

**DIVERSIDADE GENÉTICA E SIMBIÓTICA DE
BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO
ISOLADAS DE SOLOS SOB AGROFLORESTA
NA AMAZÔNIA OCIDENTAL USANDO O
CAUPI COMO PLANTA ISCA**

PAULA MARCELA DUQUE JARAMILLO

2010

PAULA MARCELA DUQUE JARAMILLO

**DIVERSIDADE GENÉTICA E SIMBIÓTICA DE BACTÉRIAS
FIXADORAS DE NITROGÊNIO ISOLADAS DE SOLOS SOB
AGROFLORESTA NA AMAZÔNIA OCIDENTAL USANDO O CAUPI
COMO PLANTA ISCA**

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

Orientadora

Profa. Dra. Fatima Maria de Souza Moreira

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

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

Jaramillo, Paula Marcela Duque.

Diversidade genética e simbiótica de bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de solos sob agrofloresta na Amazônia Ocidental usando o caupi como planta isca / Paula Marcela Duque Jaramillo. – Lavras : UFLA, 2010.

66 p. : il.

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

Orientador: Fatima Maria de Souza Moreira.

Bibliografia.

1. Nodulação. 2. *Vigna unguiculata*. 3. Bactérias que nodulam leguminosas. 4. Fixação biológica de nitrogênio. 5. Biodiversidade. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.46

PAULA MARCELA DUQUE JARAMILLO

**DIVERSIDADE GENÉTICA E SIMBIÓTICA DE BACTÉRIAS
FIXADORAS DE NITROGÊNIO ISOLADAS DE SOLOS SOB
AGROFLORESTA NA AMAZÔNIA OCIDENTAL USANDO O CAUPI
COMO PLANTA ISCA**

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

APROVADA em 25 de janeiro de 2010.

Dra. Ligiane Aparecida Florentino UFLA

Prof. Dr. Messias José Bastos de Andrade UFLA

Profa. Dra. Adriana Lima Silva UFCEG

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

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2010

A Dios por la sabiduria y
paciencia.

Ofereço

*A mis padres Luis Gustavo y
Maria Cristina por todo el
amor, apoyo incondicional y
confianza depositados em mi.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia agrícola.

À professora Fátima Maria de Souza Moreira por abrir-me uma nova visão do mundo do solo, pela orientação e confiar nas minhas capacidades.

Aos membros da banca examinadora, professor Dr. Messias José Bastos de Andrade, Dra. Ligiane Aparecida Florentino, professora Dra. Adriana Silva Lima e professora Dra. Rafaela Simão Abrahão Nóbrega pela participação e sugestões apresentadas.

A todos os professores, funcionários, colegas e amigos do Departamento de Microbiologia Agrícola pela compreensão, ajuda e convivência neste tempo do mestrado.

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

Aos funcionários Marlene e Manuel, pela contribuição, apoio, incentivo e amizade, e Eula e ao Fabrício, funcionários do Laboratório de Biologia Molecular, pela ajuda e paciência.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia do Solo pelo apoio e pela convivência.

Aos meus amigos incondicionais Maryeimy, Marcela, Jessé, Amanda, Wesley, Felix, Jorge, Gloria Maria por tudo o que deram para minha formação pessoal e acadêmica.

A minha família que tem sido durante toda minha vida o suporte para alcançar meus objetivos. E a todos, que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho e da minha formação, muito obrigada

"Caminante no hay camino, se hace camino al andar"
Antonio Machado

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	v
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	4
2.1 Bactérias que nodulam leguminosas e fixam nitrogênio atmosférico.....	4
2.2 Feijão-caupi.....	7
2.3 Floresta Amazônica	9
2.4 Sistemas de uso da terra (SUT)	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Origem das estirpes	12
3.2 Confirmação das características culturais	15
3.3 Autenticação mediante inoculação no feijão-caupi e avaliação da eficiência simbiótica.....	15
3.4 Diversidade genética pela técnica BOX-PCR	19
3.5 Diversidade das sequências do gene 16S rDNA	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1 Características culturais.....	22
4.2 Autenticação mediante inoculação no feijão-caupi e eficiência simbiótica.....	24
4.2.1 Autenticação mediante inoculação no feijão-caupi	24
4.2.2 Eficiência simbiótica	30
4.3 Diversidade genética pela técnica BOX-PCR.....	36
4.4 Sequenciamento 16SrDNA.....	40

5 CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ANEXO	62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Autenticação de 148 estirpes de bactérias quanto à nodulação de feijão-caupi, isoladas de amostras de solo sob agrofloresta na Amazônia.....	26
TABELA 2	Principais características culturais de 88 isolados de bactérias que estabeleceram simbiose com o feijão-caupi, isoladas de amostras de solo sob agrofloresta na Amazônia.Ocidental.....	28
TABELA 3	Número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN), matéria fresca da parte aérea (MFPA), matéria seca da parte aérea (MSPA), índice SPAD e eficiência relativa (ER%) de 88 isolados, três controles positivos (INPA 03-11B, UFLA 03-84 e BR 3267) e dois controles negativos sem inoculação (com e sem N).....	31
TABELA 4	Identificação de isolados que nodulam e fixam nitrogênio no feijão-caupi baseadas em sequências do GenBank (NCBI).....	41

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Localização das áreas de coleta (cidade de Benjamin Constant e comunidades indígenas, Nova Aliança e Guanabara II, no município de Benjamin Constant).....	12
FIGURA 2	Distribuição dos pontos amostrais no mapa de uso e cobertura da terra.....	14
FIGURA 3	Áreas de agrofloresta na Amazônia Ocidental	14
FIGURA 4	Panorâmica do experimento de autenticação e eficiência simbiótica em casa de vegetação.....	18
FIGURA 5	Distribuição dos 148 isolados do solo sob agrofloresta em grupos culturais de acordo com o tempo de crescimento e alteração do pH do meio: crescimento rápido com acidificação do meio (RA), sem alteração do pH do meio (RN) e alcalinizando o meio (RAL); de crescimento intermediário acidificando o meio (IA), sem modificar o pH do meio (IN) e com alcalinização do meio (IAL); de crescimento lento acidificando o meio (LA), sem modificar o pH do meio (LN) e alcalinizando o meio (LAL).....	23
FIGURA 6	Comportamento das 148 estirpes de bactérias quanto à nodulação de feijão-caupi e a sua porcentagem nas Janelas 2 – Guanabara II e 5 – Nova Aliança isoladas de amostras de solo sob agrofloresta na Amazônia Ocidental.....	27
FIGURA 7	Dendrograma de similaridade genética avaliada pela técnica do rep - PCR utilizando o primer BOX das estirpes de bactérias que nodulam feijão-caupi isoladas de solo sob agrofloresta na Amazônia Ocidental e das estirpes tipo.....	39
FIGURA 8	Dendrograma utilizando a plataforma www.phylogeny.fr das relações genéticas das sequências parciais do gene 16S rDNA das estirpes capazes de nodular feijão-caupi comparadas com o banco de dados GenBank.....	42

RESUMO

JARAMILLO, Paula Marcela Duque. **Diversidade genética e simbiótica de bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de solos sob Agrofloresta na Amazônia Ocidental usando o caupi como planta isca.** 2010. 66p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras¹.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética e simbiótica de bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de nódulos da planta isca feijão-caupi de solos sob agrofloresta na Amazônia Ocidental. Os isolados foram obtidos em trabalho anterior, a partir de uma coleção de 1010 isolados provenientes de diferentes sistemas de uso da terra, que incluem 188 da agrofloresta. Inicialmente, foram confirmadas as características culturais descritas anteriormente utilizando meio 79. Dos 188 isolados, 148 apresentaram viabilidade. Experimentos de autenticação e eficiência simbiótica destes isolados foram realizados em casa de vegetação, com delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Utilizaram-se garrafas de vidro âmbar recicláveis (500 mL), contendo solução de Hoagland diluída quatro vezes e, o feijão-caupi (BR17 Gurguéia), como planta hospedeira. Foram utilizados os tratamentos sem inoculação (com e sem nitrogênio mineral) e com inoculação das estirpes recomendadas como inoculantes INPA 03-11B, UFLA 03-84, BR 3267 como controles. A autenticação foi avaliada pela presença (+) ou ausência (-) de nódulos nas plantas inoculadas. A eficiência simbiótica foi avaliada, aos 35 dias após a emergência, quando se determinou o índice SPAD (*Soil Plant Analysis Development*) o qual é uma medição indireta do teor de nitrogênio, número e matéria seca de nódulos, matéria seca e fresca da parte aérea e eficiência relativa. Os dados foram submetidos à análise de variância e agrupamento de médias por meio do teste de Scott Knott, a 5% de probabilidade. 88 isolados apresentaram nodulação positiva e foram submetidos à análise de polimorfismo no DNA, com o objetivo de avaliar a sua diversidade, utilizando a técnica BOX-PCR. Nesta análise foram incluídas as estirpes tipo e referência *Azorhizobium dobereineriae* (BR5401^T), *Azorhizobium caulinodans* (ORS571^T), *Cupriavidus taiwanensis* (LMG19424^T), *Burkholderia sabiae* (BR3405), *Mesorhizobium plurifarium* (BR3804), *Bradyrhizobium* sp. (UFLA 03-84) e *Sinorhizobium* sp. (BR6806). Sequências parciais do gene 16S rDNA de 20 isolados foram obtidas e analisadas filogeneticamente. De acordo com as características culturais, nove grupos foram formados. Os isolados apresentaram eficiência simbiótica variável, onde 12,5% dos isolados promoveram um

Orientadora: Fatima Maria de Souza Moreira - UFLA

aumento estatisticamente significativo da matéria seca da parte aérea, em relação ao controle sem inoculação e sem nitrogênio mineral. Encontrou-se alta diversidade genética, a 70% de similaridade, formando-se 72 grupos, a maioria formados por um isolado só. O gênero predominante foi *Bradyrhizobium*, com 55% do total dos isolados sequenciados. O isolado mais eficiente na fixação de nitrogênio foi referido como *Rhizobium* sp. Foram também identificados outros gêneros, como *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter*, *Ochrobactrum* e *Bosea*. Os resultados mostraram alta diversidade genética e simbiótica em solos sob o sistema de uso da terra agrofloresta na Amazônia Ocidental.

ABSTRACT

JARAMILLO, Paula Marcela Duque. **Genetic diversity and symbiotic efficiency of bacteria isolated from soil under Agroforestry in the Western Amazon by using cowpea as trap plant.** 2010. 66 p. Dissertation (Masters in Agriculture Microbiology) – Federal University of Lavras, Lavras.

The objective of this study was to evaluate the genetic diversity and symbiotic efficiency nitrogen-fixing bacteria isolated from nodules of the trap plant cowpea inoculated with soils under agroforestry in the Western Amazon. The isolates were obtained in previous work, from a collection of 1010 isolates from different land used systems which included 188 from agroforestry. Initially, we confirmed cultural characteristics previously described by using 79 medium. Of the 188 isolates, 148 were still viable. Experiments for authentication and symbiotic efficiency of these isolates were performed in greenhouse, in a completely randomized design with three replications. We used amber glass recycled bottles (500 mL), containing Hoagland solution diluted four times, and the cowpea (BR17 Gurguéia) as host plant. Control treatments were without inoculation (with and without mineral nitrogen) and inoculated with strains recommended as inoculants INPA 03-11B, UFLA 03-84, BR 3267. The authentication was evaluated through nodules presence (+) or absence (-) in inoculated plants. The symbiotic efficiency was evaluated 35 days after emergence, when it was determined the SPAD (*Soil Plant Analysis Development*) which is an indirect measurement of the nitrogen content, number and dry weight of nodules, dry and fresh matter shoot weight and relative efficiency. The data were subjected to analysis of variance and group of averages by means of the Scott-Knott test in a probability of 5%. 88 isolates showed positive nodulation and were subjected to analysis of polymorphism in DNA, with the aim of evaluating their diversity by using the BOX-PCR technique. This analysis included the type strains *Azorhizobium dobereinae* (BR5401^T), *Azorhizobium caulinodans* (ORS571^T), *Cupriavidus taiwanensis* (LMG19424^T), *Burkholderia sabiae* (BR3405), *Mesorhizobium plurifarium* (BR3804), *Bradyrhizobium* sp. (UFLA 03-84) and *Sinorhizobium* sp. (BR6806). Partial sequences of the 16S rDNA of 20 isolates were obtained and phylogenetically analyzed. According to the cultural, nine groups were formed. The symbiotic isolates was variable and 12.5% of isolates promoted a

Adviser: Fatima Maria de Souza Moreira - UFLA

statistically significant increase in dry matter of shoots, compared to the control without inoculation and without mineral nitrogen. It was founding high genetic diversity: at the level of 70% similarity, 72 groups were found, most consisting of only one isolate. The predominant genus was *Bradyrhizobium*, identified for 55% of the isolates sequences. The more efficient isolate in nitrogen fixation was identified as *Rhizobium* sp. We also identified other generous, such as *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter*, *Ochrobactrum* and *Bosea*. These results showed high genetic diversity and symbiotic efficiency in soils under the these land-use agroforestry in the Western Amazon.

1 INTRODUÇÃO

As florestas tropicais estão sendo constantemente destruídas a taxas alarmantes e a Amazônia Brasileira não é exceção. Grande proporção desta área foi desmatada e destinada à formação de pastagens e à agricultura de subsistência (INPE, 2002). As florestas tropicais contêm a maior diversidade do planeta, cerca de 50% do total das espécies, a maior parte desconhecida ou pouco pesquisada (Moreira & Siqueira, 2006).

Entre os ecossistemas terrestres, o solo apresenta a maior diversidade de microrganismos, micro, macro e mesofauna, devido à sua natureza dinâmica, heterogênea e complexa (Moreira & Siqueira, 2006). Os microrganismos contribuem em diferentes processos como na manutenção adequada dos ciclos naturais dos nutrientes, entre outros, variando sua diversidade em cada ecossistema. A fotossíntese e a fixação de nitrogênio são processos biológicos chave, que geram energia e ao mesmo tempo, matéria orgânica, dos quais algumas formas de vida dependem. Seja em um organismo simples ou dentro de uma associação simbiótica, representando sistemas biológicos eficientes (Fay, 1981).

