENDA

● Floresta primária	★ Floresta Secundária Estágio avançado regeneração
○ Agrofloresta	☆ Floresta Secundária Estágio inicial regeneração
◇ Agricultura	◆ Pastagem

ANEXO 01 Croqui de campo dos pontos amostrados (continuação).



LEGENDA

● Floresta primária	★ Floresta Secundária Estágio avançado regeneração
○ Agrofloresta	☆ Floresta Secundária Estágio inicial regeneração
◇ Agricultura	◆ Pastagem

Anexo 2 A (Caracterização cultural)

A) TABELA 1 Caracterização cultural de isolados de bactérias que nodulam leguminosas isoladas de siratro cultivado com solução de Jensen e inoculados com diluição de suspensão de solos, sob diferentes sistemas de uso da terra (SUT), localizados no Alto Rio Solimões, AM (significado das letras e palavras no final da tabela F). G - grupo, J - janela, P-ponto, SUT, Dil. - diluição, I - isolado, Ap.- dias de aparecimento da colônia, pH, Cor, P – produção de goioma, C – consistência, Óp. óptica, Ind. Absorção do indicador, D. diâmetro inicial, D.2 diâmetro final, For. - forma, El. elevação, B - borda, Sup – superfície.

G	NI	Ap	pH	Cor	P	C	Óp	Ind	D.	For.	El.	B	Sup
1	13	3	Ac.	A	M	G	O	S	1	C2	L	I	L
2	16	3	Ac.	A	A	G	T	S	1	C2	Pul.	I	L
3	27	3	Ac.	A	M	G	O	N	1	C2	P	I	L
4	134	3	Ac.	A	M	G	T	N	1	C2	P	I	L
5	58	3	Ac.	C1	M	G	T	N	1	C2	Pul.	I	L
6	35	3	Ac.	A	M	G	O	N	1	C2	P	I	L
7	481	3	Ac.	C1	A	G	T	S	1	C2	Pul.	I	L
8	9	3	Ac.	A	M	G	T	S	1	C2	C3	I	L
9	4	3	Ac.	C1	A	G	T	N	1	C2	Pul.	I	L
10	13	3	Ac.	C1	A	G	T	S	1	C2	Pul.	I	L
11	9	3	N	C1	A	G	T	S	1	C2	C3	I	L
12	2	3	N	C1	A	G	O	N	1	C2	L	I	L
13	29	3	N	C1	A	G	T	N	1	C2	C3	I	L
14	2	3	N	C1	A	G	T	N	1	C2	P	I	L
15	10	3	N	C1	A	G	T	N	1	C2	L	I	L
16	6	3	N	A	A	G	T	N	1	C2	C3	I	L
17	3	3	N	C1	A	G	B	N	1	C2	C3	I	L
18	2	3	N	A	A	G	B	N	1	C2	C3	I	L
19	52	3	N	C1	A	G	T	S	1	C2	Pul.	I	L
20	185	3	N	C1	A	G	T	S	1	C2	C3	I	L
21	4	3	N	C1	M	G	T	S	1	C2	C3	I	L
22	2	3	N	C1	M	G	T	S	1	C2	C3	I	L
23	1	3	N	C1	A	G	B	N	1	C2	Pul.	I	L
24	1	3	N	C1	A	G	B	S	1	C2	Pul.	I	L
25	1	3	N	C1	A	G	T	S	1	C3	Pul.	I	L
26	3	3	N	A	A	G	T	S	1	C2	Pul.	I	L
27	2	3	N	A	A	G	T	N	1	C2	Pul.	I	L
28	2	3	N	A	M	G	T	S	1	C2	L	I	L
29	2	3	N	A	M	G	T	S	1	C2	P	I	L

... continua...

TABELA 1, Cont.

30	2	3	N	A	M	G	T	S	1	C2	Pul.	I	L
31	2	3	N	A	M	G	O	S	1	C2	Pul.	I	L
32	11	3	N	C1	P	G	O	N	1	C2	P	I	L
33	11	3	N	C1	M	G	O	N	1	C2	P	I	L
34	7	3	N	A	P	G	O	N	1	C2	P	I	L
35	2	3	N	A	M	G	O	N	1	C2	P	I	L
36	28	3	N	A	M	G	O	N	1	C2	C3	I	L
37	13	3	N	A	M	G	T	N	1	C2	C3	I	L
38	4	3	N	A	M	G	B	N	1	C2	C3	I	L
39	37	3	N	C1	M	G	O	N	1	C2	C3	I	L
40	10	3	N	C1	M	G	O	N	1	C2	L	I	L
41	69	3	N	C1	M	G	T	N	1	C2	C3	I	L
42	13	3	N	C1	M	G	T	N	1	C2	L	I	L
43	1	3	N	C1	P	G	T	N	1	C2		I	L
44	2	3	N	A	M	V	T	N	1	C2	C3	I	L
45	1	3	N	B	M	Aq	T	N	1	C2	C3	I	L
46	12	3	N	A	M	G	T	N	1	C2	L	I	L
47	2	3	N	A	M	Aq	T	N	1	C2	L	I	L
48	8	3	N	A	M	G	T	N	1	C2	P	I	L
49	9	3	N	A	M	G	T	N	1	I	P	I	L
50	1	3	N	A	M	G	O	N	1	I	P	I	L
51	4	3	N	C1	M	G	T	N	1	I	P	I	L
52	2	3	N	C1	M	G	T	N	1	C2	P	I	L
53	1	3	N	A	P	G	T	N	1	C2	P	I	L
54	1	3	N	A	P	G	T	N	1	P	P	I	L
55	2	3	N	A	P	G	T	N	1	I	L	I	L
56	2	3	N	C1	M	G	T	N	1	I	L	I	L
57	2	3	N	C1	A	G	T	N	1	I	L	I	L
58	2	3	N	C1	A	Aq	T	N	1	I	P	I	L
59	10	3	N	A	P	S	O	S	1	C2	P	I	L
60	1	3	N	A	P	S	O	S	1	I	P	I	L
61	1	3	N	A	P	S	O	N	1	C2	P	I	L
62	1	3	N	A	P	G	O	S	1	I	P	I	L
63	4	3	N	A	P	G	O	S	1	C2	L	I	L
64	7	4	Al.	C1	M	G	T	N	1	I	L	I	L
65	4	4	Al.	C1	M	G	T	N	1	C2	L	I	L
66	1	4	Al.	C1	M	G	T	N	1	C2	C3	I	L
67	3	4	Al.	C1	A	G	B	N	1	C2	C3	I	L
68	1	4	Al.	C1	A	G	B	N	1	C2	C3	I	L
69	2	4	Al.	B	P	G	O	N	1	C2	C3	I	L

... continua...

Continuação

70	3	4	Al.	B	P	G	O	N	1	C2	P	I	L
71	8	4	Al.	B	M	G	O	N	1	C2	L	I	L
72	2	4	Al.	B	M	G	O	N	1	C2	C3	I	L
73	6	4	Al.	B	M	G	T	N	1	C2	L	I	L
74	1	4	Al.	B	M	G	T	N	1	C2	C3	I	L
75	2	4	Al.	A	M	G	T	N	1	C2	L	I	L
76	3	4	Al.	A	M	G	O	N	1	C2	P	I	L
77	1	4	Al.	A	P	G	O	N	1	C2	P	I	L
78	27	4	Al.	A	M	G	O	S	1	C2	P	I	L
79	2	4	Al.	A	M	G	O	S	1	C2	L	I	L
80	4	4	Al.	A	M	G	O	N	1	C2	P	I	L
81	3	4	Al.	C1	A	G	T	S	1	C2	Pul.	I	L
82	2	4	Al.	A	P	G	O	S	1	I	L	I	L
83	25	4	Al.	A	P	G	T	N	1	I	P	I	L
84	2	4	Al.	C1	P	G	T	N	1	C2	P	I	L
85	3	4	N	A	P	G	O	N	1	C2	C3	I	L
86	13	4	N	B	M	G	T	N	1	C2	C3	I	L
87	18	4	N	C1	M	G	T	N	1	C2	C3	I	L
88	23	4	N	C1	M	G	T	N	1	C2	L	I	L
89	2	4	N	C1	M	G	T	N	1	I	L	I	L
90	1	4	N	C1	A	G	T	N	1	C2	L	I	L
91	5	4	N	C1	M	G	T	N	1	C2	P	I	L
92	1	4	N	C1	M	G	T	N	1	I	P	I	L
93	2	4	N	C1	P	G	T	N	1	C2	C3	I	L
94	4	4	N	C1	P	G	T	N	1	C2	P	I	L
95	3	4	N	A	M	G	T	N	1	I	P	I	L
96	5	4	N	A	M	G	T	N	1	C2	P	I	L
97	3	4	N	A	A	G	T	S	1	C2	Pul.	I	L
98	1	4	N	A	M	G	T	N	1	C2	L	I	L
99	1	4	N	C1	M	G	T	N	1	C2	L	I	L
100	1	4	N	C1	P	G	O	N	1	C2	P	I	L
101	6	4	N	C1	M	G	O	N	1	C2	P	I	L
102	1	4	N	B	P	G	O	N	1	C2	P	I	L
103	4	4	N	B	M	G	O	N	1	C2	C3	I	L
104	2	4	N	C1	A	G	O	N	1	C2	C3	I	L
105	22	4	N	C1	A	G	T	S	1	C2	C3	I	L
106	2	4	N	C1	A	G	T	N	1	I	C3	I	L
107	2	4	N	C1	M	G	B	S	1	C2	Pul.	I	L
108	8	5	Al.	C1	P	G	T	N	1	C2	P	I	L
109	5	6	Al.	C1	P	G	T	N	1	P	L	I	L

Continua

TABELA 1, Cont.

110	44	6	Al.	B	P	G	T	N	1	C2	L	I	L
111	209	7	Al.	B	P	G	O	N	1	C2	P	I	L
112	4	6	Al.	C1	P	G	O	N	1	P	P	I	L

Sistema de Uso da terra (SUT) Diluição (Dil.), Isolado (I), Tempo: dias para o aparecimento de colônias isoladas em dias R: rápido (2 a 3), L: lento (>6), I: intermediário (4 a 6), Dia., diâmetro médio das colônias isoladas.: pH: modificação do pH do meio de cultivo: N: neutro, AL: alcalino, A: ácido., Forma das colônias isoladas: C: circular, I: irregular. Ele.: elevação das colônias: C: convexo, L: lente, P: plano, U: umbonada. Bordo: I: inteiro., Superfície: L: liso, R: rugosa, Pul: pulvinado. Muco: A: abundante, M: moderado, P: pouco., Consistência:, G: gomosa, A: aquosa, S: seca, D.opt.: detalhes ópticos: B: brilhante, TP: transparente, TL: translúcido, O: opaco. Cor: A: amarelo, C: creme, B: branco, R: rosa.

Anexo 3A

TABELA 1 Identificação dos tratamentos (Trat.), grupo, isolados e sistema de uso da terra (SUT) utilizados no experimento com sacos plásticos estéreis (350 mL).

Trat.	Grupo	Isolados	SUT	Trat.	Grupo	Isolados	SUT
1	108	J1-1-1-4	FI	84	58	J2-22-4-3	A
2	71	J1-2-1-4	FI	85	59	J2-22-4-5	A
3	71	J1-2-1-7	FI	86	59	J2-22-4-6	A
4	3	J1-3-1-1	F	87	60	J2-22-4-9	A
5	29	J1-3-1-2	F	88	62	J2-22-4-10	A
6	98	J1-3-1-3	F	89	2	J2-23-1-2	FA
7	109	J1-3-2-1	F	90	77	J2-23-1-4	FA
8	29	J1-4-1-2	F	91	2	J2-23-2-1	FA
9	98	J1-5-1-3	F	92	82	J2-23-2-7	FA
10	112	J1-6-2-1	F	93	45	J2-24-1-1	A
11	6	J1-10-1-5	F	94	45	J2-24-1-2	A
12	112	J1-14-1-4	F	95	48	J2-24-1-8	A
13	8	J2-17-1-1	A	96	48	J2-24-1-9	A
14	15	J2-17-1-2	A	97	57	J2-24-1-11	A
15	41	J2-17-2-1	A	98	67	J2-24-1-23	A
16	75	J2-17-2-3	A	99	72	J2-24-1-25	A
17	109	J2-17-2-5	A	100	93	J2-24-1-26	A
18	75	J2-17-3-1	A	101	95	J2-24-2-4	A
19	7	J2-17-4-1	A	102	81	J2-24-2-6	A
20	7	J2-17-4-2	A	103	81	J2-24-2-7	A
21	106	J2-18-1-11	AG	104	88	J2-24-3-1	A
22	107	J2-18-1-16	AG	105	88	J2-24-3-2	A

... continua ...

TABELA 1, Cont.

23	78	J2-18-1-23	AG	106	17	J2-24-3-3	A
24	108	J2-18-1-26	AG	107	18	J2-24-3-5	A
25	78	J2-18-1-27	AG	108	18	J2-24-3-6	A
26	4	J2-18-2-1	AG	109	28	J2-24-3-10	A
27	105	J2-18-2-6	AG	110	27	J2-25-1-2	A
28	22	J2-18-2-12	AG	111	47	J2-26-1-1	AG
29	34	J2-18-2-19	AG	112	53	J2-26-1-3	AG
30	52	J2-18-3-5	AG	113	63	J2-27-1-12	AG
31	52	J2-18-4-1	AG	114	86	J2-27-1-20	AG
32	100	J2-18-4-7	AG	115	32	J2-27-1-42	AG
33	104	J2-18-4-9	AG	116	33	J2-27-2-9	AG
34	5	J2-19-1-3	AG	117	51	J2-28-1-9	AG
35	8	J2-19-1-4	AG	118	50	J2-28-1-29	AG
36	10	J2-19-1-6	AG	119	50	J2-28-1-30	AG
37	102	J2-19-1-8	AG	120	23	J2-28-1-31	AG
38	58	J2-19-1-19	AG	121	27	J2-28-1-33	AG
39	65	J2-19-1-20	AG	122	83	J2-29-1-13	FI
40	80	J2-19-1-24	AG	123	12	J2-29-1-18	FI
41	73	J2-19-1-27	AG	124	90	J2-29-1-21	FI
42	73	J2-19-1-28	AG	125	16	J2-29-1-33	FI
43	76	J2-19-2-3	AG	126	30	J2-29-2-21	FI
44	76	J2-19-2-5	AG	127	54	J2-29-2-23	FI
45	106	J2-19-3-3	AG	128	69	J2-29-3-6	FI
46	102	J2-19-3-4	AG	129	61	J2-29-3-20	FI
47	80	J2-20-1-1	A	130	68	J2-29-4-1	FI
48	87	J2-20-1-3	A	131	79	J2-29-4-2	FI
49	87	J2-20-1-4	A	132	79	J2-29-4-11	FI
50	92	J2-20-1-5	A	133	110	J2-30-3-28	FI
51	38	J2-21-1-5	AG	134	3	J2-31-1-3	FI
52	38	J2-21-1-6	AG	135	43	J2-31-1-23	FI
53	39	J2-21-1-10	AG	136	60	J3-33-1-20	AG
54	99	J2-21-1-30	AG	137	70	J3-33-1-23	AG
55	104	J2-21-1-31	AG	138	110	J3-33-2-22	AG
56	111	J2-21-1-33	AG	139	43	J3-34-1-1	FI
57	111	J2-21-1-34	AG	140	84	J4-56-2-1	FI
58	9	J2-21-2-9	AG	141	64	J4-57-2-2	F
59	10	J2-21-2-12	AG	142	46	J4-62-1-2	F
60	24	J2-21-2-16	AG	143	107	J4-62-3-2	F
61	25	J2-21-2-17	AG	144	94	J4-62-3-3	F
62	25	J2-21-2-18	AG	145	44	J5-67-1-6	A

... continua ...

TABELA 1, Cont.

63	36	J2-21-2-24	AG	146	19	J5-70-1-6	FI
64	36	J2-21-3-5	AG	147	72	J6-86-1-8	P
65	37	J2-21-3-6	AG	148	21	J2-17A-1-5	A
66	1	J2-22-1-3	A	149	55	J2-17A-1-21	A
67	1	J2-22-1-4	A	150	89	J2-17A-2-1	A
68	4	J2-22-1-8	A	150	90	J2-17A-2-3	A
69	5	J2-22-1-19	A	151	20	J2-17A-3-4	A
70	13	J2-22-1-24	A	152	66	J2-19A-1-7	A
71	13	J2-22-1-25	A	153	74	J2-19A-1-17	A
72	26	J2-22-1-28	A	154	91	J2-19A-2-16	A
73	77	J2-22-1-30	A	155	42	J2-19A-2-17	A
74	31	J2-22-1-34	A	156	49	J2-19A-2-18	A
75	35	J2-22-1-35	A	157	55	J2-19A-2-19	A
76	85	J2-22-2-7	A	158	96	J2-19A-3-2	A
77	85	J2-22-2-8	A	159	96	J2-19A-3-5	A
78	103	J2-22-2-9	A	160	101	J2-19A-3-6	A
79	103	J2-22-2-10	A	161	14	J2-24A-2-7	A
80	40	J2-22-2-11	A	162	11	J5-66A-1-8	FI
81	54	J2-22-3-2	A	163	97	J6-81A-3-9	FA
82	56	J2-22-3-3	A				
83	105	J2-22-3-6	A				

TABELA 2 Identificação dos tratamentos (Trat.), grupo, isolados e sistema de uso da terra (SUT) utilizados no primeiro experimento com garrafas “long neck” (350 mL).