Dentre os ecossistemas, os agroecossistemas são normalmente os que apresentam menor diversidade quando comparados a situações não alteradas pelo homem. Entretanto, é possível manter sua biodiversidade por meio da utilização de práticas de produção agropecuárias adequadas, como é o caso do plantio direto, da rotação de culturas, da adubação verde e da cobertura morta, que contribuem para a manutenção de níveis adequados de matéria orgânica nos solos (Manzatto et al., 2002).

Diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos na Floresta Amazônica com a finalidade de estudar sua biodiversidade, especialmente de bactérias fixadoras de nitrogênio (BFN). Os primeiros trabalhos foram realizados por

Moreira (1991), quem caracterizou 800 isolados obtidos de diferentes locais do Brasil, dentre eles a Amazônia. Dois anos depois, Moreira et al. (1993) selecionaram 171 destes isolados analisando o perfil de proteínas mediante SDS-PAGE, encontrando alta diversidade. Posteriormente, Moreira et al. (1998) realizaram o sequenciamento parcial do gene 16S rDNA de 44 isolados, representantes dos grupos formados, encontrando 15 sequências diferentes e incluindo, provavelmente, 6 novas espécies. A partir deste último trabalho, Lajudie et al. (1998) descreveram a espécie *Mesorhizobium plurifarum*.

Borneman & Triplett (1997) fizeram a primeira descrição da diversidade microbiana dos solos de floresta e pastagem da Amazônia Ocidental, utilizando 100 sequências de pequenas subunidades de rRNA obtidas por PCR identificando 98 bactérias e 2 archaeas.

Jesus et al. (2005), Lima et al. (2005) e Lima et al. (2009) utilizando o siratro como planta isca, verificaram que os sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental afetam a diversidade fenotípica e genotípica e a eficiência simbiótica de BFN.

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] é uma das leguminosas mais cultivadas nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, com franca expansão no Centro-Oeste onde é cultivado predominantemente por pequenos produtores e representa uma das principais culturas de subsistência. Seu ciclo de vida é mais longo do que do feijoeiro comum, é mais resistente ao estresse hídrico e pouco exigente em fertilidade do solo. Além disso, representa fonte importante de proteína, energia, vitaminas, fibras e minerais e é gerador de emprego e renda nas regiões cultivadas. Esta leguminosa tem capacidade de estabelecer simbiose com BFN, permitindo o aumento na produção; este processo consiste em alternativa para a substituição, total ou parcial, dos adubos nitrogenados, desde que supra à cultura com o N necessário para o seu desenvolvimento, diminuindo os riscos ao meio ambiente, os custos de produção (Soares et al., 2006) e ao

mesmo tempo reduzindo a queima de petróleo necessária para a obtenção dos adubos nitrogenados, uma das maiores contribuidoras para o efeito estufa que ameaça o equilíbrio do clima da terra.

Nóbrega (2006) avaliou as alterações químicas e edáficas e a ocorrência, eficiência e diversidade de bactérias que nodulam leguminosas em diferentes Sistemas de Uso da Terra (SUT) na Amazônia Ocidental, usando o feijão-caupi como planta isca, obtendo 1010 isolados.

As estirpes isoladas por Nóbrega (2006) de solos dos SUT pastagem e floresta secundária utilizando o feijão-caupi como planta isca foram avaliadas por Neves (2007) quanto à eficiência e à diversidade, encontrando variável eficiência simbiótica e alta diversidade fenotípica e genotípica baseada no sequenciamento parcial do gene 16S rDNA e perfis de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). O mesmo foi encontrado por Guimarães (2009) para estirpes do SUT agricultura utilizando a técnica rep-PCR com o primer BOX.

O presente trabalho faz parte do projeto “*Conservation and Sustainable Management of Below-Ground Biodiversity*”, implementado pelo “*United Nations Programme (UNEP)*”, executado no Brasil, Costa do Marfim, Índia, Indonésia, Kênia, México e Uganda. No Brasil é denominado BiosBrasil, é coordenado pela Universidade Federal de Lavras e tem como objetivo promover a conscientização, o conhecimento e a compreensão da biodiversidade do solo, visando à produção agrícola sustentável em paisagens tropicais (Projeto GF/2715-02).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética e simbiótica de bactérias fixadoras de nitrogênio isoladas de nódulos da planta isca feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] de solos sob agrofloresta na Amazônia Ocidental

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Bactérias que nodulam leguminosas e fixam nitrogênio atmosférico

O nitrogênio (N), depois do carbono, hidrogênio e oxigênio, é o elemento químico quantitativamente mais abundante na matéria viva, encontrando-se na forma molecular diatômica N_2 . Desta forma é inacessível nutricionalmente para todos os eucariotos e à maioria dos procariotos. Somente apenas algumas bactérias possuem a enzima nitrogenase que é capaz de reduzi-lo para a forma inorgânica combinada NH_3 e, dessa forma, tornar-se disponível para as plantas e outros organismos. Os microrganismos que são capazes de realizar este processo, conhecido como Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), são chamados de fixadores de nitrogênio ou diazotróficos (Siqueira & Franco, 1988; Moreira & Siqueira, 2006).

A FBN é mediada por uma parcela de procariotos que, apesar de relativamente pequena, apresenta alta diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética. Podem ser encontrados entre os aeróbios, anaeróbios e anaeróbios facultativos e em vários grupos filogenéticos representativos de Bactéria e de Archaea (Moreira & Siqueira, 2006). No processamento do nitrogênio, a energia consumida pelo microssimbionte é fornecida pela própria planta.

Estes microrganismos podem viver livres no solo ou na água, na superfície das raízes e folhas das plantas, nos intestinos dos animais, ocupar espaços inter ou intracelulares ou mesmo causando mudanças morfológicas e fisiológicas nas plantas (Siqueira & Franco, 1988; Moreira & Siqueira, 2006). Com este processo, os organismos vivos conseguem aproveitar o N_2 do ar atmosférico, incorporando-o à biosfera. Em termos de importância agrícola, o principal sistema de fixação biológica de nitrogênio é a simbiose rizobio-leguminosa.

A diversidade destes microrganismos pode ser avaliada por meio de características filogenéticas, fenotípicas (morfológicas, bioquímicas, fisiológicas e culturais), simbióticas (por meio de hospedeiros selecionados), métodos serológicos, perfis de bandas de proteínas (SDS-PAGE) e lipopolissacarídeos celulares, relação DNA-DNA, hibridização rRNA:DNA, sequenciamento de 16S rDNA, polimorfismo de comprimentos de fragmentos de DNA e padrões eletroforéticos de enzimas multiloculares (Graham et al., 1991), sendo que estas técnicas possibilitam revelar o grande número de espécies de microrganismos que desempenham esta importante função ecológica. Outras técnicas, entre as quais estão PFGE, RFLP, ARDRA, tRNA-PCR, AFLP, RAPD, AP-PCR e Rep-PCR (Rademaker & Bruijn, 1997) têm sido propostas com o fim de melhorar a discriminação inter e intrataxon, cada uma delas com níveis específicos de resolução para a classificação de bactérias, e também para estudos da diversidade. Esse tipo de técnica geralmente é precedida de uma amplificação de fragmentos de DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

A junção das diferentes técnicas, moleculares e tradicionais, têm permitido caracterizar e identificar diferentes gêneros capazes de realizar o processo de fixação de nitrogênio com leguminosas, sendo descritos até o momento 12 gêneros: *Rhizobium* (Frank, 1889), *Bradyrhizobium* (Jordan, 1984), *Azorhizobium* (Dreyfus et al., 1988), *Sinorhizobium* (Chen et al., 1988), *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1997), *Allorhizobium* (Lajudie et al., 1998), *Burkholderia* (Moulin et al., 2001), *Methylobacterium* (Sy et al., 2001), *Devosia* (Rivas et al., 2002), *Cupriavidus* (Chen et al., 2001), *Ochrobactrum* (Trujillo et al., 2005), *Blastobacter* (Berkun & Eardly, 2002) e *Phyllobacterium* (Valverde et al., 2005).

A substituição do uso de adubos nitrogenados pela FBN é uma opção que reduz custos de produção, suprimindo totalmente as necessidades de N da soja, sendo inclusive desnecessárias as pequenas doses utilizadas nos plantios (Vargas

& Suhet, 1982); tem a grande vantagem de ser um recurso natural renovável, barato e praticamente sem nenhum impacto ambiental negativo, já que reduz o uso de fertilizantes industriais, diminuindo a quantidade de nitratos escoados para as águas superficiais e subterrâneas. A maximização dos benefícios da FBN torna-se, portanto fundamental para o desenvolvimento de uma agricultura sustentável (Döbereiner, 1997).

Para evidenciar a eficiência desta tecnologia, a cultura da soja, na qual os estudos de FBN estão bastante desenvolvidos, é um bom exemplo. A identificação de rizóbios eficientes e sua disponibilização nas áreas de plantio desta leguminosa por meio de inoculantes resultaram em economia ao país da ordem de 2 bilhões de dólares no ano de 2003 (Moreira & Siqueira, 2006). A substituição da adubação nitrogenada pelo processo biológico tornou o cultivo da soja um dos mais competitivos do negócio agrícola brasileiro, já que o Brasil é o segundo produtor mundial deste grão. Para se ter idéia do baixo custo dessa tecnologia para o produtor, uma dose de inoculante utilizada em 50 quilos de sementes de feijão-caupi (suficiente para plantar um hectare) encontra-se em média R\$15,00, uma vez que este precisa de 3 aplicações e cada uma custa R\$5,00. Se optar pelo adubo químico, uréia, o agricultor vai gastar em torno de R\$ 155,00 por hectare.

Uma das alternativas para reduzir a deficiência de N nos solos é a utilização de leguminosas que estabelecem simbiose com as bactérias fixadoras de N como adubos verdes. Um dos benefícios desta prática é que o N é mais lentamente mineralizado e liberado do que os fertilizantes minerais, podendo assim reduzir as perdas por lixiviação (Alfaia et al., 2008). As leguminosas se prestam aos mais diversos usos, sendo que a maioria das espécies de importância econômica é capaz de formar estruturas hipertróficas nas raízes e, excepcionalmente, no caule, denominadas nódulos, e fixar N₂ atmosférico, beneficiando-se desta associação. A taxa de fixação varia com a espécie, mas é

geralmente limitada pelo ambiente (Siqueira & Franco, 1988; Moreira & Siqueira, 2006).

As leguminosas estão bem representadas nos principais ecossistemas brasileiros, em diversidade de espécies e número de indivíduos (Moreira & Siqueira, 2006). Além de contribuir com a matéria orgânica do solo, podem ser utilizadas como adubos verdes, auxiliando no controle da erosão e propiciar reciclagem às camadas superficiais do solo de alguns nutrientes que são perdidos por lixiviação. Além da reciclagem, estas espécies poderiam funcionar como fonte de nutrientes pouco disponíveis no solo como fósforo e molibdênio (Manzatto et al., 2002), além de poderem ser usadas para reflorestamento, produção de moirão vivo, recuperação de solos perdidos, rotação de cultura e em pastagem (Siqueira & Franco, 1988).

2.2 Feijão-caupi

O feijão-caupi (feijão-macáçar ou feijão-de-corda), *Vigna unguiculata* (L.) Walp., é uma planta *Dicotyledonea*, que pertence ao filo *Magnoliophyta*, classe *Magnoliopsida*, ordem *Fabales*, família *Fabaceae*, subfamília *Faboideae*, tribo *Phaseoleae*, subtribo *Phaseolineae*, gênero *Vigna*, e espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp.) (Verdcourt, 1970; Padulosi & Ng, 1997). Representa uma das fontes alimentares mais importantes e estratégicas para as regiões tropicais e subtropicais do mundo. Os Food and Agriculture Organization of the United - FAO (2009), no ano de 2007, a cultura atingiu 3,6 milhões de toneladas produzidas em 12,5 milhões de hectares, em 36 países, destacando-se como maiores produtores a Nigéria, o Níger e o Brasil. Neste último, a produção média anual é de 482 mil toneladas em 1,3 milhões de hectares (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2008) sendo produzido principalmente nas regiões Norte e Nordeste, conquistando atualmente a região Centro-Oeste. Apresenta importância econômica e social significativa do

suprimento alimentar e geração de emprego para as populações rurais e urbanas (Freire et al., 2005).

A origem do feijão-caupi é bastante controversa; no entanto, se aceita, atualmente, como sendo originário da África, tendo sido domesticado nos sistemas agrícolas compostos pelo sorgo e milheto, predominante nas regiões semi-áridas do oeste da África, onde encontra-se uma das maiores áreas de produção de feijão-caupi. No Brasil, este foi introduzido no século XVII, pelos colonizadores portugueses e espanhóis e pelos escravos africanos, provavelmente no Estado da Bahia. A partir do século XVIII, foi levado por colonizadores nordestinos para a região Norte do Brasil (Pereira et al., 1984).

No Brasil, devido ao seu excelente valor nutritivo, o feijão-caupi é plantado principalmente para a produção de grãos, secos ou verdes, visando ao consumo humano. Em outros países, tem diversas utilidades, sendo aproveitadas todas as partes da planta (raízes, folhas, caules, vagens e grãos) para o consumo. Além disso, a sua composição em nutrientes digestíveis, o rendimento de grãos, a massa verde e a massa seca, permitem, também, a sua utilização como forragem verde, feno, silagem, pastagem e farinha para alimentação animal, além de rotação de culturas e adubação verde visando à recuperação da fertilidade dos solos (Watt & Araujo, 1988).

Sua cultura é amplamente adaptada ao clima tropical. Ao contrário do feijão comum e outras leguminosas, pode ser cultivado no Brasil, tanto em clima seco, como em clima úmido. É um dos legumes mais comuns e consumidos no vale da Amazônia por sua capacidade de se adaptar a condições climáticas adversas e tolerância a solos ácidos e de baixa fertilidade (Leite et al., 1999) predominantes nesta região.