TRAT	Grupo	Isolados	SUT	TRAT	Grupo	Isolados	SUT
1	3	J1-5-3-2	F	27	112	J2-25-1-6	A
2	98	J1-6-1-3	F	28	104	J2-26-1-8	AG
3	112	J2-17-2-6	A	29	86	J2-27-1-29	AG
4	75	J2-17-3-2	A	30	1	J2-28-1-18	AG
5	7	J2-18-2-11	AG	31	83	J2-29-1-14	FI
6	102	J2-19-1-9	AG	32	13	J2-29-1-27	FI
7	71	J2-19-1-21	AG	33	69	J2-29-3-21	FI
8	76	J2-19-3-1	AG	34	79	J2-30-1-33	FI
9	106	J2-20-1-6	A	35	48	J2-30-3-11	FI
10	109	J2-21-1-4	AG	36	70	J3-33-1-24	AG
11	80	J2-21-1-21	AG	37	110	J3-33-1-27	AG
12	87	J2-21-1-22	AG	38	90	J3-33-2-2	AG

... continua ...

TABELA 2, Cont.

13	73	J2-21-2-6	AG	39	95	J3-33-2-3	AG
16	36	J2-22-1-37	A	42	94	J4-62-4-2	F
17	103	J2-22-2-13	A	43	27	J5-66-1-2	A
18	105	J2-22-3-9	A	44	107	J5-75-2-1	FI
19	108	J2-22-4-2	A	45	72	J6-86-2-1	P
20	58	J2-22-4-4	A	46	10	J2-17A-1-1	A
21	4	J2-23-1-1	FA	47	74	J2-19A-1-18	A
22	59	J2-24-1-21	A	48	8	J2-19A-1-28	A
23	81	J2-24-2-8	A	49	91	J2-19A-3-1	A
24	85	J2-24-2-16	A	50	60	J5-67A-1-6	A
25	88	J2-24-3-11	A	51	97	J6-81A-4-3	FA
26	111	J2-25-1-5	A				

TABELA 3 Identificação dos tratamentos (Trat.), grupo, isolados e sistema de uso da terra (SUT) utilizados no segundo experimento com garrafas “long neck” (350 mL).

Trat.	Grupo	Isolados	SUT	Trat.	Grupo	Isolados	SUT
1	29	J1-5-1-2	F	82	30	J2-29-2-22	FI
2	29	J1-6-1-2	F	83	58	J2-29-2-24	FI
3	3	J1-7-1-1	F	84	58	J2-29-2-25	FI
4	98	J1-8-1-3	F	85	109	J2-29-4-9	FI
5	98	J1-9-1-3	F	86	68	J2-29-4-10	FI
6	6	J1-10-1-2	F	87	48	J2-30-1-5	FI
7	98	J1-10-1-3	F	88	79	J2-30-1-34	FI
8	6	J1-10-1-6	F	89	79	J2-30-1-35	FI
9	15	J2-17-1-8	A	90	79	J2-30-1-36	FI
10	41	J2-17-2-2	A	91	48	J2-30-3-12	FI
11	52	J2-18-1-6	AG	92	81	J2-31-1-6	FI
12	75	J2-18-1-19	AG	93	105	J2-31-3-1	FI
13	75	J2-18-1-20	AG	94	104	J2-32-1-6	AG
14	78	J2-18-1-28	AG	95	54	J2-32-1-13	AG
15	78	J2-18-1-31	AG	96	105	J2-32-2-3	AG
16	34	J2-18-2-20	AG	97	108	J2-32-2-7	AG
17	52	J2-19-1-17	AG	98	80	J2-32-2-13	AG
18	71	J2-19-1-22	AG	99	81	J2-32-2-14	AG
19	71	J2-19-1-25	AG	100	13	J3-33-1-5	AG
20	102	J2-19-2-4	AG	101	112	J3-33-1-15	AG
21	76	J2-19-3-2	AG	102	70	J3-33-1-23	AG

... continua ...

TABELA 3, Cont.

22	76	J2-19-4-1	AG	103	110	J3-34-2-5	FI
23	78	J2-19-4-2	AG	104	110	J3-34-3-1	FI
24	37	J2-21-1-2	AG	105	110	J3-34-3-2	FI
25	87	J2-21-1-29	AG	106	111	J3-36-2-4	FI
26	73	J2-21-2-7	AG	107	112	J3-36-2-6	FI
27	73	J2-22-1-13	A	108	43	J3-37-1-1	FA
28	5	J2-22-1-23	A	109	109	J3-37-1-5	FA
29	25	J2-22-1-26	A	110	54	J3-39-1-2	F
30	25	J2-22-1-27	A	111	109	J3-40-1-2	F
31	80	J2-22-1-31	A	112	3	J3-44-1-1	AG
32	26	J2-22-1-33	A	113	43	J4-52-1-3	FI
33	35	J2-22-1-36	A	114	2	J4-62-2-1	F
34	36	J2-22-1-38	A	115	2	J4-62-2-3	F
35	36	J2-22-1-39	A	116	27	J5-67-1-2	A
36	38	J2-22-1-40	A	117	44	J5-67-1-7	A
37	38	J2-22-1-41	A	118	19	J5-70-1-10	FI
38	40	J2-22-2-12	A	119	41	J5-70-3-1	FI
39	56	J2-22-3-4	A	120	111	J5-71-1-3	FI
40	103	J2-22-3-5	A	121	107	J5-76-3-1	FI
41	56	J2-22-3-18	A	122	107	J5-77-1-3	FA
42	77	J2-23-1-5	FA	123	106	J5-80-1-5	FI
43	77	J2-23-2-5	FA	124	4	J6-86-1-1	P
44	106	J2-23-2-8	FA	125	8	J6-88-1-1	FA
45	106	J2-24-1-3	A	126	8	J6-88-1-2	FA
46	57	J2-24-1-14	A	127	107	J6-88-2-3	FA
47	88	J2-24-1-18	A	128	27	J6-91-2-2	P
48	67	J2-24-1-24	A	129	90	J6-92-2-4	P
49	81	J2-24-2-15	A	130	90	J6-92-2-7	P
50	5	J2-24-2-18	A	131	46	J6-94-1-8	P
51	7	J2-24-2-23	A	132	10	J2-17A-1-1	A
52	7	J2-24-2-24	A	133	10	J2-17A-1-2	A
53	88	J2-24-3-12	A	134	35	J2-17A-1-6	A
54	88	J2-24-5-1	A	135	108	J2-17A-1-12	A
55	47	J2-26-1-2	AG	136	51	J2-17A-1-13	A
56	53	J2-26-1-4	AG	137	87	J2-17A-1-26	A
57	85	J2-26-1-5	AG	138	59	J2-17A-2-7	A
58	105	J2-26-1-10	AG	139	85	J2-17A-3-2	A
59	108	J2-26-2-2	AG	140	18	J2-17A-3-3	A
60	59	J2-27-1-11	AG	141	85	J2-17A-3-5	A
61	104	J2-27-2-3	AG	142	66	J2-19A-1-8	A

... continua ...

TABELA 3, Cont.

62	104	J2-27-2-4	AG	143	17	J2-19A-2-3	A
63	112	J2-28-1-5	AG	144	17	J2-19A-2-4	A
64	28	J2-28-1-13	AG	145	30	J2-19A-2-11	A
65	1	J2-28-1-19	AG	146	32	J2-19A-2-13	A
66	80	J2-28-1-22	AG	147	32	J2-19A-2-14	A
67	103	J2-28-1-23	AG	148	55	J2-19A-2-20	A
68	28	J2-28-1-24	AG	149	55	J2-19A-2-21	A
69	9	J2-28-1-25	AG	150	49	J2-24A-1-5	A
70	45	J2-28-1-26	AG	151	18	J2-24A-2-8	A
71	9	J2-28-1-27	AG	152	61	J2-24A-2-14	A
72	45	J2-28-1-28	AG	153	65	J2-24A-2-15	A
73	23	J2-28-1-32	AG	154	23	J2-24A-3-4	A
74	50	J2-28-1-34	AG	155	65	J2-24A-3-7	A
75	103	J2-28-1-39	AG	156	76	J2-24A-3-8	A
76	50	J2-28-1-42	AG	157	87	J2-24A-3-16	A
77	1	J2-29-1-3	FI	158	11	J5-66A-1-8	FI
78	13	J2-29-1-32	FI	159	11	J5-66A-1-9	FI
79	16	J2-29-1-34	FI	160	60	J5-67A-1-2	A
80	4	J2-29-2-1	FI	161	72	J6-81A-1-3	FA
81	16	J2-29-2-9	FI	162	72	J6-81A-1-4	FA

TABELA 4 Identificação dos tratamentos (Trat.), grupo, isolados e sistema de uso da terra (SUT) utilizados no terceiro experimento com garrafas “long neck” (350 mL).

Trat	Grupo	Isolados	SUT	Trat	Grupo	Isolados	SUT
1	29	J1-9-1-2	F	74	54	J3-39-1-4	F
2	3	J1-9-2-1	F	75	54	J3-39-1-5	F
3	3	J1-10-3-1	F	76	54	J3-39-1-6	F
4	98	J1-14-1-2	F	77	43	J4-54-1-4	FI
5	29	J1-14-3-1	F	78	58	J4-57-2-1	F
6	98	J1-15-1-7	F	79	43	J4-58-1-3	AG
7	3	J1-16-1-1	F	80	27	J4-59-1-3	AG
8	98	J1-16-2-1	F	81	3	J4-60-2-1	FA
9	75	J2-18-1-22	AG	82	78	J4-62-1-3	F
10	4	J2-19-1-1	AG	83	78	J4-62-1-4	F
11	8	J2-19-1-5	AG	84	112	J4-63-1-2	F
12	52	J2-19-1-18	AG	85	43	J4-63-1-3	FI
13	78	J2-19-1-23	AG	86	43	J4-64-1-3	FI

... continua ...

TABELA 4, Cont.

14	71	J2-19-1-26	AG	87	110	J5-70-1-2	FI
15	75	J2-19-2-1	AG	88	108	J5-73-1-2	FI
16	52	J2-21-1-11	AG	89	109	J5-78-1-1	AG
17	8	J2-21-1-23	AG	90	109	J6-81-2-3	P
18	8	J2-21-1-28	AG	91	109	J6-82-1-1	P
19	71	J2-21-2-3	AG	92	112	J6-83-4-2	P
20	71	J2-21-2-4	AG	93	59	J6-85-1-2	P
21	71	J2-21-2-5	AG	94	106	J6-86-2-2	P
22	73	J2-22-1-14	A	95	80	J6-88-1-9	FA
23	73	J2-22-1-29	A	96	106	J6-88-3-3	FA
24	38	J2-22-1-47	A	97	27	J6-92-1-16	P
25	38	J2-22-1-48	A	98	27	J6-93-1-7	P
26	52	J2-22-3-1	A	99	27	J6-93-2-1	P
27	8	J2-23-2-4	FA	100	4	J6-94-1-1	P
28	88	J2-24-1-19	A	101	107	J6-95-2-2	P
29	88	J2-26-1-6	AG	102	107	J6-96-3-3	P
30	88	J2-26-1-7	AG	103	108	J6-96-3-4	P
31	78	J2-27-1-19	AG	104	104	J2-17A-1-3	A
32	7	J2-27-1-24	AG	105	105	J2-17A-1-5	A
33	7	J2-27-1-37	AG	106	105	J2-17A-1-7	A
34	52	J2-27-2-11	AG	107	36	J2-17A-1-8	A
35	52	J2-27-2-12	AG	108	10	J2-17A-1-9	A
36	50	J2-28-1-2	AG	109	10	J2-17A-1-10	A
37	50	J2-28-1-3	AG	110	10	J2-17A-2-4	A
38	50	J2-28-1-6	AG	111	81	J2-17A-3-1	A
39	50	J2-28-1-8	AG	112	74	J2-19A-1-17	A
40	103	J2-28-1-40	AG	113	80	J2-19A-2-5	A
41	103	J2-28-2-3	AG	114	81	J2-19A-2-7	A
42	103	J2-28-2-4	AG	115	81	J2-19A-2-8	A
43	50	J2-28-2-6	AG	116	30	J2-19A-2-12	A
44	103	J2-28-2-8	AG	117	85	J2-19A-2-15	A
45	103	J2-28-2-9	AG	118	55	J2-19A-2-22	A
46	103	J2-28-2-10	AG	119	59	J2-19A-3-4	A
47	103	J2-28-3-1	AG	120	36	J2-24A-1-3	A
48	1	J2-29-1-3	FI	121	87	J2-24A-1-4	A
49	1	J2-29-1-4	FI	122	4	J2-24A-1-14	A
50	16	J2-29-2-10	FI	123	7	J2-24A-2-6	A
51	58	J2-29-3-1	FI	124	87	J2-24A-2-11	A
52	48	J2-30-1-6	FI	125	104	J2-24A-2-12	A
53	48	J2-30-1-7	FI	126	18	J2-24A-3-3	A

... continua ...

TABELA 4, Cont.

54	4	J2-30-2-1	FI	127	23	J2-24A-3-5	A
55	79	J2-30-2-11	FI	128	23	J2-24A-3-6	A
56	79	J2-30-2-12	FI	129	23	J2-24A-3-9	A
57	79	J2-30-2-13	FI	130	36	J2-24A-3-10	A
58	48	J2-31-1-1	FI	131	76	J2-24A-3-11	A
59	48	J2-31-1-2	FI	132	85	J2-24A-3-12	A
60	48	J2-31-1-20	FI	133	85	J2-24A-3-15	A
61	7	J2-32-1-4	AG	134	10	J5-66A-1-7	FI
62	104	J2-32-1-16	AG	135	59	J5-66A-1-10	FI
63	75	J3-33-1-28	AG	136	10	J5-67A-1-1	A
64	75	J3-33-1-29	AG	137	59	J5-70A-1-2	FA
65	76	J3-33-1-39	AG	138	58	J6-81A-1-1	FA
66	76	J3-33-1-40	AG	139	58	J6-81A-1-2	FA
67	105	J3-33-2-4	AG	140	72	J6-81A-1-11	FA
68	108	J3-33-2-9	AG	141	72	J6-81A-1-12	FA
69	80	J3-34-1-5	FI	142	72	J6-81A-1-13	FA
70	110	J3-34-3-3	FI	143	72	J6-81A-1-14	FA
71	110	J3-34-3-4	FI	144	107	J6-81A-4-4	FA
72	54	J3-39-1-1	F	145	106	J6-88A-1-7	FA
73	54	J3-39-1-3	F				

TABELA 5 Identificação dos tratamentos (Trat.), grupo, isolados e sistema de uso da terra (SUT) utilizados no experimento com sacos plásticos estéreis (350 mL) que não nodularam o siratro.

Trat.	Grupo	Isolados	SUT	Nodulação
2	71	J1-2-1-4	FI	Negativa
6	98	J1-3-1-3	F	Negativa
17	109	J2-17-2-5	A	Negativa
18	75	J2-17-3-1	A	Negativa
35	8	J2-19-1-4	AG	Negativa
37	102	J2-19-1-8	AG	Negativa
38	58	J2-19-1-19	AG	Negativa
39	65	J2-19-1-20	AG	Negativa
42	73	J2-19-1-28	AG	Negativa
50	92	J2-20-1-5	A	Negativa
55	104	J2-21-1-31	AG	Negativa
63	36	J2-21-2-24	AG	Negativa

... continua

TABELA 5, Cont.

68	4	J2-22-1-8	A	Negativa
78	103	J2-22-2-9	A	Negativa
94	45	J2-24-1-2	A	Negativa
104	88	J2-24-3-1	A	Negativa
120	23	J2-28-1-31	AG	Negativa
126	30	J2-29-2-21	FI	Negativa
127	54	J2-29-2-23	FI	Negativa
129	61	J2-29-3-20	FI	Negativa
133	110	J2-30-3-28	FI	Negativa
150	90	J2-17A-2-3	A	Negativa
153	74	J2-19A-1-17	A	Negativa
156	49	J2-19A-2-18	A	Negativa
157	55	J2-19A-2-19	A	Negativa

TABELA 6 Identificação dos tratamentos (Trat.), grupo, isolados e sistema de uso da terra (SUT) utilizados no primeiro experimento com garrafas “*long neck*” (350 mL) que não nodularam o siratro.

Trat.	Grupo	REP	Isolados	SUT	Nodulação
3	112	1	J2-17-2-6	A	Negativa
45	72	1	J6-86-2-1	P	Negativa

TABELA 7 Identificação dos tratamentos (Trat.), grupo, isolados e sistema de uso da terra (SUT) utilizados no segundo experimento com garrafas “*long neck*” (350 mL) que não nodularam o siratro.