Em solos com baixa fertilidade, a introdução de bactérias fixadoras de nitrogênio eficientes pode ajudar na absorção de nutrientes. A bactéria *Bradyrhizobium* em simbiose com raízes de leguminosas tais como o feijão-

caupi, pode reduzir o nitrogênio atmosférico em componentes que a planta hospedeira pode assimilar e, sob condições favoráveis, satisfazer todos os requerimentos de nitrogênio da planta, tornando a aplicação de adubos nitrogenados desnecessários.

A fixação biológica de nitrogênio é reconhecidamente eficiente no feijão-caupi, que quando bem nodulado, pode dispensar o uso de outras fontes de N, atingindo altos níveis de produtividade (Rumjanek et al., 2005). Segundo esses autores, estimativas da contribuição da FBN no campo são bastante variáveis, encontrando-se valores entre 40 a 90% do total de N acumulado pela planta. Lacerda et al. (2004) avaliaram estirpes de rizóbios na simbiose com feijão-caupi em diferentes ambientes, encontrando que as estirpes amazônicas trouxeram aumentos no rendimento dos grãos que variaram de 23,7% a 31,2%, em relação às plantas não inoculadas e sem N mineral.

Por sua promiscuidade, o feijão-caupi tem sido utilizado em diversos estudos com o objetivo de capturar rizóbios capazes de nodular e fixar nitrogênio em diferentes locais (Nóbrega, 2006; Medeiros et al., 2007; Chagas Júnior et al., 2009;), visando encontrar estirpes eficientes que possam ser utilizadas como inoculantes para esta cultura, buscando uma agricultura sustentável.

2.3 Floresta Amazônica

A Amazônia está situada na porção centro-norte da América do Sul; sendo cortada pela linha equatorial e, portanto, compreendida em área de baixas latitudes. Ocupa cerca de dois quintos do continente incluindo 9 países como Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Peru, Suriname e Venezuela. A chamada Amazônia Legal Brasileira, segundo o Decreto-Lei Nº 356 de 15.08.1968, cobre 60% do território em um total de cinco milhões de Km². Abrange os estados do Amazonas, Acre, Amapá, oeste do Maranhão, Mato

Grosso, Rondônia, Pará, Roraima e Tocantins. Caracteriza-se por uma ocupação heterogênea que mescla áreas de exploração extrativista e sistemas agrários mais recentes, com pouca tecnificação e tem baixíssima densidade demográfica. A atividade básica de subsistência dessa sociedade é a pesca.

A grande extensão geográfica da Amazônia Legal resulta em grande diversidade de ambientes, caracterizando diferentes ecossistemas, na maioria constituídos por diferentes tipos de florestas equatoriais e tropicais, cerrados e campos tropicais (Brasil, 2002a; 2002b). É considerada a maior reserva de diversidade biológica no mundo, contendo um quinto da água doce disponível e um terço das florestas latifoliadas. A manutenção dessa biodiversidade tem efeitos importantes para a região e para todo o planeta, fornecendo um importante estoque de material genético utilizado para diferentes pesquisas no desenvolvimento biotecnológico de alimentos e remédios.

2.4 Sistema de uso da terra (SUT)

Os Sistemas Agroflorestais podem ser definidos como técnicas alternativas de uso da terra, que implicam na combinação de espécies florestais com culturas agrícolas, atividades pecuárias ou ambas. Essas combinações podem ser simultâneas ou escalonadas no tempo e espaço e ter caráter temporário ou permanente (Smith et al., 1996; Anderson et al., 1991).

Na Amazônia, o termo “agrofloresta” surgiu no fim da década de setenta e tornou-se popular no início da década de noventa. Em geral, são conhecidos como quintais caseiros e são suficientemente produtivos para satisfazer as necessidades crescentes da população (Current et al., 1995). Podem ser usados como alternativa para reduzir a degradação, manter a umidade do solo e diminuir a pressão sobre as áreas de floresta (McGrath et al., 2000).

Os sistemas agroflorestais se apresentam como alternativa de produção para as propriedades familiares na Região Amazônica, principalmente no que se

refere à diversificação de produtos e à geração de fonte de renda adicional como cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), pupunha (*Bactris gasipaes*), banana (*Musa* spp.), abacaxi (*Ananas comosus*), café (*Coffea arabica*), matapi (*Pouroma cecropiifolia*), ingá (*Inga* sp.), abiu (*Pouteria* sp.) e açai (*Euterpe precatória*) (Fidalgo et al., 2005).

Moreira et al. (2009) avaliaram as mudanças da fertilidade do solo e suas características nos diferentes SUT no alto rio Solimões na Amazônia Ocidental; a Agrofloresta apresentou valores intermediários de pH e variáveis de alumínio e porcentagem de saturação de base e altos valores de matéria orgânica; concluíram que este SUT é importante porque, além de reunir benefícios econômicos para a comunidade, também melhora a fertilidade do solo.

Lima et al. (2009) avaliaram a densidade, eficiência e diversidade de bactérias fixadoras de N₂ que nodulam siratro, isoladas de solos sob diferentes usos na Amazônia Ocidental. Encontraram os maiores números de nódulos foram encontrados na agrofloresta e agricultura e que todas as populações de bactérias que nodulam leguminosas (BNL) induziram aumento no crescimento das plantas de siratro em relação á testemunha absoluta sem N e sem inoculação. Nóbrega (2006) avaliou o efeito de sistemas de uso da terra na Amazônia e concluiu que eles alteram a diversidade cultural da população de bactérias que nodula o feijão-caupi.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem das estirpes

A área de estudo está localizada entre as coordenadas geográficas 4°21' e 4°26' Sul e 69°36' e 70°1' Oeste, no município Benjamin Constant e nas localidades Guanabara II e Nova Aliança, oeste do estado do Amazonas (Figura 1). Esta região, denominada de Alto Solimões, localiza-se na tríplice fronteira Brasil, Colômbia e Peru (Figura 1). As comunidades indígenas da região existem há 22 anos e são formadas por representantes dos índios Ticuna e Cocamo.



FIGURA 1 Localização das áreas de coleta (cidade de Benjamin Constant e comunidades indígenas, Nova Aliança e Guanabara II, no município de Benjamin Constant) (Fidalgo et al., 2005).

Foram estabelecidas seis janelas: Janelas 1 e 2 (Figura 1A) na localidade de Guanabara II, Janelas 3, 4 (Figura 2A) e 5 (Figura 3A) na localidade de Nova Aliança e Janela 6 (Figura 3A) no município de Benjamin Constant (Figura 2). Em cada uma foram coletadas amostras de solo em função do sistema de uso da terra: floresta primária, floresta secundária (em estágio avançado de regeneração ou capoeira velha), floresta secundária (em estágio inicial de regeneração ou capoeira nova), agrofloresta, agricultura e pastagem, totalizando 98 pontos de amostragem, alocados a uma distância de 100 m um do outro e, em alguns casos, a 50 m (Fidalgo et al., 2005). As amostras foram coletadas em março 2004 e cada amostra constituiu-se de 12 amostras simples: 4 coletadas num raio de 3 m e 8 coletadas num raio de 6 m do ponto principal, a uma profundidade de 0-20 cm.

No presente trabalho foram utilizados 188 isolados obtidos por Nóbrega (2006) do solo sob agrofloresta (Figura 3) utilizando o feijão-caupi cultivar BR14 Mulato como planta isca nas Janelas 2 Guanabara II (Figura 1A) e 5 Nova aliança (Figura 3A) (Fidalgo et al., 2005).

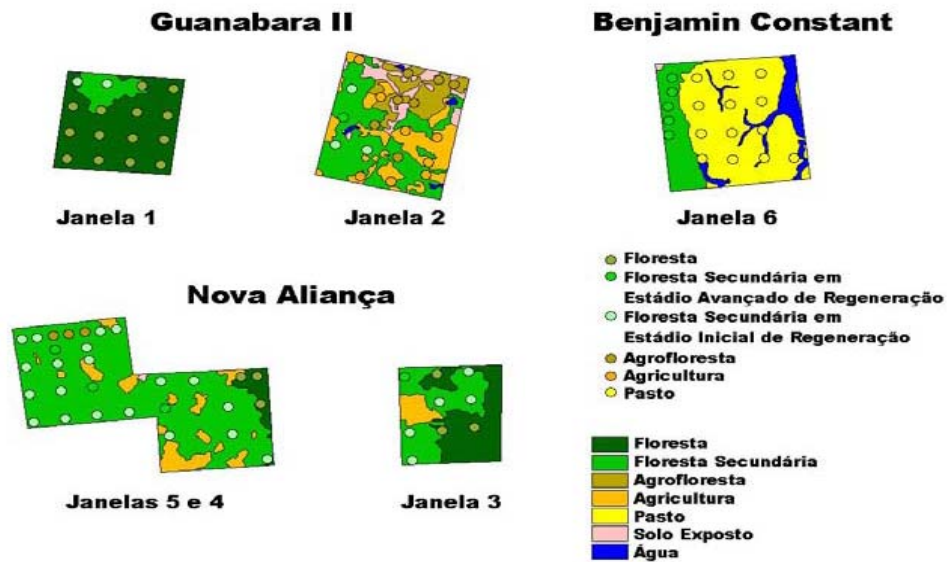


FIGURA 2 Distribuição dos pontos amostrais no mapa de uso e cobertura da terra.



FIGURA 3 Áreas de agrofloresta na Amazônia Ocidental.

3.2 Confirmação das características culturais

As características culturais de cada isolado, previamente caracterizadas por Nóbrega (2006), foram confirmadas em placas de petri contendo meio de cultura com manitol, extrato de levedura e azul de bromotimol a pH 6,8 (meio 79) (Fred & Waksman, 1928), avaliando-se 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: acima de 10 dias); modificação do pH do meio (acidificação, alcalinização e neutralização) conforme Moreira (1991); produção de muco (escassa, pouca, moderada e abundante) e coloração das colônias conforme Jesus et al. (2005).

3.3 Autenticação mediante inoculação no feijão-caupi e avaliação da eficiência simbiótica

A autenticação foi feita com base no resultado do experimento inicial, para 148 isolados, não sendo possível recuperar todos os 188 isolados iniciais obtidos por Nóbrega (2006). Foram conduzidos dois experimentos sucessivos em casa de vegetação do Laboratório de Microbiologia do Solo do DCS/UFLA, onde foi o experimento 1, por 35 dias (11/02 a 16/03/2009) com 75 isolados e o experimento 2 por 35 dias (23/03 a 28/04/2009) com 73 isolados. O objetivo foi avaliar a capacidade nodulífera e a eficiência simbiótica dos isolados na planta hospedeira feijão-caupi .

Para realizar o cultivo do feijão-caupi (cultivar BR17 Gurgueia) foram utilizadas garrafas de vidro âmbar, recicláveis de 500 mL, revestidas com papel alumínio e contendo solução nutritiva de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950) diluída quatro vezes (Figura 4). Nos tratamentos inoculados e no controle sem inoculação e sem nitrogênio mineral a solução nutritiva continha baixa concentração de nitrogênio ($5,25 \text{ mg L}^{-1}$), a qual é considerada uma dose de arranque para o processo de fixação biológica de nitrogênio. Para 4L de água

foram adicionados as seguintes quantidades (mL) das soluções estoque 0,4 de $\text{CaN}_2\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1M); 0,1 de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (1M); 0,6 de KNO_3 (1M); 2,0 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1M); 3,0 de K_2SO_4 (0,5M); 10 de $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4) \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,05M); 200 de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,01M); 1 de FeCl_3 (0,06M); 1 de micronutrientes (H_3BO_3 $4,6^{-5}\text{M}$; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 9^{-6}M ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $7,6^{-7}\text{M}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $3,2^{-7}\text{M}$ e $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 4^{-7}M)

No controle sem inoculação com nitrogênio, utilizou-se a solução de Hoagland completa, preparada com as mesmas soluções estoque só que com mais quantidade de cada uma para o mesmo volume final.

Como suporte para as raízes e para promover o contato da solução nutritiva com o feijão-caupi, foram colocadas duas fitas de papel filtro de 2 cm de largura e comprimento igual à altura da garrafa dentro desta, além de uma pequena quantidade de algodão na boca, servindo como suporte para a semente. Posteriormente, todas as garrafas foram autoclavadas por 40 minutos à pressão de $1,5 \text{ Kg/cm}^2$ a 127°C .

Para a inoculação, as sementes de feijão-caupi foram desinfestadas superficialmente com álcool 98% por 30 segundos e hipoclorito de sódio 2% por 2 minutos. Em seguida foram lavadas seis vezes com água destilada estéril e imersas na mesma por 1 hora e posteriormente foram colocadas em placas de petri com algodão estéril umedecido por 24 horas na câmara de crescimento a 28°C ou até que fosse emitida a radícula das sementes.

Para a composição dos tratamentos, os inoculantes foram preparados em meio líquido 79, colocando uma alçada de células bacterianas, previamente crescidas em meio sólido, e deixadas sob cultivo até por 10 dias a 28°C em agitação constante. Foi inoculado 1 mL deste em cada semente no momento do plantio.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, com três repetições. Os experimentos 1 e 2 foram, respectivamente, constituídos por 80 e

78 isolados, 75 e 73 estirpes isoladas por Nóbrega (2006). Além disso, em cada experimento foram utilizados 3 controles positivos, com inoculação das estirpes referência INPA 03-11B, UFLA 03-84 e BR 3267, recomendadas como inoculantes para feijão-caupi pelo Ministério de Agricultura e Pecuária (MAPA) baseado em Lacerda et al. (2004), Soares et al. (2006) e Martins et al. (2003), mais dois controles negativos, sem inoculação (com e sem nitrogênio mineral) para cada experimento.

Para avaliar a eficiência simbiótica das bactérias fixadoras de nitrogênio, as plantas foram coletadas 35 dias após a instalação dos experimentos, determinando-se o peso da matéria fresca e seca da parte aérea (MFPA e MSPA respectivamente), número e matéria seca de nódulos (NN e MSN, respectivamente) e determinação do índice SPAD (*Soil Plant Analysis Development*) das folhas dos terços médio e superior calculando a média a partir de 30 leituras realizadas por planta, utilizando o clorofilômetro modelo Minolta SPAD-502, previamente calibrado segundo indicações do fabricante (Minolta Camera, 1989).