Trat.	Grupo	Isolados	SUT	Nodulação
1	29	J1-5-1-2	F	Negativa
8	6	J1-10-1-6	F	Negativa
18	71	J2-19-1-22	AG	Negativa
22	76	J2-19-4-1	AG	Negativa
29	25	J2-22-1-26	A	Negativa
61	104	J2-27-2-3	AG	Negativa
93	105	J2-31-3-1	FI	Negativa
128	27	J6-91-2-2	P	Negativa

TABELA 8 Identificação dos tratamentos (Trat.), grupo, isolados e sistema de uso da terra (SUT) utilizados no terceiro experimento com garrafas “*long neck*” (350 mL) que não nodularam o siratro.

Trat	Grupo	Isolados	SUT	Nodulação
2	3	J1-9-2-1	F	Negativa
6	98	J1-15-1-7	F	Negativa
18	8	J2-21-1-28	AG	Negativa
35	52	J2-27-2-12	AG	Negativa
37	50	J2-28-1-3	AG	Negativa
38	50	J2-28-1-6	AG	Negativa
50	16	J2-29-2-10	FI	Negativa
55	79	J2-30-2-11	FI	Negativa

TABELA 9 Resultados das médias de matéria seca da parte aérea (MSPA), em mg, da eficiência relativa (ER), em porcentagem, do número de nódulos (NN) e da matéria seca de nódulos (MSN), em mg, dos respectivos isolados, grupos e sistema de uso da terra (SUT), utilizados no primeiro experimento com siratro em garrafas “*long neck*” (350 mL). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Isolados	Grupo	SUT	MSPA	ER	NN	MSN
			mg	%		mg
J2-19A-3-1	91	A	29,333c	5,812c	12,333c	52,821b
BR7411			30,000c	5,945c	43,667b	82,667b
TSN			30,556c	6,055c	0,000c	0,000c
INPA0311B			31,333c	6,209c	21,333c	18,000c
J2-24-2-16	85	A	31,333c	6,209c	21,667c	21,333c
J2-25-1-5	111	A	34,667c	6,869c	25,333c	26,667c
J2-18-2-11	7	AG	40,000c	7,926c	9,000c	38,667b
J5-67A-1-6	60	A	50,000c	9,908c	5,000c	29,333c
BR7606			63,333c	12,549c	35,667b	4,667c
BR7801			63,333c	12,549c	53,000a	36,667b
BR322			64,000c	12,682c	5,000c	35,333b
J2-21-1-4	109	AG	64,000c	12,682c	14,667c	18,667c
J1-5-3-2	3	F	76,667c	15,191c	30,333b	6,000c
J2-17-3-2	75	A	79,333c	15,720c	11,000c	66,800b
J3-33-2-2	90	AG	90,000c	17,833c	31,333b	16,000c
BR10026	106	A	96,000c	19,022c	12,333c	61,333b
J2-20-1-6			96,667c	19,154c	38,333b	18,000c

... continua ...

TABELA 9, Cont.

J2-26-1-8	104	AG	100,667c	19,947c	15,000c	15,333c
J2-22-1-20	5	A	105,333c	20,872c	12,000c	10,000c
J2-21-2-6	73	AG	120,000c	23,778c	12,333c	2,667c
J2-19A-1-28	8	A	128,667c	25,495c	26,000c	22,147c
J2-21-1-22	87	AG	138,000c	27,345c	20,333c	26,000c
J2-22-3-9	105	A	139,333c	27,609c	15,333c	20,000c
J2-21-1-21	80	AG	140,000c	27,741c	7,333c	18,667c
J5-75-2-1	107	FI	141,333c	28,005c	33,667b	6,000c
J2-21-2-11	9	AG	144,667c	28,666c	21,333c	3,333c
J3-33-1-27	110	AG	147,333c	29,194c	18,667c	18,667c
J3-33-2-3	95	AG	152,667c	30,251c	28,667c	5,333c
J2-19-3-1	76	AG	158,667c	31,440c	19,333c	10,667c
J6-81A-4-3	97	FA	161,333c	31,968c	55,333a	32,667b
J2-29-1-27	13	FI	171,333c	33,950c	31,667b	32,667b
J2-22-4-4	58	A	181,333c	35,931c	25,333c	37,333b
BR10052			184,000c	36,459c	26,000c	40,667b
J2-29-1-14	83	FI	196,000c	38,837c	35,000b	17,333c
BR111			210,000c	41,611c	35,667b	26,667c
J2-22-1-37	36	A	224,667c	44,518c	49,333a	6,667c
J2-25-1-6	112	A	238,000b	47,160b	23,000c	15,333c
J2-24-1-21	59	A	245,333b	48,613b	35,333b	34,667b
J2-28-1-18	1	AG	273,333b	54,161b	39,667b	28,000c
J2-27-1-29	86	AG	275,333b	54,557b	39,333b	26,000c
BR112			282,000b	55,878b	26,000c	74,000b
J5-66-1-2	27	A	284,000b	56,274b	25,000c	9,333c
J1-6-1-3	98	F	287,333b	56,935b	55,000a	5,400c
J2-23-1-1	4	FA	296,000b	58,652b	58,667a	47,333b
J2-24-2-8	81	A	298,000b	59,049b	39,333b	15,333c
J2-22-2-13	103	A	311,333b	61,690b	73,667a	25,333c
J2-30-3-11	48	FI	311,333b	61,690b	47,667a	19,333c
J2-30-1-33	79	FI	314,000b	62,219b	29,333c	20,667c
J2-29-3-21	69	FI	316,000b	62,615b	54,667a	22,000c
J2-22-4-2	108	A	326,000b	64,597b	40,333b	59,333b
J4-62-4-2	94	F	332,667b	65,918b	45,333b	11,333c
J2-24-3-11	88	A	336,667b	66,710b	34,667b	43,333b
J3-35-1-4	43	FI	339,333b	67,239b	59,667a	18,000c
BR113			340,000b	67,371b	31,000b	40,667b
BR29			358,667b	71,070b	43,667b	27,333c
J3-33-1-24	70	AG	369,333b	73,183b	45,333b	52,000b
J2-19-1-9	102	AG	370,000b	73,315b	47,000a	12,000c

... continua ...

TABELA 9, Cont

J2-19-1-21	71	AG	382,667b	75,825b	23,000c	10,667c
J2-19A-1-18	74	A	424,667a	84,147 ^a	31,000b	14,000c
J4-62-1-5	2	F	454,667a	90,092 ^a	45,667b	12,667c
J2-17A-1-5	10	A	474,667a	94,055 ^a	53,000a	6,667c
BR2001			493,333a	97,754 ^a	12,333c	48,667b
TCN			504,667a	99,999 ^a	0,000c	0,000c
BR5401			665,333a	131,835a	55,333a	29,333c

TABELA 10 Resultados das médias de matéria seca da parte aérea (MSPA), em mg, da eficiência relativa (ER), em porcentagem, do número de nódulos (NN) e da matéria seca de nódulos (MSN), em mg, dos respectivos isolados, grupos e sistema de uso da terra (SUT) utilizados no segundo experimento com siratro em garrafas “*long neck*” (350 mL). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Isolados	Grupo	SUT	MSPA mg	ER %	NN	MSN mg
TSN			22,222f	3,724f	0,000c	0,000c
J2-24A-3-8	76	A	25,333f	4,246f	4,333c	10,155c
J2-29-2-25	58	FI	34,000f	5,698f	8,000c	4,067c
J2-32-1-6	104	AG	34,968f	5,860f	10,667c	7,036c
J2-29-2-1	4	FI	36,667f	6,145f	6,000c	15,667b
J2-24-5-1	88	A	38,111f	6,387f	13,333c	5,274c
J2-24A-2-8	18	A	44,000f	7,374f	4,333c	2,752c
J2-28-1-28	45	AG	48,667f	8,156f	1,667c	2,566c
J2-27-2-4	104	AG	49,108f	8,230f	9,333c	4,608c
J2-22-1-39	36	A	53,333f	8,938f	27,333b	2,633c
J2-29-2-24	58	FI	54,000f	9,050f	5,000c	2,533c
J6-92-2-4	90	P	58,937f	9,877f	36,333b	4,108c
J2-24A-1-5	49	A	60,933f	10,212f	8,000c	10,333c
J2-32-1-13	54	AG	62,052f	10,399f	12,667c	6,568c
INPA0311B			63,333f	10,614f	35,667b	2,333c
BR7411			64,000f	10,726f	5,000c	17,667b
J2-28-1-5	112	AG	70,000f	11,731f	11,000c	5,333c
J2-24-2-24	7	A	71,333f	11,955f	30,333b	6,600c
J2-26-1-5	85	AG	71,333f	11,955f	9,000c	5,667c
J2-24-2-15	81	A	74,000f	12,402f	13,000c	9,000c

... continua ...