Entre os parâmetros utilizados como indicadores do nível de N nas plantas, está a intensidade da cor verde da folha, sendo esta determinada por meio de mensurações de refletância (Ma et al., 1996) e de absorção (Várvel et al., 1997), por meio do medidor de clorofila (SPAD *Soil Plant Analysis Development*). A medição indireta de clorofila por meio do clorofilômetro Minolta SPAD-502 tem sido estudada em muitas culturas, demonstrando correlação linear e positiva entre os valores do índice SPAD e o nível de N das plantas (Argenta et al., 2002; Silveira et al., 2003).

Após a determinação do tempo de crescimento (TC), MFPA e o NN, a parte aérea e os nódulos foram levados para secagem em sacos de papel em estufa de circulação forçada (65°C a 70°C) até obter o peso constante para determinar sua matéria seca. A eficiência relativa de cada tratamento foi

calculada segundo a fórmula: $ER = (MSPA \text{ inoculada} / MSPA \text{ com N}) \times 100$, em que ER é a eficiência relativa, MSPA inoculada é a matéria seca da parte aérea da planta com inoculação e MSPA com N é a matéria seca da parte aérea da planta com N mineral.

Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA, sendo a variável número de nódulos transformado com LogX, conforme recomendação do programa SAS Learning Edition 2.0 (SAS Institute, 2004). As médias agrupadas pelo teste Scott-Knott (1974) a 5% de probabilidade, com auxílio do programa SISVAR (Ferreira, 2000).

A distribuição dos isolados nos diferentes grupos culturais e classes de eficiência relativa foi estudada graficamente, mediante emprego de estatística descritiva.



FIGURA 4 Panorama do experimento de autenticação e eficiência simbiótica em casa de vegetação

3.4 Diversidade genética pela técnica BOX-PCR

A diversidade genética dos 88 isolados que nodularam o feijão-caupi, foi avaliada pela técnica BOX-PCR. Foram incluídas as estirpes tipo: *Azorhizobium dobereinerae* (BR5401^T), *Azorhizobium caulinodans* (BR5410^T), *Cupriavidus taiwanensis* (LMG19424^T), *Burkholderia sabiae* (BR3405), *Mesorhizobium plurifarum* (BR3804), *Bradyrhizobium* sp. (UFLA 03-84) e *Sinorhizobium* sp. (BR6806). Esta técnica analisa multilocus e codifica regiões altamente conservadas e repetidas localizadas dentro do genoma, normalmente no espaço intergênico, de 154 pares de bases, apresentando maior grau de resolução entre os isolados (Versalovic et al., 1994; Judd et al., 1993; Selenska-Pobell et al., 1995; Santos et al., 1999).

Para o preparo das amostras, colônias isoladas das estirpes crescidas em meio 79 foram colocadas em microtubos de 2 mL contendo 1 mL de água ultra pura estéril e posteriormente aquecidas por 10 minutos a 100°C e, em seguida, resfriadas no gelo.

A reação de amplificação (25 µL) foi realizada utilizando os seguintes volumes (µL): 9,45 de água ultrapura estéril; 1,25 de dNTPs (100mM); 5,0 de tampão Gitschier 5X; 0,4 de BSA (20mg mL⁻¹); 2,5 de DMSO (100%); 1,0 *primer* BOX (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (Versalovic et al., 1994) (0,3 µg µL⁻¹); 0,4 de Taq (5U µL⁻¹); 5,0 de DNA. A amplificação foi feita no termociclador Eppendorf e consistiu de: um ciclo de desnaturação inicial, a 95°C, por 7 minutos; 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 53°C e 8 minutos a 65°C; um ciclo de extensão final a 65°C por 16 minutos e manutenção a 4°C. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese a 45V, em gel de agarose a 1,5%, de 20 x 20 cm, em tampão TAE 0,5 X, por 15 horas, em temperatura ambiente. Utilizou-se como peso molecular o marcador 100 kb plus DNA Ladder (InvitrogenTM). Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídio e fotografado.

A diversidade genética das estirpes foi analisada pela observação da presença ou ausência de bandas polimórficas no gel. Para a presença ou ausência das bandas, atribuíram-se, respectivamente, os valores 1 e 0, para a construção de uma matriz. Os dados da matriz foram agrupados, utilizando-se o algoritmo *Unweighted Pairgroup Mean Arithmetic Method* (UPGMA) e o coeficiente de Jaccard do programa NTSYS-pc, versão 2.0 (Rohlf, 1997).

3.5 Diversidade das sequências do gene 16S rDNA

Dos grupos de similaridade obtidos no BOX-PCR, 20 isolados foram selecionados para o sequenciamento do 16S rDNA. As bactérias foram crescidas em meio 79 a 28°C pelo tempo de crescimento de cada uma, avaliado anteriormente. A partir do cultivo de células, adotou-se o método de Ausubel et al. (2005) para extração do DNA genômico. A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose (1%) e a eletroforese realizada em tampão TAE 1X a 110V durante 40 minutos. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio e visualizado no transluminador.

Uma alíquota de 5µL do DNA extraído foi utilizada para um volume final de 50 µL de reação de PCR (0,2 mM dNTP, 2,5 mM MgCl₂, 0,2 µM do primer 27F (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3') (Lane, 1991), 0,2 µM do primer 1492R (5'- GGTTACCTTGTTACGACTT – 3') (Lane, 1991), 1 U *Taq* DNA polimerase, 1 X buffer PCR e água ultra pura estéril). A amplificação foi feita no termociclador Eppendorf e consistiu de: um ciclo de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; 40 ciclos de 40 segundos a 94°C de desnaturação, 40 segundos a 55°C de anelamento, 1,5 minutos a 72°C de alongação e 7 minutos da alongação final a 72°C. Os produtos amplificados foram separados em um gel a 1% de agarose e corado com brometo de etídio e visualizado no transluminador.

As sequências obtidas foram submetidas ao “*Basic Local Alignment Search Tool*”- BLAST para comparação com as espécies depositadas no banco de dados GenBank. As análises evolucionárias moleculares e filogenéticas foram conduzidas utilizando a distância genética baseada na plataforma (Dereeper et al., 2008), a qual realiza todas as as análises necessárias.. A árvore filogenética foi reconstruída pelo método da máxima verossimilhança pelo programa PhyML v.3, com o modelo de substituição HKY85, estimando-se o parâmetro de distribuição gamma, as taxas de transição e transversão e a proporção de invariáveis (Guindon & Gascuel, 2003). A representação gráfica da árvore foi feita pelo TreeDyn v198.3 (Chevenet et al., 2006).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Características culturais

Dos 188 isolados caracterizados por Nóbrega (2006), 148 apresentaram viabilidade, sendo confirmadas as características culturais da maioria dos isolados.

Foram formados nove grupos de similaridade, de acordo com as características culturais tempo de crescimento (TC) e pH (Figura 5): de crescimento rápido, 46 isolados (31,08%) que acidificam o meio (RA), 6 isolados (4,05%) sem alteração do pH do meio (RN) e 22 isolados (14,86%) que alcalinizam o meio (RAL); de crescimento intermediário, 8 isolados (5,40%) que acidificam o meio (IA), 25 isolados (16,89%) sem modificar o pH do meio (IN) e 25 isolados (16,90%) que alcalinizam o meio (IAL) e de crescimento lento, 2 isolados (1,36%) que acidificam o meio (LA), 2 isolados (1,36%) sem modificar o pH do meio (LN) e 12 isolados (8,10%) que alcalinizam o meio (LAL).

A maioria dos isolados apresentou crescimento rápido com acidificação do meio (31,08%). Nóbrega (2006) caracterizou culturalmente 1010 isolados obtidos dos SUT floresta secundária em estágio inicial de regeneração, pastagem, agrofloresta, agricultura, floresta secundária em estágio avançado de regeneração e da floresta primária, encontrando que a maioria dos isolados (49,2%) acidificou o meio e apresentou crescimento rápido. Jesus et al. (2005), usando o siratro como planta isca, estudaram os sistemas sob cultivo de mandioca, cultivo de pupunheira e floresta de terra firme, encontrando amplo número de isolados capazes de acidificar o meio e com crescimento rápido.

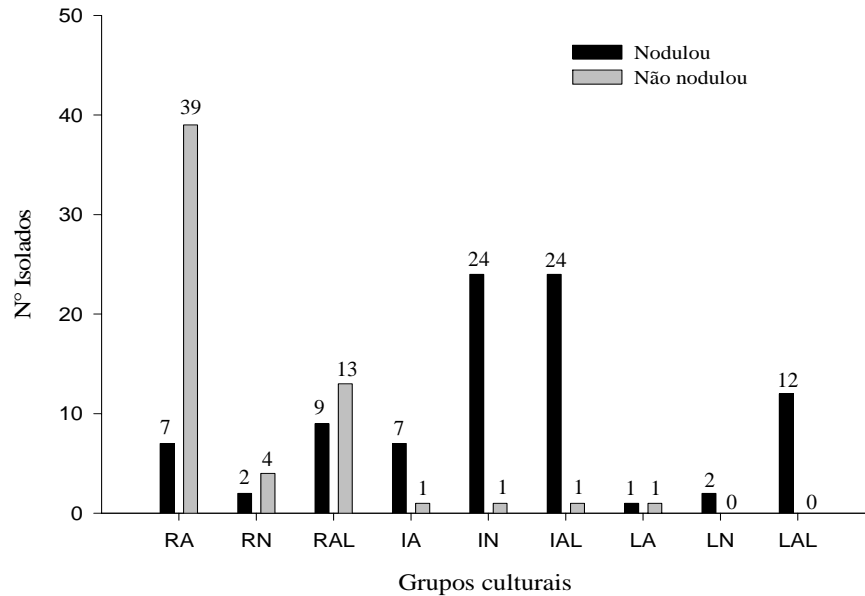


FIGURA 5 Distribuição dos 148 isolados do solo sob agrofloresta em grupos culturais de acordo com o tempo de crescimento e alteração do pH do meio: crescimento rápido com acidificação do meio (RA); sem alteração do pH do meio (RN) e alcalinizando o meio (RAL); de crescimento intermediário acidificando o meio (IA), sem modificar o pH do meio (IN) e com alcalinização do meio (IAL); de crescimento lento acidificando o meio (LA), sem modificar o pH do meio (LN) e alcalinizando o meio (LAL).

Os isolados que apresentaram o comportamento de crescimento rápido com alcalinização do meio podem pertencer ao gênero *Azorhizobium*, pois segundo Dreyfus et al. (1988) e Moreira et al. (2006), estas são características próprias deste gênero. Os isolados que produzem reação ácida, visível ou não, e de crescimento rápido, podem pertencer ao gênero *Rhizobium* (Frank, 1889) e *Sinorhizobium* (Chen et al., 1988), *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1997) ou *Allorhizobium* (Lajudie et al., 1998), enquanto os de crescimento rápido a intermediário podem pertencer ao gênero *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1997).

Os isolados de crescimento lento e que alcalinizam o meio, provavelmente pertencem ao gênero *Bradyrhizobium* (Jordan, 1984). Estes resultados são indicativos de que a área em estudo apresenta ampla diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio, abrangendo vários gêneros dentre aqueles descritos até o momento.

4.2 Autenticação mediante inoculação em feijão-caupi e eficiência simbiótica

4.2.1 Autenticação mediante inoculação em feijão-caupi

Dos 148 isolados avaliados no experimento de autenticação, 88 (59%) apresentaram capacidade de nodulação (Tabela 1). Dentre estes últimos, 74 isolados (84%) pertencem à Janela 2-Guanabara II e 14 isolados (16%) à Janela 5-Nova Aliança. Em relação ao total de cada janela, estes números correspondem a 58% e 70%, respectivamente (Tabela 1 e Figura 6).

Segundo dados apresentados por Fidalgo et al. (2005) a Janela 5 apresenta alta porcentagem de pontos de floresta secundária em estado avançado e inicial de regeneração. Este tipo de floresta é resultante de um processo natural de regeneração da vegetação, em áreas onde no passado houve corte raso da floresta primária. Nesses casos, quase sempre as terras foram temporariamente usadas para agricultura ou pastagem e a floresta ressurgiu espontaneamente após o abandono destas atividades. Este tipo de floresta desempenha um papel ecológico importante em termos de crescimento florestal, acúmulo de biomassa, controle de erosão, conservação de nutrientes, benefícios hidrológicos e manutenção da biodiversidade (Pereira & Vieira, 2001). O que não acontece na Janela 2, onde maior parte dos SUT são agricultura, tendo este uma maior ação antrópica afeitando a biodiversidade da área.

Os resultados encontrados por Guimarães (2009), onde a maioria dos isolados que não estabeleceram simbiose com o feijão-caupi foram obtidos da Janela 2-Guanabara II.

TABELA 1 Autenticação quanto à nodulação de feijão-caupi de 148 estirpes de bactérias isoladas de amostras de solos sob agrofloresta na Amazônia Ocidental.

Isolados	Nodulação	Isolados	Nodulação	Isolados	Nodulação	Isolados	Nodulação
17A1	+	17B2	+	20C2	+	24AA5	+
17A1A	+	17B4a	-	20C3	+	24AA6	-
17A2	+	17B4b	-	20C4	+	24AA9	-
17A3	+	17B5	-	20C5	+	24B4	-
17A4	+	17B6	+	20C7b	-	24AB1	+
17A5	+	17B9	+	20C10	-	24AB2	+
17A7	+	17B10	+	22A2	-	24AB7	+
17A8	+	17B11	+	22A3	+	24AB8	+
17A9	+	17B13	-	22A4	+	24AC1	-
17A10	+	17C1	-	22A5	+	24AC2	-
17AA1	+	17C2	-	22A6	-	24AC4	+
17AA2	+	17C3	+	22A7	+	24AC5	-
17AA3	+	17C5	+	22A8	-	24AC6	-
17AA4	+	17C6	+	22B3	+	24AC7	-
17AA5	+	17C8	-	22B4	-	24AC9	-
17AA6	-	17C9	-	22B6	+	24AC10	-
17AA7	+	17C10	-	22B7	+	24B1	-
17AA9	+	20A2	+	22B8	+	24B3	-
17AA10	+	20A3	+	22B9	+	24B6a	-
17AB1	+	20A4	+	22B10	-	24B6b	+
17AB3	-	20A6	-	22C1	-	24B7	-
17AB4	+	20A7	-	22C3	-	24B10	-
17AB5	+	20A10	+	22C5	+	25B1	+
17AB8	+	20B1	-	22C6	+	25B3	-
17AB9	+	20B2	-	22C8	-	25B4	-
17AB10	-	20B3	+	22C10	-	66C1	-
17AC1	+	20B4	+	24A1	+	66C2	+
17AC2	-	20B6	+	24A2	-	67A1	+
17AC3	+	20B7	-	24A4	+	67A3	+
17AC5	-	20B8	+	24A5	+	67A4	+
17AC7	+	20B9	+	24A7	-	67A5	-
17AC9	+	20B10	+	24AA3	-	67AC3	+
17AC10	+	20C1	+	24AA4	-	67AC4	+

...Continua...

TABELA 1, Cont.

Isolados	Nodulação	Isolados	Nodulação	Isolados	Nodulação	Isolados	Nodulação
67AC5	+	67B7	-	67C4	+	67C7	+
67B5	-	67B8	+	67C5	-	67C8	+
67B6	+	67C2	+	67C6	+	67C10	-

Sinal positivo (+): presença de nódulos nas plantas de feijão-caupi.

Sinal negativo (-): ausência de nódulos nas plantas de feijão-caupi.

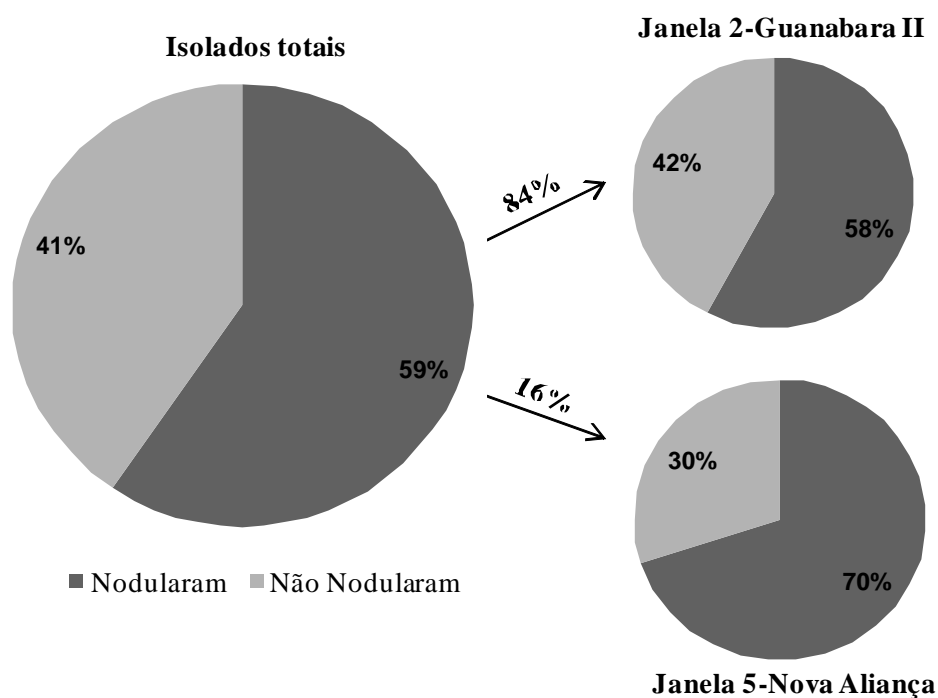


FIGURA 6 Comportamento das 148 estirpes de bactérias quanto à nodulação de feijão-caupi e a sua porcentagem nas Janelas 2 – Guanabara II e 5 – Nova Aliança isoladas de amostras de solo sob agrofloresta na Amazônia Ocidental.

As características culturais dos isolados que apresentaram nodulação positiva estão representadas na Tabela 2. Utilizando as características TC e pH, foi possível o agrupamento dos isolados em 9 grupos de similaridade: RA: 7 isolados (7,97%), RN: 2 isolados (2,27%), RAL: 9 isolados (10,22%), IA: 7 isolados (7,97%), IN: 24 isolados (27,27%), IAL: 24 isolados (27,27%), LA: 2 isolados (1,13%), LN: 2 isolados (2,27%), LAL: 12 isolados (13,63%) (Figura 5).

TABELA 2 Principais características culturais de 88 isolados de bactérias que estabeleceram simbiose com o feijão-caupi, isoladas de amostras de solo sob agrofloresta na Amazônia Ocidental.

Isolados	TC	pH	Goma	Cor	Isolados	TC	pH	Goma	Cor
17A1	R	A	M	C	17AB8	I	AL	M	C
17A1A	R	A	P	A	17AB9	L	AL	P	C
17A2	I	N	P	A	17AC1	L	A	M	A
17A3	L	AL	A	C	17AC3	R	AL	P	I
17A4	I	AL	M	C	17AC7	L	AL	M	A
17A5	I	AL	M	C	17AC9	I	N	M	C
17A6	I	AL	A	C	17AC10	I	AL	M	C
17A7	L	AL	A	C	17B2	R	A	A	A
17A8	L	AL	A	C	17B6	I	AL	M	C
17A9	I	AL	M	C	17B9	I	N	M	C
17A10	L	AL	P	A	17B10	I	N	M	C
17AA1	I	N	P	A	17B11	L	AL	M	C
17AA2	I	AL	M	I	17C3	I	AL	M	C
17AA3	I	AL	M	C	17C5	I	N	A	A
17AA4	I	N	M	C	17C6	I	N	M	C
17AA5	I	AL	M	C	20A2	L	AL	M	C
17AA7	I	N	M	C	20A3	I	AL	P	C
17AA9	I	AL	M	C	20A4	R	AL	P	I
17AA10	R	AL	M	C	20A10	L	AL	M	C
17AB1	R	AL	P	C	20B3	R	A	P	C
17AB4	I	AL	P	C	20B4	I	AL	M	C
17AB5	I	N	A	C	20B6	I	AL	P	C

...Continua...

TABELA 2, Cont.

Isolados	TC	pH	Goma	Cor	Isolados	TC	pH	Goma	Cor
20B8	L	AL	P	C	24AA5	I	N	M	A
20B9	L	N	M	C	24AB1	I	N	M	C
20B10	L	AL	P	C	24AB2	R	AL	A	C
20C1	L	AL	P	A	24AB7	I	N	M	C
20C2	R	A	P	C	24AB8	I	N	P	C
20C3	I	N	P	A	24AC4	I	A	M	C
20C4	I	AL	P	C	24B6	R	A	P	A
20C5	R	N	P	I	25B1	I	AL	M	C
22A3	I	A	A	C	66C2	I	N	M	C
22A4	R	AL	M	C	67A1	R	A	M	C
22A5	L	N	M	C	67A3	I	N	M	C
22A7	I	A	A	C	67A4	I	A	M	C
22B3	R	AL	P	I	67AC3	I	A	M	C
22B6	I	A	M	C	67AC4	I	N	M	C
22B7	I	AL	M	C	67AC5	I	AL	M	C
22B8	I	N	M	C	67B6	I	N	M	C
22B9	R	N	M	C	67B8	I	AL	M	C
22C5	I	A	A	A	67C2	I	AL	M	C
22C6	I	N	A	C	67C4	I	N	M	C
24A1	I	N	M	C	67C6	I	AL	M	C
24A4	I	AL	P	A	67C7	R	AL	M	C
24A5	R	AL	P	C	67C8	I	N	M	C

(TC) Tempo de crescimento: (R) rápido (24h a 3 dias), (I) intermediário (4 a 5 dias) e (L) lento (6 a 10 dias); pH do meio: (A) ácido, (N) neutro, (AL) alcalino; Goma: (A) abundante, (M) moderado, (P) pouco; Cor: (C) creme, (A) amarela e (I) incolor.

Os controles com e sem nitrogênio não apresentaram nodulação, indicando que o experimento não apresentou contaminação; esta condição é indispensável neste tipo de estudo. A ampla diversidade de espécies neste SUT pode ser devida ao fato de se tratar de área que se encontra em fase de sucessão, com maior demanda de nitrogênio e que apresenta, por tanto maior estímulo para a ocorrência de populações mais eficientes e diversas de BNL. A carência de nitrogênio gera pressão seletiva para as bactérias fixadoras de nitrogênio, levando a uma adaptação das populações, em que elementos móveis podem ser

transferidos horizontalmente, entre gêneros de bactérias, conferindo-lhes a capacidade de fixação biológica (Nóbrega, 2006). Além disso, no momento da coleta, os pontos apresentavam ampla diversidade de indivíduos e de espécies vegetais (Fidalgo et al., 2005), o que pode promover a diversidade de microrganismos no solo, devido à maior diversidade de fontes de carbono, favorecendo diversos grupos nutricionais.

Nóbrega (2006) encontrou que a maior parte dos isolados testados que apresentavam capacidade de nodular feijão-caupi e alcalinização do meio de cultura, pertenciam ao sistema de agrofloresta. Essa informação é corroborada os resultados encontrados neste trabalho, onde uma grande porcentagem apresentou esta característica (59 isolados ou 39,86%). Os isolados que apresentaram a característica de acidificar o meio foram os que apresentaram menor capacidade de nodular o feijão-caupi. Guimarães (2009) encontrou que apenas 17,75% dos isolados do SUT agricultura da Amazônia Ocidental, capazes de nodular feijão-caupi, apresentavam as características culturais RA. No presente trabalho a porcentagem foi similar (15,20%).

4.2.2 Eficiência simbiótica

Os isolados apresentaram poucas diferenças quanto à porcentagem de eficiência relativa (ER%), sendo agrupados pelo teste de Scott-Knott em três grupos: eficiente (grupo “a”), intermediário (grupo “b”) e ineficiente (grupo “c”), tendo este último incluído à testemunha sem N mineral. Não foi encontrada estirpe que tenha apresentado eficiência relativa igual ou superior ao controle com nitrogênio. A estirpe BR 3267 (ER = 56%) foi a de melhor desempenho entre as testemunhas já utilizadas como inoculante para o feijão-caupi. Dentre as estirpes do SUT, a de maior eficiência foi a 67A4 (ER = 79%) (Tabela 3).

TABELA 3 Número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN), matéria fresca da parte aérea (MFPA), matéria seca da parte aérea (MSPA), índice SPAD e eficiência relativa (ER%) de 88 isolados, três controles positivos (INPA 03-11B, UFLA 03-84 e BR 3267) e dois controles negativos sem inoculação (com e sem N).

Isolados	Índice SPAD	NN	MSN	MFPA	MSPA	ER %
			mg planta ⁻¹	g planta ⁻¹	mg planta ⁻¹	
C/N	41,53 a	0 c	0,0 c	5,39 a	713,5 a	100 a
67A4	59,90 a	41 a	127,7 a	3,77 b	542,3 b	79 b
67C7	62,26 a	49 a	130,7 a	3,72 b	520,3 b	75 b
17A1	55,80 a	41 a	97,3 a	3,27 b	495,0 b	72 b
17A8	61,60 a	37 a	73,3 b	3,81 b	494,0 b	72 b
17B11	57,70 a	41 a	68,0 b	3,46 b	449,0 b	65 b
20C1	64,43 a	27 a	40,0 c	2,95 b	438,3 b	64 b
20B4	63,26 a	20 b	54,3 b	3,20 b	427,3 b	62 b
17A6	60,10 a	44 a	71,0 b	3,19 b	413,0 b	60 b
20C5	61,80 a	34 a	50,3 c	3,29 b	392,0 b	57 b
67AC4	49,70 a	21 b	40,0 c	2,97 b	420,7 b	57 b
BR 3267	57,41 a	28 a	64,3 a	2,65 b	393,0 b	56 b
22B3	38,63 a	11 c	37,0 c	2,20 c	376,7 b	55 b
17C3	62,93 a	28 a	39,3 c	2,52 c	358,0 c	52 c
17A5	62,16 a	39 a	57,3 b	2,30 c	355,0 c	51 c
20C2	59,73 a	24 b	55,0 b	2,56 c	349,3 c	51 c
20C4	50,53 a	11 c	59,3 b	2,18 c	348,3 c	50 c
17AA7	39,96 a	46 a	51,7 b	2,47 c	338,7 c	49 c
20B8	62,00 a	22 b	57,3 b	2,37 c	337,0 c	49 c
17AB4	49,50 a	35 a	40,7 c	2,57 c	358,3 c	48 c
20A2	75,55 a	27 a	64,5 b	2,48 c	330,0 c	48 c
17AC1	65,56 a	27 a	110,7 a	2,72 c	321,3 c	47 c
22B8	32,53 b	31 a	41,7 c	2,37 c	345,0 c	47 c
24A5	29,16 b	20 b	13,7 d	2,13 c	350,0 c	47 c
67AC3	52,33 a	36 a	41,3 c	2,70 c	347,3 c	47 c
17A3	40,73 a	43 a	47,7 c	2,73 c	314,7 c	46 c
17B2	23,00 c	4 c	5,0 d	1,90 c	318,0 c	46 c
24A1	43,15 a	8 c	23,5 d	1,96 c	318,0 c	46 c
17AC7	70,56 a	31 a	60,3 b	2,52 c	310,7 c	45 c
24B6	29,53 b	45 a	36,3 c	2,30 c	330,0 c	45 c

...Continua...

TABELA 3, Cont.