TABELA 10, Cont.

J2-22-1-13	73	A	75,926f	12,724f	13,000c	4,635c
J2-18-2-20	34	AG	76,000f	12,737f	30,333b	9,000c
J2-21-2-7	73	AG	76,000f	12,737f	27,333b	3,333c
J2-26-2-2	108	AG	78,000f	13,072f	15,000c	7,333c
J2-19-2-4	102	AG	82,889f	13,891f	12,000c	9,395c
J2-24A-2-14	61	A	83,031f	13,915f	3,667c	23,980a
J2-26-1-2	47	AG	84,000f	14,077f	14,333c	9,333c
J2-24-1-3	106	A	84,477f	14,157f	10,667c	11,089c
J2-28-1-27	9	AG	84,667f	14,189f	3,333c	5,233c
J2-23-2-8	106	FA	85,333f	14,301f	10,000c	8,886c
J2-17A-1-6	35	A	85,711f	14,364f	10,667c	11,776b
J2-24A-2-15	65	A	88,667f	14,859f	10,000c	16,785b
J2-29-4-10	68	FI	91,075f	15,263f	4,333c	19,749a
J2-24-1-14	57	A	91,177f	15,280f	5,000c	9,429c
J2-30-1-35	79	FI	91,418f	15,321f	3,333c	7,061c
J2-32-2-14	81	AG	95,444f	15,995f	23,667b	3,849c
J2-22-2-12	40	A	96,225f	16,126f	11,667c	7,407c
J6-94-1-8	46	P	97,456f	16,332f	8,333c	22,295a
J2-30-1-36	79	FI	104,486f	17,511f	3,667c	8,989c
J2-28-1-42	50	AG	105,467f	17,675f	3,667c	8,853c
J2-17A-3-3	18	A	106,967f	17,926f	20,000c	15,365b
J2-30-1-5	48	FI	107,149f	17,957f	2,333c	14,448b
J2-17A-1-13	51	A	107,272f	17,978f	4,000c	15,239b
J2-19-3-2	76	AG	107,592f	18,031f	16,333c	8,392c
J2-17A-1-2	10	A	108,441f	18,173f	13,333c	14,115b
J2-29-1-34	16	FI	109,432f	18,340f	4,333c	11,918b
J2-24-1-24	67	A	110,000f	18,435f	10,333c	17,667b
J2-30-1-34	79	FI	113,785f	19,069f	2,667c	12,444b
J2-28-1-13	28	AG	115,294f	19,322f	10,333c	6,743c
J2-22-1-41	38	A	115,501f	19,357f	18,333c	6,074c
J2-17A-3-2	85	A	116,501f	19,524f	6,000c	21,200a
J2-29-2-9	16	FI	119,149f	19,968f	3,667c	6,174c
J2-17A-1-26	87	A	119,344f	20,001f	5,667c	10,928c
J2-29-4-9	109	FI	119,820f	20,081f	3,333c	12,309b
J2-32-2-13	80	AG	120,519f	20,198f	10,333c	4,842c
J2-29-2-22	30	FI	121,250f	20,320f	3,333c	4,762c
J2-23-1-5	77	FA	121,333f	20,334f	6,000c	16,000b
J2-17A-1-12	108	A	122,294f	20,495f	4,667c	9,666c
J2-24-3-12	88	A	123,333f	20,669f	9,667c	12,333b
J2-29-1-3	1	FI	123,572f	20,709f	4,000c	6,423c

... continua...

TABELA 10, Cont.

J3-33-1-5	13	AG	125,959e	21,109e	25,000b	6,410c
J6-81A-1-4	72	FA	126,486e	21,198e	6,667c	8,431c
J3-33-1-23	70	AG	128,033e	21,457e	28,667b	3,763c
J2-19-1-17	52	AG	129,444e	21,693e	15,000c	14,000b
J2-28-1-22	80	AG	131,201e	21,988e	2,000c	12,859b
J2-26-1-4	53	AG	131,673e	22,067e	13,667c	13,324b
J2-22-1-31	80	A	132,332e	22,177e	22,667c	4,397c
J2-32-2-7	108	AG	132,968e	22,284e	24,333b	7,508c
J2-19A-1-8	66	A	133,318e	22,342e	6,000c	8,704c
J2-24-1-18	88	A	134,000e	22,457e	10,000c	15,333b
J2-19A-2-21	55	A	134,285e	22,505e	16,000c	9,751c
J2-32-2-3	105	AG	134,438e	22,530e	36,333b	6,797c
J2-28-1-39	103	AG	134,516e	22,543e	3,667c	19,168a
J2-23-2-5	77	FA	134,812e	22,593e	12,667c	5,978c
J3-44-1-1	3	AG	134,858e	22,601e	36,667b	7,642c
J2-24A-3-7	65	A	135,177e	22,654e	13,333c	13,529b
J2-28-1-19	1	AG	135,199e	22,658e	8,333c	4,801c
J2-22-3-5	103	A	135,333e	22,680e	2,000c	15,667b
J2-27-1-11	59	AG	135,468e	22,703e	11,667c	17,967b
J2-17A-3-5	85	A	135,491e	22,707e	3,667c	3,750c
J2-28-1-34	50	AG	136,101e	22,809e	3,333c	24,208a
J3-33-1-15	112	AG	138,232e	23,166e	27,667b	4,362c
J3-37-1-5	109	FA	138,479e	23,207e	19,667c	6,710c
J2-17A-1-1	10	A	138,667e	23,239e	30,000b	1,419c
J5-67-1-7	44	A	139,667e	23,407e	45,000b	1,640c
J2-17A-2-7	59	A	140,977e	23,626e	3,333c	5,183c
J2-28-1-32	23	AG	141,161e	23,657e	3,333c	10,193c
J5-67-1-2	27	A	142,706e	23,916e	43,000b	5,012c
J2-19A-2-3	17	A	144,268e	24,178e	3,667c	8,983c
J2-22-1-38	36	A	146,000e	24,468e	18,667c	14,517b
J2-29-1-32	13	FI	146,699e	24,585e	2,667c	11,927b
J3-34-2-5	110	FI	149,289e	25,019e	29,000b	3,714c
J4-62-2-1	2	F	152,116e	25,493e	45,000b	8,060c
J2-28-1-24	28	AG	154,821e	25,946e	4,333c	10,873c
J2-19A-2-11	30	A	155,219e	26,013e	15,333c	7,904c
J2-24-2-23	7	A	158,000e	26,479e	26,333b	10,667c
J5-76-3-1	107	FI	158,559e	26,573e	37,000b	8,601c
J2-26-1-10	105	AG	159,282e	26,694e	11,667c	3,187c
J3-36-2-6	112	FI	161,066e	26,993e	18,333c	6,034c
J4-62-2-3	2	F	161,207e	27,017e	41,000b	8,601c

... continua ...

TABELA 10, Cont.