Isolados	Índice SPAD	NN	MSN	MFPA	MSPA	ER
			mg planta ⁻¹	g planta ⁻¹	mg planta ⁻¹	%
17AA2	49,63 a	15 b	44,3 c	2,03 c	303,7 c	44 c
17AA10	27,36 b	15 b	29,7 c	2,27 b	328,7 c	44 c
22C5	31,43 b	40 a	39,3 c	2,30 c	323,7 c	44 c
17AA5	66,96 a	27 a	46,7 c	2,07 c	295,3 c	43 c
17AC10	52,46 a	43 a	77,7 b	2,23 c	299,7 c	43 c
17A10	35,90 b	11 c	27,3 c	2,11 c	291,3 c	42 c
17AA3	43,93 a	17 b	35,0 c	2,36 c	287,7 c	42 c
20C3	19,25 c	11 c	8,0 d	1,90 c	311,5 c	42 c
24AB7	28,85 b	3 c	15,0 d	2,88 c	288,0 c	42 c
UFLA 03-84	36,95 a	28 a	37,0 b	2,25 c	301,6 c	42 c
17A1A	43,13 a	33 a	74,0 b	1,66 c	285,3 c	41 c
17AB1	34,36 b	10 c	22,7 d	1,76 c	286,3 c	41 c
17AB9	56,83 a	25 b	39,3 c	1,97 c	283,7 c	41 c
20B3	44,33 a	18 b	41,7 c	1,86 c	282,7 c	41 c
17AC9	55,93 a	24 b	57,3 b	2,60 c	278,3 c	40 c
22A5	39,93 a	23 b	43,0 c	1,99 c	273,3 c	40 c
22B9	18,83 c	15 b	13,7 d	1,98 c	296,7 c	40 c
67C6	72,20 a	32 a	77,5 b	2,06 c	277,0 c	40 c
INPA 03-11b	47,80 a	33 a	41,0 b	2,15 c	280,6 c	40 c
17C5	19,70 c	53 a	40,7 c	2,10 b	280,0 c	38 c
20A3	53,76 a	25 b	43,7 c	2,10 c	259,7 c	38 c
66C2	30,10 b	13 c	22,3 d	1,93 c	283,0 c	38 c
17A4	60,46 a	31 a	32,0 c	1,76 c	252,3 c	37 c
17AA4	27,05 b	14 c	14,0 d	1,59 c	257,5 c	37 c
22C6	42,70 a	43 a	44,7 c	2,18 c	274,3 c	37 c
24AB1	20,75 c	11 c	7,0 d	1,96 c	272,0 c	37 c
24AC4	39,56 a	35 a	30,7 c	2,11 c	270,7 c	37 c
17AB8	38,60 a	20 b	43,0 c	1,95 c	247,5 c	36 c
17C6	44,23 a	30 a	38,7 c	1,73 c	247,7 c	36 c
24AB2	37,73 a	28 a	40,0 c	2,11 c	267,3 c	36 c
67B8	29,63 b	41 a	32,3 c	2,25 c	267,7 c	36 c
67C8	34,63 b	44 a	32,0 c	2,23 c	268,7 c	36 c
24AA5	19,20 c	26 a	28,5 c	1,93 c	257,5 c	35 c

...Continua...

TABELA 3, Cont.

Isolados	Índice SPAD	NN	MSN	MFPA	MSPA	ER
			mg planta ⁻¹	g planta ⁻¹	mg planta ⁻¹	
67AC5	30,46 b	44 a	35,7 c	1,93 c	261,3 c	35 c
67B6	21,93 c	34 a	20,0 d	2,16 c	256,7 c	35 c
20B10	54,93 a	20 b	48,3 c	1,72 c	233,0 c	34 c
24A4	7,53 c	24 b	19,3 d	1,74 c	254,7 c	34 c
17A7	47,83 a	22 b	32,3 c	2,01 c	229,7 c	33 c
20B9	39,26 a	13 c	23,0 c	1,89 c	228,0 c	33 c
67A1	27,30 b	37 a	40,7 c	2,01 c	244,7 c	33 c
22B7	23,63 c	22 b	21,7 d	1,75 c	237,0 c	32 c
17A2	33,20 b	50 a	44,0 c	1,90 c	229,0 c	31 c
17AB5	31,70 b	34 a	20,5 d	1,87 c	229,5 c	31 c
17B10	42,15 a	32 a	31,0 c	2,15 c	230,5 c	31 c
20A4	35,46 b	5 c	7,2 d	1,07 c	217,0 c	31 c
22A4	52,50 a	25 b	44,3 c	1,52 c	213,3 c	31 c
22A7	22,06 c	21 b	25,3 d	1,98 c	232,0 c	31 c
67C2	25,70 b	45 a	29,7 c	1,79 c	228,3 c	31 c
17AA1	14,40 c	6 c	2,0 d	1,64 c	224,3 c	30 c
17AA9	38,90 a	19 b	35,7 c	1,65 c	205,3 c	30 c
67A3	58,66 a	52 a	59,0 b	1,72 c	205,3 c	30 c
67C4	29,60 b	46 a	40,5 c	1,72 c	204,5 c	30 c
20B6	28,53 b	27 a	22,7 d	1,95 c	215,3 c	29 c
S/N	15,50 c	0 c	0,0 c	1,51 c	218,8 c	29 c
17AC3	24,40 c	7 c	6,0 d	1,44 c	190,3 c	26 c
22A3	28,26 b	24 b	11,3 d	1,57 c	195,7 c	26 c
24AB8	15,03 c	14 c	8,7 d	1,45 c	194,3 c	26 c
22B6	16,36 c	19 b	15,0 d	1,59 c	187,7 c	25 c
17A9	36,76 a	21 b	16,7 d	1,63 c	160,7 c	23 c
20A10	23,10 c	7 c	8,7 d	1,09 c	161,0 c	23 c
25B1	43,63 a	10 c	11,7 d	1,20 c	157,7 c	23 c
17B9	18,30 c	34 a	11,0 d	1,46 c	166,0 c	22 c
17B6	37,80 a	42 a	28,3 c	1,15 c	143,3 c	21 c
CV%	46,25	45,26	48,63	26,60	31,95	30,42

*Letras iguais na mesma coluna pertencem ao mesmo grupo, a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott

De acordo com o índice SPAD, as estirpes referência UFLA 03-84, INPA 03-11b e BR 3267 e um amplo grupo de isolados, junto com o controle com N mineral, foram agrupados apresentando os maiores valores (grupo a), podendo indicar que estes isolados foram eficientes na fixação de nitrogênio, não sendo este resultado refletido na MSPA de alguns deles pelo tempo de avaliação do experimento, sendo curto para o desenvolvimento das plantas.

Santos & Vicentini (2003) compararam o índice SPAD de duas isolinhas de soja, sendo uma capaz e a outra não de nodular com *Bradyrhizobium japonicum*. Estes autores verificaram maior índice SPAD nas plantas que apresentaram nodulação, em função de estresse nitrogenado muito mais marcado na soja não nodulante, causado por estresse hídrico.

Quarenta e seis isolados (53,40%) apresentaram maior NN, sendo agrupados (grupo a) com todas as estirpes de referência. Avaliando a ER% destas, o comportamento variou entre os grupos b e c, sendo este último onde se encontra o controle sem nitrogênio. Ao comparar os resultados obtidos com esta variável e os de MSPA e índice SPAD, observou-se que nem sempre as plantas que apresentavam maior NN apresentaram maior valor na MSPA, nem maior índice; isto mostra que nem todas as bactérias que formam nódulos são eficientes na fixação de nitrogênio ou que, algumas vezes, poucos nódulos contendo bactérias eficientes, podem ser mais úteis no momento de realizar o processo.

Segundo dados obtidos por Nóbrega (2006), as populações dos pontos 17A e 24A, pertencentes ao sistema agrofloresta, apresentaram menor MSPA em relação às plantas inoculadas com a estirpe UFLA 03-84 e similares àquelas inoculadas com a estirpe INPA 03-11b. Os resultados deste experimento não demonstraram esse comportamento, pois os isolados desses pontos foram muito heterogêneos com relação às estirpes recomendadas; porém, segundo sua ER%, fazem parte do grupo “b”, intermediário. A mesma autora concluiu que estirpes

oriundas dos pontos 24A apresentam-se com potencial para isolamento de estirpes eficientes e competitivas. No presente trabalho, estas estirpes não apresentaram alta ER%, sendo agrupadas como ineficientes (grupo c). Estas diferenças podem ser consequência do uso de cultivares diferentes de feijão-caupi nos dois experimentos, pelas condições ambientais diversas ou pelo uso de soluções nutritivas diferentes, já que Nóbrega (2006) utilizou a de Jensen (Jensen, 1942) e não a de Hoagland.

Os resultados alcançados com as estirpes recomendadas UFLA 03-84 e INPA 03-11b não foram semelhantes aos encontrados por Lacerda et al. (2004), Martinazzo (1989), Pereira et al. (2004) e Soares et al. (2006), os quais corroboraram a indicação e aprovação daquelas estirpes como novos inoculantes de feijão-caupi em substituição à BR 2001 na reunião da RELARE - Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbiológicos de Interesse Agrícola realizada em junho de 2004.

Segundo Soares et al. (2006), a estirpe INPA 03-11b apresentou melhores resultados na MSPA, ER% e teor de N que a UFLA 03-84 utilizando o feijão-caupi como planta isca; no presente trabalho estas estirpes foram inferiores quanto a MSPA e ER%, sendo agrupadas como estirpes ineficientes (grupo c). Porém, a INPA 03-11b apresentou melhores resultados no índice SPAD, um método indireto de determinação do teor de N. Resultados obtidos das estirpes recomendadas no presente trabalho, provavelmente estiveram influenciadas por condições climáticas como temperatura, a qual, na época dos experimentos, apresentou uma média de 30°C e o tempo de avaliação, o qual foi curto para o desenvolvimento das plantas de feijão-caupi.

Dentre as estirpes recomendadas para feijão-caupi, a BR 3267, mostrou-se superior em relação a todos os parâmetros avaliados, superando as estirpes INPA 03-11b e UFLA 03-84.

Ensaios feitos por Lacerda et al. (2004), comparando estirpes de rizóbios isolados de diferentes SUT, capazes de nodular e fixar nitrogênio com feijão-caupi (UFLA 03-48, UFLA 03-36, UFLA 03-129, UFLA 03-170, UFLA 03-128, UFLA 03-39, UFLA 03-25, UFLA 03-35 e BR 2001), também encontraram que a estirpe INPA 03-11b apresentou melhores resultados no NN e MSN quando comparada com as demais estirpes, exceto MSN em relação à UFLA 03-84. Segundo o mesmo autor, a estirpe UFLA 03-84 destacou-se na MSPA e, conseqüentemente, na ER%, situando-se no mesmo grupo da testemunha com N mineral. Os dados aqui obtidos demonstram que esta estirpe não teve o mesmo comportamento, sendo agrupada no grupo ineficiente (grupo c); no entanto, plantas inoculadas com a estirpe UFLA 03-84, junto com a INPA 03-11b e BR 3267, apresentaram alto índice SPAD, mostrando a eficiência desta em fixar nitrogênio atmosférico, sendo agrupada como eficientes (grupo a). Os resultados encontrados para MSPA podem estar relacionados com o tempo de avaliação, o qual pode ter sido curto para que a planta respondesse ao processo de FBN, aumentando a MSPA.

O estabelecimento e o desenvolvimento da simbiose rizobio-leguminosa são influenciados por fatores climáticos e edáficos. Portanto, se uma espécie não é capaz de nodular ou de ser eficiente neste processo, não deve ser considerada ineficiente até seja confirmado e testado em outras condições que possam ser propícias para seu bom funcionamento.

4.3 Diversidade genética pela técnica BOX-PCR

Os isolados 17AA10, 24A5, 17B6, 20C3, 67C4 e 67C7 e as estirpes tipo ORS571^T, BR6806 e BR3804 não apresentaram uma boa amplificação, conforme pode ocorrer com algumas estirpes e oligonucleotídeos específicos (Judd et al., 1993) e, portanto, estes isolados não foram utilizados na análise conjunta.

Através do agrupamento realizado no dendograma a 70% de similaridade, foi possível encontrar 72 grupos, estando a maioria formados por apenas um isolado (Figura 7). As estirpes 17A5 e 17A3, 67C2 e 67A3, 17C6 e 17C5 apresentaram 100% de similaridade entre si (Figura 7). Quando comparadas as características culturais, os isolados 17C6 e 17C5 apresentaram as mesmas características culturais, com crescimento intermediário sem mudança no pH do meio (IN); os isolados 17A5 e 17A3 apresentaram a mesma mudança no pH do meio (para alcalino) mas o tempo de crescimento variou de lento (isolado 17A3) a de intermediário (isolado 17A5). Este parâmetro é diretamente influenciado pela temperatura de incubação, sendo esta um fator ambiental importante porque pode retardar ou acelerar o crescimento dos microrganismos. Os isolados 67C2 e 67A3 apresentaram o mesmo tempo de crescimento sendo pH diferente, alcalino (67C2) e neutro (67A3).

Com a metodologia de rep-PCR é possível se obter uma boa discriminação das amostras em nível de estirpe (Olive & Bean, 1999), embora ela não seja capaz de agrupá-las quanto à espécie ou gênero (Galli-Terasawa et al., 2003; Kaschuk et al., 2006a, 2006b). Como os oligonucleotídeos iniciadores não são específicos para gênero, espécies ou estirpes, a técnica permite que os oligonucleotídeos iniciadores generalizados sejam utilizados para comparar diferentes bactérias dentro de uma mesma população.

A técnica de rep-PCR é uma ferramenta universal para os estudos de variações genômicas em organismos procariontes e reflete a variabilidade do genoma por inteiro (Igal et al., 2001). As sequências ERIC e BOX são altamente conservadas entre os rizóbios e foram utilizadas para distinguir e classificar diferentes estirpes em estudos de diversidade da população de *Bradyrhizobium* em solos da Polônia (Madrzak et al., 1995), para avaliar o impacto de vários parâmetros ambientais em uma população de *Rhizobium leguminosarium* bv.viciae (Labes et al., 1996) e em diversos outros estudos

populacionais de rizóbios (De Bruijn, 1992; Selenska-Pobell et al., 1995; Laguerre et al., 1997; Vinuesa et al., 1998; Sikora et al., 2002).