J4-52-1-3	43	FI	162,060e	27,159e	26,667b	7,530c
J2-19A-2-20	55	A	162,590e	27,248e	37,000b	6,153c
J3-39-1-2	54	F	164,316e	27,538e	44,667b	3,887c
J3-34-3-1	110	FI	165,749e	27,778e	31,333b	5,002c
J2-28-1-25	9	AG	166,553e	27,912e	3,667c	8,044c
J2-24A-3-16	87	A	166,628e	27,925e	32,333b	7,965c
J2-22-1-40	38	A	166,667e	27,931e	14,000c	7,667c
J3-40-1-2	109	F	168,037e	28,161e	32,000b	4,686c
J5-70-3-1	41	FI	168,957e	28,315e	33,333b	18,940a
J6-88-1-1	8	FA	169,208e	28,357e	16,667c	2,470c
J6-88-1-2	8	FA	169,478e	28,403e	71,000a	13,333b
J6-88-2-3	107	FA	169,748e	28,448e	34,333b	14,211b
J2-24-2-18	5	A	170,000e	28,490e	33,333b	10,000c
J5-71-1-3	111	FI	171,461e	28,735e	31,000b	14,840b
J2-21-1-29	87	AG	172,000e	28,825e	14,000c	3,532c
J5-80-1-5	106	FI	173,740e	29,117e	17,000c	7,690c
J3-34-3-2	110	FI	174,147e	29,185e	35,333b	3,445c
J3-37-1-1	43	FA	176,802e	29,630e	19,333c	5,724c
J2-28-1-26	45	AG	176,906e	29,647e	4,333c	7,867c
J6-81A-1-3	72	FA	182,709e	30,620e	21,333c	8,008c
J6-86-1-1	4	P	184,656e	30,946e	36,667b	4,168c
J2-18-1-28	78	AG	186,667e	31,283e	59,000a	7,902c
J6-92-2-7	90	P	188,331e	31,562e	29,333b	23,281a
J2-30-3-12	48	FI	190,311e	31,894e	2,667c	13,880b
J2-22-1-27	25	A	190,667e	31,954e	14,000c	14,200b
J5-70-1-10	19	FI	190,985e	32,007e	35,667b	1,788c
J2-19A-2-14	32	A	195,891e	32,829e	51,333a	6,737c
J5-77-1-3	107	FA	196,594e	32,947e	26,667b	3,932c
J2-18-1-31	78	AG	198,000e	33,183e	53,333a	7,818c
J2-28-1-23	103	AG	199,020e	33,354e	3,000c	12,941b
J3-36-2-4	111	FI	204,907e	34,340e	37,667b	11,955b
BR2001			210,000e	35,194e	35,667b	13,333b
J2-22-1-23	5	A	210,985e	35,359e	27,000b	3,396c
J2-19A-2-4	17	A	211,970e	35,524e	6,667c	8,488c
BR10026			218,128e	36,556e	7,000c	8,853c
J2-22-3-4	56	A	218,874e	36,681e	14,333c	12,831b
J5-67A-1-2	60	A	220,192e	36,902e	21,333c	8,506c
J2-18-1-20	75	AG	222,298e	37,255e	31,000b	17,014b
J1-7-1-1	3	F	222,5e	37,5e	31,000b	17,00b
J2-19A-2-13	32	A	223,229e	37,411e	21,667c	7,321c

... continua ...

TABELA 10, Cont.

J2-22-1-36	35	A	225,316e	37,760e	20,000c	18,849a
BR10052			228,525e	38,298e	19,000c	9,276c
J2-31-1-6	81	FI	230,800e	38,679e	37,000b	13,131b
J5-66A-1-8	11	FI	232,229e	38,919e	33,333b	4,339c
BR111			238,923e	40,041e	32,333b	9,699c
J5-66A-1-9	11	FI	240,170e	40,250e	34,000b	6,996c
J2-19-1-25	71	AG	243,333e	40,780e	26,333b	11,847b
BR112			249,320e	41,783e	25,000b	10,121c
J1-8-1-3	98	F	253,861e	42,544e	56,000a	5,155c
J2-19-4-2	78	AG	265,151e	44,436e	10,333c	6,603c
J2-22-3-18	56	A	270,494e	45,332e	10,667c	20,752a
BR322			282,000e	47,260e	26,000b	37,000a
J2-24A-3-4	23	A	283,492e	47,510e	16,000c	20,415a
BR7801			300,000d	50,277d	43,667b	17,967b
J2-21-1-2	37	AG	321,072d	53,808d	24,000b	3,803c
BR29			340,000d	56,980d	31,000b	20,333a
J1-10-1-2	6	F	348,570d	58,416d	64,000a	27,034a
BR113			358,667d	60,108d	43,667b	13,667b
J2-17-1-8	15	A	371,834d	62,315d	15,333c	6,199c
J1-9-1-3	98	F	404,435c	67,779c	52,667a	6,830c
J2-18-1-6	52	AG	425,054c	71,234c	14,667c	11,780b
J2-22-1-33	26	A	440,000c	73,739c	29,000b	27,614a
J2-18-1-19	75	AG	458,348c	76,814c	17,333c	3,410c
J1-6-1-2	29	F	465,222c	77,966c	39,333b	14,400b
J2-17-2-2	41	A	483,333c	81,001c	15,333c	19,400a
BR5401			493,333c	82,677c	12,333c	24,333a
TCN			596,667b	99,994b	0,000c	0,000c
BR7606			665,333b	111,502b	55,333a	14,667b
J1-10-1-3	98	F	768,153a	128,734a	76,000a	26,692a

TABELA 11 Resultados das médias de matéria seca da parte aérea (MSPA), em mg, da eficiência relativa (ER), em porcentagem, do número de nódulos (NN) e da matéria seca de nódulos, em mg, dos respectivos isolados, grupos, sistema de uso da terra (SUT), utilizados no terceiro experimento com siratro em garrafas “*long neck*” (350 mL). Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Isolados	Grupo	SUT	MSPA	ER	NN	MSN
			mg	%		mg
BR322			30,000f	5,945f	43,667a	82,667a
TSN			30,556f	6,055f	0,000c	0,000c
BR7411			31,333f	6,209f	21,333c	18,000c
J6-86-2-2	106	P	34,000f	6,737f	1,667c	7,333c
J2-27-1-37	7	AG	36,000f	7,133f	2,333c	3,533c
J4-63-1-2	112	F	36,667f	7,266f	3,667c	7,333c
J2-28-1-3	50	AG	37,800f	7,490f	0,000c	0,667c
J2-28-2-9	103	AG	38,667f	7,662f	1,000c	2,833c
J2-21-1-11	52	AG	42,000f	8,322f	11,000c	3,267c
J1-15-1-7	98	F	43,333f	8,587f	0,000c	0,000c
J2-21-1-23	8	AG	44,000f	8,719f	0,333c	1,467c
J2-27-2-12	52	AG	44,000f	8,719f	0,000c	0,000c
J2-30-2-11	79	FI	48,667f	9,643f	0,000c	0,000c
J4-54-1-4	43	FI	48,667f	9,643f	4,000c	4,667c
J1-9-2-1	3	F	49,333f	9,775f	0,000c	0,000c
J2-30-2-1	4	FI	51,333f	10,172f	3,000c	6,667c
J3-33-2-9	108	AG	51,333f	10,172f	0,000c	0,000c
J2-28-1-8	50	AG	52,667f	10,436f	1,667c	6,200c
J2-28-1-6	50	AG	53,333f	10,568f	0,000c	0,000c
J6-85-1-2	59	P	54,000f	10,700f	6,000c	16,000c
J5-70A-1-2	59	FA	56,000f	11,096f	2,000c	9,533c
J2-19A-2-5	80	A	61,333f	12,153f	1,333c	11,333c
BR5401			63,333f	12,549f	35,667b	4,667c
BR7606			63,333f	12,549f	53,000a	36,667b
BR2001			64,000f	12,682f	5,000c	35,333b
J2-29-3-1	58	FI	64,000f	12,682f	3,333c	5,333c
J3-33-1-40	76	AG	70,000f	13,870f	2,000c	4,667c
J2-31-1-2	48	FI	71,333f	14,135f	2,000c	4,533c
J2-30-1-7	48	FI	72,000f	14,267f	5,000c	7,533c
J2-31-1-20	48	FI	74,000f	14,663f	3,667c	5,333c
J2-26-1-7	88	AG	80,000f	15,852f	10,333c	9,600c
J2-19-1-5	8	AG	81,333f	16,116f	6,333c	6,715c

... continua ...

TABELA 11, Cont.