No Brasil, muitos trabalhos utilizaram a técnica de rep-PCR e obtiveram resultados satisfatórios quanto à análise de diversidade e variabilidade genética das populações de rizóbios (Moreira et al., 2006; Chen et al., 2000; Ferreira & Hungria, 2002; Galli-Terasawa et al., 2003; Grange & Hungria, 2004; Alberton et al., 2006; Hungria et al., 2006; Kaschuk et al., 2006 a; 2006b; Guimarães, 2009)

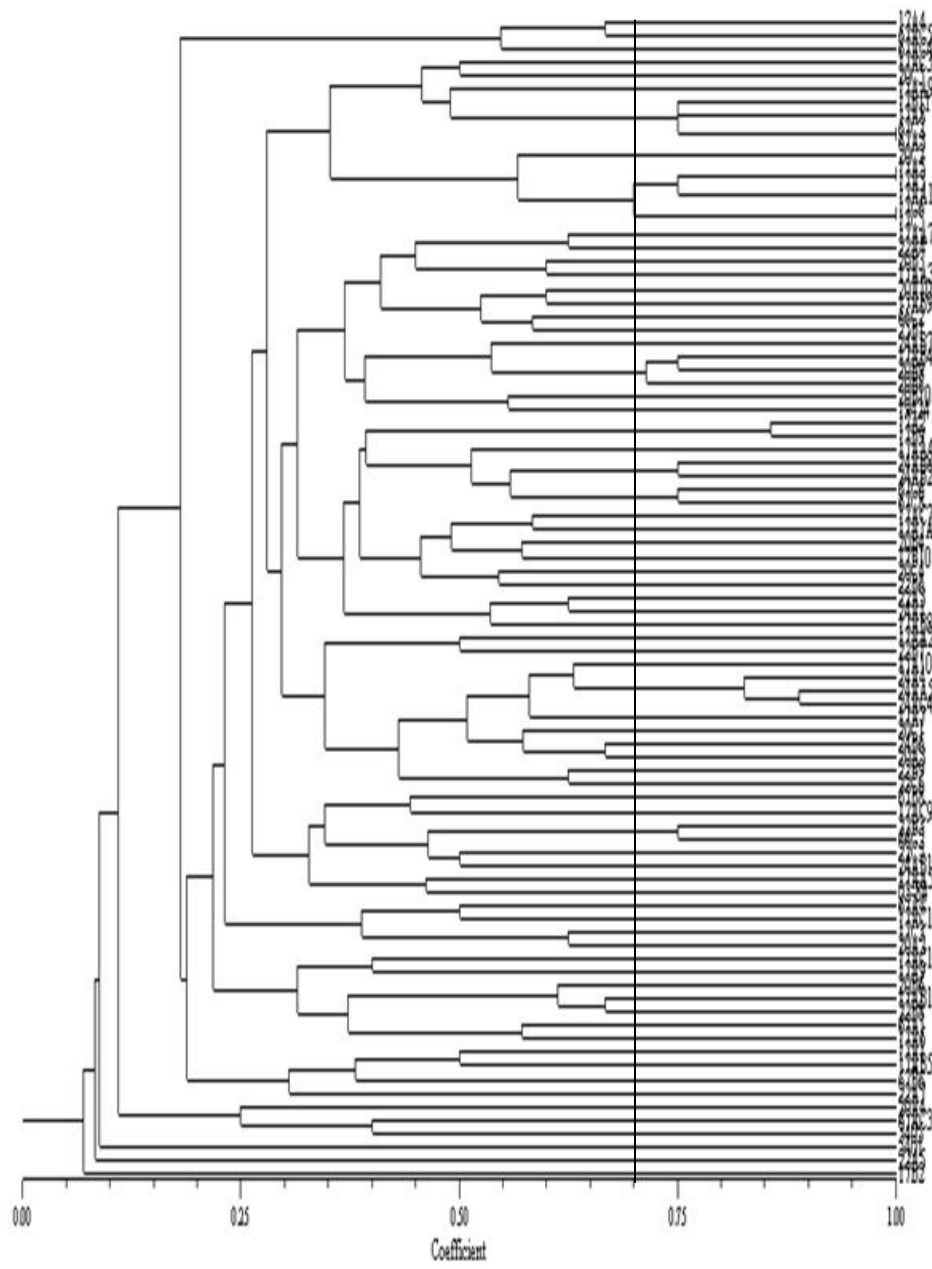


FIGURA 7 Dendrograma a 70% de similaridade genética avaliada pela técnica do rep-PCR utilizando o primer BOX das estirpes de bactérias que nodulam feijão-caupi isoladas de solo sob agrofloresta na Amazônia Ocidental e das estirpes tipo.

As estirpes tipo não apresentaram padrão de bandas semelhante a nenhum isolado avaliado, o que indica uma alta diversidade dentre os isolados.

Guimarães (2009) avaliou o SUT agricultura mediante a técnica BOX-PCR encontrando ampla diversidade, formando 49 grupos a 80% de similaridade em 62 isolados. Avaliando a diversidade dos SUT floresta primária, floresta secundária em estágio avançado de regeneração ou capoeira velha, floresta secundária em estágio inicial de regeneração ou capoeira nova, pastagem, agricultura e agrofloresta, utilizando o siratro como planta isca, Lima et al. (2009) encontraram que os SUT agricultura e agrofloresta foram os que apresentaram maior diversidade genética.

4.4 Sequenciamento 16S rDNA

Depois de formar os grupos mediante a técnica de BOX-PCR foram escolhidos 20 isolados para sequenciar, obtendo sequências parciais da região 3' - 5', que codifica o 16S rDNA sendo analisadas filogeneticamente. Essas sequências variaram de 416 a 850 pb e foram submetidas ao banco de dados "GenBank" (National Center for Biotechnology Information, 2010), mostrando uma porcentagem de identidade de 97% a 100% com isolados já estudados (Tabela 4) sendo as relações filogenéticas apresentadas na Figura 8.

TABELA 4 Identificação de isolados que nodulam e fixam nitrogênio no feijão-caupi baseadas em sequências do GenBank (NCBI).

Isolado	ER %	Índice SPAD	Características culturais	Número de pares de bases	Sequência mais similar encontrada no GenBank		
					Espécie	% de similaridade	Número de acesso
17A1	72 b	55,80 a	RA	719	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	99	AB490238
17A1A	41 c	43,14 a	RA	725	<i>Paenibacillus humicus</i>	99	AM411528
17AA1	30 c	14,40 c	IN	583	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	99	FJ534721
17AA2	44 c	49,63 a	IAL	842	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	100	FJ390895
17AA3	42 c	43,93 a	IAL	651	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	97	FJ534648
17AA7	49 c	39,96 a	IN	633	<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	98	FJ418695
17AB1	41 c	34,36 b	RAL	780	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	100	AM748956
17B2	46 c	23,00 c	RA	850	<i>Enterobacter cloacae</i>	99	EF120473
17B9	22 c	18,30 c	IN	571	<i>Bosea</i> sp.	96	AJ968693
17AC1	47 c	65,56 a	LA	699	<i>Bacillus pumilus</i>	100	GU117649
20A4	31 c	35,46 b	RAL	735	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	99	EU927145
20B3	41 c	44,33 a	RA	687	<i>Paenibacillus</i> sp.	100	EU839649
20C2	51 c	59,73 a	RA	681	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	100	AB490238
20C4	50 c	50,53 a	IAL	716	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	99	FJ534721
22B9	40 c	18,83 c	RN	726	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	99	FJ390926
24AA5	35 c	19,20 c	IN	416	<i>Bradyrhizobium elkani</i>	97	FJ390895
66C2	38 c	30,10 b	IN	719	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	99	FJ390926
67A4	79 b	59,90 a	IA	698	<i>Rhizobium etli</i>	99	FJ534690
67C2	31 c	25,70 b	IAL	784	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	99	FJ418693
67C8	36 c	34,63 b	IN	585	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	99	FJ534721

Características culturais no meio YMA: (RA) tempo de crescimento rápido acidificando o meio, (RAL) tempo de crescimento rápido alcalinizando o meio, (IA) tempo de crescimento intermediário acidificando o meio, (IN) tempo de crescimento intermediário sem modificar o pH do meio, (IAL) tempo de crescimento intermediário alcalinizando o meio, (LA) tempo de crescimento lento acidificando o meio. *Letras iguais na mesma coluna pertencem ao mesmo grupo, a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott



FIGURA 8 Dendrograma utilizando a plataforma Phylogeny.fr (Dereeper et al., 2008) das relações genéticas das sequências parciais do gene 16S rDNA das estirpes capazes de nodular feijão-caupi comparadas com o banco de dados GenBank.

A comparação das sequências com o “GenBank” evidenciou que dos 20 isolados avaliados 18 chegaram até o nível de espécie, variando a porcentagem de identidade entre 100% (4 isolados), 99% (11 isolados), 98% (1 isolado) e 97% (2 isolados). Dois isolados até gênero, com 100% de identidade (Tabela 4).

Os resultados demonstram que a maior parte dos isolados obtidos do SUT agrofloresta (30%), da Amazônia Ocidental, pertence a *Badyrhizobium elkanii*. Zilli et al. (2006) encontrou o mesmo resultado em solos de cerrado do Piauí, onde avaliou as relações filogenéticas de estirpes de *Bradyrhizobium* e a sua contribuição na fixação biológica de nitrogênio em feijão-caupi.

O isolado 67A4, o qual apresentou alta ER% (Tabela 3), foi identificado em 99% de similaridade com *Rhizobium etli*. As relações filogenéticas demonstram que corresponde a esse gênero, porém encontra-se um pouco distante das espécies comparadas, indicando que corresponde a uma outra espécie, próxima ao *R. etli*, ou a uma estirpe dessa espécie; por isso no presente trabalho será referido apenas como *Rhizobium* sp.

O maior número de isolados (55%) pertence ao gênero *Bradyrhizobium*, incluindo representantes de três espécies descritas até o momento *B. elkanii*, *B. japonicum* e *B. liaoningense*. Law et al. (2007) demonstraram que isolados de *Bradyrhizobium* associados a nódulos de raiz no feijão-caupi e amendoim (*Arachis hypogaea*) em Botswana e Sul da África são geneticamente diversos tal como encontrado no presente estudo.

O agrupamento da estirpe 17AA7 com *Bradyrhizobium liaoningense* e com *Bradyrhizobium iriomotense*, não deixa claro a qual espécie pertence. O mesmo ocorreu com a estirpe 17AC1, entre *Bacillus safensis* e *Bacillus pumilus*. Por este motivo, neste trabalho serão referidos como *Bradyrhizobium* sp. e *Bacillus* sp, respectivamente. O gênero *Bacillus* caracteriza uma rizobactéria promotora do crescimento de planta que habita o solo e com frequência é isolado da rizosfera de diversas plantas cultivadas (Araújo, 2008). Li & Alexander

(1988) determinaram que *Bacillus* pode aumentar a nodulação e a competitividade do rizóbio pelos múltiplos efeitos positivos na rizosfera das plantas. Diversos estudos tem sido feitos avaliando a coinoculação do *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum/elkanii* em soja (Araújo & Hungria, 1999) e em feijão-caupi (Araújo et al., 2009), observando um aumento na nodulação e na produtividade de grãos com o uso desses microrganismos conjuntamente.

A estirpe 17B9 foi agrupada, com identidade de 98%, como *Bosea* sp. O gênero *Bosea* e a espécie *Bosea thiooxidans* foram descritos pela primeira vez por Das et al. (1996), a partir de um isolado de solo agrícola. Este gênero pertence filogeneticamente à família *Bradyrhizobiaceae*, que já foram outros gêneros de bactérias que nodulam leguminosas.

O isolado 17B2 apresentou 99% de identidade com *Enterobacter cloacae*. A primeira citação de um isolado de *Enterobacter cloacae* como bactéria endofítica em raízes de milho foi realizada por Hinton & Bacon (1995). Posteriormente, Shen et al. (1996) reportaram sua presença na rizosfera de arroz. Fernandes et al. (2003) reportaram a incidência destas bactérias nas raízes e folhas de coqueiros cultivados na baixada litorânea de Sergipe. No ano seguinte, Silveira et al. (2004) verificaram que a espécie *Enterobacter cloacae*, estirpe PEP91, aumentou o crescimento de mudas de pepino. E Teixeira et al. (2005) isolaram esta espécie de plantas de mandioca provenientes do estado do Amazonas. Lima et al. (2009) identificaram espécies de *Enterobacter* sp. capazes de nodular siratro, além de *Paenibacillus* sp., o qual, também foi identificado no presente trabalho como o isolado 20B3 com 100% de identidade.

Teixeira et al. (2005) isolaram a bactéria *Stenotrophomonas maltophilia*, utilizando mandioca como planta isca, em solos provenientes dos estados de São Paulo e da Bahia. Esta bactéria foi também encontrada no presente estudo com 99% de identidade com o isolado 20A4. Cerigioli (2006), estudando a diversidade de bactérias endofíticas na cultura do milho (*Zea mays*),

encontrou que *S. maltophilia* promove aumento da matéria seca da raiz e da parte aérea de plantas de milho. Lima et al. (2009) identificou *Stenotrophomonas* sp. como espécie nodulífera em siratro.

O isolado 17A1, que encontra-se no grupo “b” de eficiência relativa (Tabela 3), apresentou identidade de 99% com *Ochrobactrum anthropi*. As primeiras cepas de *Ochrobactrum* foram isoladas de amostras clínicas humana e do solo (Holmes et al., 1988; Tatum et al., 1974). Ngom et al. (2004) relataram pela primeira vez o gênero *Ochrobactrum* como bactéria simbiótica capaz de fixar nitrogênio, obtida de nódulos de *Acacia mangium*, nas Filipinas e na Tailândia.

Fernandes et al. (2003) realizaram a caracterização de estirpes de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros de Sergipe com alta eficiência de fixação biológica do N₂ em associação com guandu (*Cajanus cajan*) e caupi (*Vigna unguiculata*), classificando-as nos gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*. No presente trabalho, além desses gêneros foram identificados *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter*, *Ochrobactrum* e *Bosea*.

Pueppke et al. (1994) reportaram que *R. etli* e *R. tropici* podem nodular outras leguminosas além do feijão *Phaseolus*, incluindo *Vigna unguiculata*, *Indigofera* spp., *Maculata glyricidia* e *Formosus cianthu*, porém os nódulos formados nestas espécies são anormais e, muitas vezes, senescentes, escuros e sem consistência. O contrário foi encontrado neste trabalho, onde estas espécies foram eficientes na simbiose e na fixação de nitrogênio atmosférico com o feijão-caupi.