J3-33-1-28	75	AG	82,000f	16,248f	8,000c	4,000c
J2-24A-2-12	104	A	82,044f	16,257f	5,000c	6,667c
J2-27-1-19	78	AG	84,000f	16,645f	11,000c	11,952c
J2-28-1-2	50	AG	84,467f	16,737f	1,333c	4,000c
J2-30-2-12	79	FI	84,667f	16,777f	4,000c	9,800c
J3-39-1-4	54	F	84,667f	16,777f	3,667c	8,667c
J2-19-1-1	4	AG	85,333f	16,909f	5,333c	14,756c
J6-95-2-2	107	P	85,333f	16,909f	4,667c	11,800c
J2-28-2-6	50	AG	86,000f	17,041f	13,000c	9,256c
J2-21-2-3	71	AG	88,667f	17,569f	8,000c	5,133c
J5-78-1-1	109	AG	89,333f	17,701f	3,000c	10,667c
J2-28-2-3	103	AG	90,000f	17,833f	11,667c	4,800c
J1-16-1-1	3	F	90,667f	17,966f	12,667c	6,504c
J2-19-1-23	78	AG	94,667f	18,758f	12,000c	2,000c
J4-62-1-4	78	F	95,333f	18,890f	5,333c	6,200c
INPA0311B			96,000f	19,022f	12,333c	61,333a
J2-19-1-18	52	AG	96,667f	19,154f	4,000c	11,848c
J4-59-1-3	27	AG	98,667f	19,551f	2,000c	6,867c
J2-17A-1-3	104	A	99,333f	19,683f	1,333c	3,333c
J3-39-1-1	54	F	99,333f	19,683f	8,333c	5,933c
J2-24A-1-3	36	A	99,933f	19,802f	1,333c	8,000c
J2-28-2-8	103	AG	100,667f	19,947f	5,333c	10,667c
J2-17A-2-4	10	A	103,333f	20,475f	15,333c	14,667c
J6-83-4-2	112	P	103,333f	20,475f	8,333c	27,333b
J1-9-1-2	29	F	106,667f	21,136f	17,667c	7,133c
J6-81A-1-13	72	FA	107,394f	21,280f	15,333c	9,425c
J2-31-1-1	48	FI	109,333f	21,664f	8,333c	5,067c
J2-28-2-10	103	AG	110,000f	21,796f	2,000c	6,667c
J2-24A-3-9	23	A	110,668f	21,929f	2,000c	14,480c
J2-24A-3-10	36	A	115,546f	22,895f	11,333c	14,821c
J2-24A-1-14	4	A	119,959f	23,770f	8,333c	17,333c
J2-21-2-5	71	AG	120,000f	23,778f	14,000c	12,366c
J2-29-1-3	1	FI	121,333f	24,042f	1,667c	9,867c
J2-22-1-29	73	A	122,000f	24,174f	14,333c	18,267c
J4-63-1-3	43	FI	123,333e	24,438e	4,000c	16,067c
J1-14-1-2	98	F	124,000e	24,571e	4,667c	5,667c
J6-93-1-7	27	P	124,667e	24,703e	4,667c	6,933c
J6-81A-1-12	72	FA	125,193e	24,807e	6,667c	14,691c
J2-30-1-6	48	FI	126,000e	24,967e	2,667c	10,667c
J6-81-2-3	109	P	126,000e	24,967e	1,333c	18,667c
J3-39-1-6	54	F	126,667e	25,099e	5,333c	8,267c
J4-57-2-1	58	F	127,333e	25,231e	9,333c	7,333c

... continua ...

TABELA 11, Cont.

J3-34-3-4	110	FI	128,667e	25,495e	9,333c	10,903c
J5-66A-1-10	59	FI	130,549e	25,868e	24,333b	16,000c
J2-17A-1-5	105	A	130,667e	25,892e	3,000c	18,667c
J4-60-2-1	3	FA	131,333e	26,024e	3,667c	9,533c
J2-24A-3-15	85	A	132,757e	26,306e	1,333c	4,267c
J6-81A-1-1	58	FA	132,778e	26,310e	3,000c	15,333c
J2-22-1-47	38	A	133,333e	26,420e	18,333c	17,333c
J5-67A-1-1	10	A	135,106e	26,771e	12,333c	26,667b
J3-39-1-3	54	F	135,333e	26,816e	2,000c	16,000c
J5-73-1-2	108	FI	136,000e	26,948e	13,000c	11,333c
J2-19A-1-17	74	A	137,333e	27,213e	10,667c	14,000c
J6-81A-4-4	107	FA	137,703e	27,286e	40,000b	12,000c
J3-33-2-4	105	AG	138,000e	27,345e	7,000c	9,333c
J6-81A-1-14	72	FA	139,089e	27,560e	38,333b	10,903c
J2-24A-1-4	87	A	141,927e	28,123e	3,000c	8,000c
J3-34-1-5	80	FI	142,000e	28,137e	3,667c	10,333c
J2-17A-1-10	10	A	142,667e	28,269e	38,333b	14,000c
J2-19A-2-8	81	A	144,000e	28,534e	8,333c	21,333c
J1-16-2-1	98	F	145,333e	28,798e	6,333c	7,407c
J3-34-3-3	110	FI	145,333e	28,798e	4,000c	6,667c
J3-39-1-5	54	F	145,333e	28,798e	9,000c	10,800c
J2-27-1-24	7	AG	146,000e	28,930e	14,667c	4,200c
J3-33-1-39	76	AG	146,667e	29,062e	5,000c	16,667c
J6-96-3-3	107	P	148,667e	29,458e	7,000c	16,000c
J6-96-3-4	108	P	148,667e	29,458e	10,667c	9,400c
J2-19A-2-12	30	A	150,000e	29,722e	6,000c	16,000c
J6-88A-1-7	106	FA	150,689e	29,859e	44,333a	13,130c
J2-17A-3-1	81	A	151,333e	29,987e	7,000c	10,667c
J2-28-1-40	103	AG	151,333e	29,987e	5,000c	5,667c
J2-21-2-4	71	AG	152,000e	30,119e	24,333b	1,504c
J3-33-1-29	75	AG	152,000e	30,119e	3,000c	10,439c
J4-62-1-3	78	F	155,333e	30,779e	9,000c	6,000c
J2-19A-2-7	81	A	156,000e	30,911e	3,000c	13,333c
J6-93-2-1	27	P	158,000e	31,308e	47,000a	8,200c
J2-18-1-22	75	AG	159,333e	31,572e	17,333c	9,782c
J2-22-1-48	38	A	160,000e	31,704e	21,000c	18,667c
J2-23-2-4	8	FA	160,000e	31,704e	15,000c	22,000c
J2-17A-1-9	10	A	167,333e	33,157e	5,667c	11,333c
J6-82-1-1	109	P	167,333e	33,157e	3,000c	30,667b
J6-81A-1-11	72	FA	169,654e	33,617e	6,000c	16,926c
J2-24-1-19	88	A	172,000e	34,082e	15,000c	3,358c
J6-88-1-9	80	FA	174,000e	34,478e	10,667c	4,667c

... continua ...

TABELA 11, Cont.

J4-64-1-3	43	FI	176,667e	35,006e	35,333b	13,333c
J2-24A-3-3	18	A	179,058e	35,480e	3,333c	18,000c
J2-19A-2-22	55	A	183,467d	36,354d	7,000c	6,667c
BR7801			184,000d	36,459d	26,000b	40,667b
J2-32-1-16	104	AG	185,333d	36,724d	5,333c	10,000c
J2-19-2-1	75	AG	186,667d	36,988d	59,000a	20,667c
J2-24A-3-11	76	A	187,479d	37,149d	5,000c	14,200c
J2-24A-2-11	87	A	189,953d	37,639d	12,667c	9,333c
J4-58-1-3	43	AG	198,667d	39,366d	8,333c	6,800c
J2-19-1-26	71	AG	207,333d	41,083d	25,000b	9,333c
J5-70-1-2	110	FI	208,667d	41,347d	23,667b	15,333c
J2-24A-3-5	23	A	209,777d	41,567d	1,333c	4,000c
BR10052			210,000d	41,611d	35,667b	26,667b
J2-17A-1-7	105	A	210,000d	41,611d	8,333c	24,667b
J6-92-1-16	27	P	214,667d	42,536d	6,333c	7,333c
J2-32-1-4	7	AG	215,333d	42,668d	9,000c	11,333c
J2-24A-3-6	23	A	218,354d	43,267d	10,667c	18,000c
J2-26-1-6	88	AG	220,000d	43,593d	19,667c	26,723b
J2-28-3-1	103	AG	222,000d	43,989d	10,667c	40,667b
J2-24A-2-6	7	A	223,828d	44,351d	6,000c	7,333c
J2-29-1-4	1	FI	226,667d	44,914d	24,667b	14,667c
J2-30-2-13	79	FI	232,000d	45,971d	9,333c	63,333a
J2-17A-1-8	36	A	238,000d	47,160d	6,000c	27,333b
J2-24A-3-12	85	A	242,052d	47,962d	3,333c	27,333b
J6-88-3-3	106	FA	244,000d	48,348d	8,667c	6,667c
J2-19A-2-15	85	A	245,333d	48,613d	5,333c	37,333b
J5-66A-1-7	10	FI	248,478d	49,236d	10,667c	26,667b
J2-19A-3-4	59	A	248,667d	49,273d	10,667c	16,000c
BR112			282,000d	55,878d	26,000b	74,000a
J2-28-2-4	103	AG	286,667d	56,803d	27,000b	9,740c
BR111			340,000c	67,371c	31,000b	40,667b
BR10026			358,667c	71,070c	43,667a	27,333b
J1-10-3-1	3	F	360,000c	71,334c	31,667b	22,000c
J2-22-1-14	73	A	371,333c	73,579c	34,667b	8,000c
J6-81A-1-2	58	FA	379,989c	75,295c	35,333b	23,171c
J1-14-3-1	29	F	423,333c	83,883c	55,667a	17,764c
BR113			493,333b	97,754b	12,333c	48,667b
TCN			504,667b	99,999b	0,000c	0,000c
J2-27-2-11	52	AG	552,667b	109,511b	31,333b	16,667c
J2-22-3-1	52	A	600,000a	118,890a	50,333a	19,333c
BR29			665,333a	131,835a	55,333a	29,333b