Lima et al. (2009), utilizando como planta isca o siratro, estudaram diferentes SUT da Amazônia Ocidental, dentre desses a agrofloresta, objeto de estudo do presente trabalho, identificando *Rhizobium etli*, *R. tropici*, *R. galegae*, *Sinorhizobium medicae*, *Burkholderia* sp. e *Azorhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp. *B. elkanii* e *B. japonicum*. No presente trabalho foram identificadas algumas

destes isolados, além de outros gêneros (*Paenibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter*, *Ochrobactrum* e *Bosea*).

5 CONCLUSÕES

Encontrou-se alta diversidade genotípica e simbiótica entre os isolados que nodulam feijão-caupi.

Dos isolados eficientes na nodulação com a planta isca e seqüenciados do solo da Amazônia Ocidental sob o SUT agrofloresta, 55% pertencem ao gênero *Bradyrhizobium*, abrangendo diferentes espécies.

O isolado 67A4, referido como *Rhizobium* sp., apresentou maior eficiência simbiótica, juntamente com outros 11 isolados que pertenceram aos gêneros *Bradyrhizobium*, *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter*, *Ochrobactrum* e *Bosea*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTON, O.; KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean. **Soil Biology and Biochemistry**, London, v. 38, n. 6, p. 1298-1307, June 2006.

ALFAIA, S. S.; UGUEN, K.; RODRIGUES, M. R. L. Manejo da Fertilidade dos solos na Amazônia. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. **Biodiversidade do solo em Ecossistemas Brasileiros**. Lavras: UFLA, 2008. p. 117-141.

ANDERSON, S.; BIDWELL, T. G.; ROMANN, L. **Introduction to agroforestry alternatives**. Stillwater: Oklahoma State University, 1991.

ARAÚJO, A. S. F.; CARNEIRO, R. F. V.; BEZERRA, A. A. C.; ARAÚJO, F. F. Co-inoculation rhizobia and *Bacillus subtilis* in cowpea and Leucaena: effects on nodulation, N₂ fixation and plant growth. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 1, p. 182-185, jan./fev. 2010.

ARAÚJO, F. F. Inoculação de sementes com *Bacillus subtilis* formulado com farinha de ostras e desenvolvimento de milho, soja e algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 2, p. 456-462, mar./abr. 2008.

ARAÚJO, F. F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum* /*Bradyrhizobium elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 9, p. 1633-1643, set. 1999.

ARGENTA, G.; SILVA, P. R. F. da; MIELNICZUK, J.; BOTOLLINI, C. G. Parâmetros de planta como indicadores do nível de nitrogênio na cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 4, p. 519-527, abr. 2002.

AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A., AND STRUHL, K. **Current Protocols in Molecular Biology**. Londres: J. Wiley, 2005.

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

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

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Cenários para a Amazônia Legal**: bases para discussão. Brasília, 2002a. CD ROM.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Cenários para a Amazônia Legal**: sistematização de dados. Brasília, 2002b. CD ROM.

CERIGIOLI, M. M. **Diversidade de bactérias endofíticas de milho (*Zae mays* L.) e potencial para promoção de crescimento**. 2006. 132 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

CHAGAS JÚNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A. de; OLIVEIRA, A. N. de; WILLERDING, A. Efetividade de rizóbios e caracterização fenotípica dos isolados que nodulam feijão-caupi em solos da Amazônia central. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 39, n. 3, p. 489-493, set. 2009.

CHEN, L. S.; FIGUEREDO, A.; PEDROSA, F. O. HUNGRIA, M. Genetic characterization of soybean rhizobia in Paraguay. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 11, p. 5099-5103, Nov. 2000.

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

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

CHEVENET, F.; BRUN, C.; BAÑULS, A. L.; JACQ, B.; CHRISTEN, R. TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of Trees. **BMC Bioinformatics**, London, v. 7, n. 439, p. 1-9, Oct. 2006.

CURRENT, D.; LUTZ, E.; SCHERR, S. The cost and benefits of agroforestry to farmers. **The World Bank Research Observer**, Washington, v. 10, n. 2, p. 151-180, Aug. 1995.

DAS, S. K.; MISHRA, A. K.; TINDALL, B. J.; RAINEY, F. A.; STACKEBRANDT, E. Oxidation of thiosulfate by a new bacterium, *Bosea thiooxidans* (strain BI-42) gen. nov., sp. nov.: analysis of phylogeny based on chemotaxonomy and 16S ribosomal DNA sequencing. **Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 46, n. 4, p. 981-987, 1996.

DE BRUIJN, F. J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 7, p. 2180-2187, July 1992.

DEREEPER, A.; GUIGNON, V.; BLANC, G.; AUDIC, S.; BUFFET, S.; CHEVENET, F.; DUFAYARD, J. F.; GUINDON, S.; LEFORT, V.; LESCOT, M.; CLAVERIE, J.M.; GASCUEL, O. **Phylogeny.fr**: robust phylogenetic analysis for the non-specialist Nucleic Acids Research. Paris: Réseau National des Génopoles, 2008. Disponível em: <www.phylogeny.fr>. Acesso em: 14 dez. 2009.

DÖBEREINER, J. A importância da fixação biológica de nitrogênio para a agricultura sustentável. **Biociência**, Brasília, v. 1, n. 1, maio 1997. Disponível em: <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/revistabiociencia1ID-0wLrpPCbk3.pdf>>. Acesso em: 14 jna. 2010.

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

FAY, P. **Photosynthetic Micro-organisms**: nitrogen fixation. Oxford: Clarendon, 1981. (Ecology, v. 1).

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; RODRIGUES, L. S. Bactérias diazotróficas associadas a coqueiros na região de baixada litorânea em Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 12, p. 1509-1517, dez. 2003.

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. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FERREIRA, M. C.; HUNGRIA, M. Recovery of soybean inoculant strain from uncropped soil in Brazil. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 79, n. 2/3, p. 139-152, Dec. 2002.

FIDALGO, E. C. C.; COELHO, M. R.; ARAUJO, F. O.; MOREIRA, F. M. S.; DOS SANTOS, H. G.; SANTOS, M. L. M.; HUISING, J. **Levantamento do uso e cobertura da terra de seis áreas amostrais relacionadas ao projeto BiosBrasil (Conservation and sustainable management of below-ground biodiversity: Phase I), Município de Benjamin Constant (AM)**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAOSTAT**: crops, cow peas, dry. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acesso em: 4 out. 2009.

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

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

FREIRE, F. R. F.; ROCHA, M. M. de; RIBEIRO, V. Q.; RAMOS, S. R. R.; SOBRINHO, C. A.; SITTOLIN, I. M.; BELMINO, C. S.; SOUZA e SILVA, S. M.; DA SILVA, P. H. S.; CÂMARA, J. A. S.; BASTOS, E. A. **Feijão-caupi: 30 anos de pesquisa e desenvolvimento**. Teresina: Embrapa do Meio-Norte, 2005.

GALLI-TERASAWA, L.V.; GLIENKE-BLANCO, C.; HUNGRIA, M. Diversity of a soybean rhizobial population adapted to a Cerrados soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 19, n. 9, p. 933-939, Dec. 2003.

GRAHAM, P. H.; SADOWSKY, M. J.; KEYSER, H. H.; BARNET, Y. M.; BRADLEY, R. S.; COOPER, J. E.; LEY, J. de; JARVIS, B. D. W.; ROSLYCKY, E. B.; STRIJDOM, B. W.; YOUNG, J. P. W. Proposed minimum standards for the description of new genera and species of root and stem-nodulation bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 41, n. 4, p. 582-587, Oct. 1991.

GRANGE, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, London, v. 36, n. 9, p. 1389-1398, Sept. 2004.

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

GUINDON, S.; GASCUEL, O. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. **Systematic Biology**, Oxford, v. 52, n. 5, p. 696-704, Oct. 2003.

HINTON, D. M.; BACON, C. W. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 129, n. 2, p. 117-125, June 1995.

HOAGLAND, D.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: California Agriculture Experiment Station, 1950. (Circular, n.347).

HOLMES, B.; POPOFF, M.; KIREDJIAN, M.; KERSTERS, K. *Ochrobactrum anthropi* gen. nov. sp. nov. from human clinical specimens and previously known as group Vd. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 38, n. 4, p. 406-416, Oct. 1988.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L. M. O.; MEGIAS, M.; LAMRABET, Y.; PROBANZA, A.; GUTIERRE-MANERO, F. J.; CAMPO, R. J. Genetic diversity of indigenous tropical fast-growing rhizobia isolated from soybean nodules. **Plant and Soil**, The Hague, v. 288, n. 1/2, p. 343-356, Oct. 2006.

IGUAL, J. M.; VALVERDE, A.; CERVANTES, E.; VELÁSQUEZ, E. Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updates molecular techniques in their study. **Agronomie**, Paris, v. 21, p. 561-568, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.
Levantamento sistemático da produção agrícola. Rio de Janeiro, 2004-2008.
v. 16/20.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS (INPE). **Monitoring of the Brazilian Amazon Forest by Satellite 2000-2001.** Brasília: INPE, FUNCATE, 2002.

JARVIS, B. D. W.; BERKUM, P. van; CHEN, W. X.; NOUR, S. M.; FERNANDEZ, M. P.; CLEYET-MAREL, J. C.; GILLIS, M. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium cicer*, *Rhizobium mediterraneum* and *Rhizobium tianshansense* to *Mesorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 47, n. 3, p. 895-898, July 1997.

JENSEN, 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**, Sydney, v.66, n.1, p.98-102, 1942.

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

JORDAN, D. C. *Rhizobiaceae* Conn, 1938. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. D. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. London: Williams and Wilkins, 1984. p. 234-244.

JUDD, A. K.; SCHNEIDER, M.; SADOWSKY, M. J.; DE BRUIJN, F. J. Use of repetitive sequences and the polymerase technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 6, p. 1702-1708, June 1993.

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CAMPO, R. J. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 32, n. 2, p. 210-220, June 2006a.

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

LABES, G.; ULRICH, A.; LENTZSCH, P. Influence of bovine slurry deposition on the structure of nodulating *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* soil populations in a natural habitat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 5, p. 1717-1722, May 1996.

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, MG, v. 51, n. 293, p. 67-82, jan. 2004.

LAGUERRE, G.; van BERKUM, P.; AMARGER, N.; PREVOST, D. Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 12, p. 4748-4758, Dec. 1997.

LAJUDIE, P. de; WILLENS, A.; NICK, G.; MOREIRA, F.; MOLOUBA, F.; HOSTE, B.; TORCK, U.; NEYRA, M.; COLLINS, M. D.; LINDSTROM, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 48, n. 2, p. 369-382, Apr. 1998.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics**, New York, 1991. p. 115-148.

LAW, I. J.; BOTHA, W. J.; MAJAULE, U.; PHALANE, F. Symbiotic and genomic diversity of cowpea bradyrhizobia from soils in Botswana and South Africa. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 43, n. 6, p. 653-663, Aug. 2007

LEITE, M. L.; FILHO J. S. V.; RODRIGUES J. D. Produção e componentes de produção de cultivares de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), em Botucatu - SP. **Revista de la Facultad de Agronomía**, Maracaibo, v. 25, p. 115-124, 1999.

LI, D. M.; ALEXANDER, M. Co-inoculation with antibiotic producing bacteria to increase colonization and nodulation by rhizobia. **Plant and Soil**, The Hague, v. 108, n. 2, p. 211-220, May 1988.

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

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

MA, B. L.; MORRISON, M. J.; DWYER, L. M. Canopy light reflectance and field greenness to assess nitrogen fertilization and yield of maize. **Agronomy Journal**, Madison, v. 88, n. 6, p. 915-920, Nov. 1996.

MADRZAK, C. J.; GOLINSKA, B.; KROLICZAK, J.; PUDELKO, K.; LAZEWSKA, D.; LAMPKA, D.; SADOWSKY, M. J. Diversity among field populations of *Bradyrhizobium japonicum* in Poland. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 4, p. 1194-1200, Apr. 1995.

MANZATTO, C. V.; JUNIOR, E. F.; PERES, J. R. R. **Uso Agrícola dos Solos Brasileiros**. Rio de Janeiro: Embrapa, 2002.

MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; RANGEL, F. W.; RIBEIRO, J. R. A.; NEVES, M. C. P.; MORGADO, L. B.; RUMJANEK, N. G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 38, n. 6, p. 333-339, Oct. 2003.

MARTINAZZO, A. F. **Potencial de fixação em N₂ em *Vigna unguiculata* Walp. em diferentes condições ambientais**. 1989. 154 p. Dissertação (Mestrado em ciência do solo) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí.

MCGRATH, D. A.; COMERFORD, N. B.; DURYEA, M. L. Litter dynamics and monthly fluctuations in soil phosphorus availability in Amazonian agroforestry. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 131, n. 1/3, p.167-184, June 2000.

MEDEIROS, A. V. de; SILVA, K. J. P.; MARTINS, C. M.; BORGES, W. L. Tolerância de bactérias fixadoras de nitrogênio provenientes de municípios do Rio Grande do Norte à temperatura e salinidade. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, Campina Grande, v. 7, n. 2, p. 160-168, jul./dez. 2007.

MINOLTA CAMERA. **Manual for chlorophyll meter SPAD 502**. Osaka: Radiometric Instruments Divisions, 1989. 22 p.

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

MOREIRA, F. M. S.; CRUZ, L.; FARIA, S. M.; MARSH, T.; MARTINEZ-ROMERO, E.; PEDROSA, F. O.; YOUNG, J. P. W. *Azorhizobium doebereineriae* sp. nov. Microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 29, n. 3, p. 197-206, Apr. 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 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 Brasil. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, n. 7, p. 889-895, July 1998.

MOREIRA, F. M. S.; NÓBREGA, R. S. A.; JESUS E. C.; Differentiation in the fertility of inceptisols as related to land use in the upper Solimões river region, western Amazon. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 408, n. 2, p. 344-355, Dec. 2009.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006.

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

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. GenBank Overview. Rockville, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>>. Acesso em: 7 jan. 2010.

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

NGOM, A.; NAKAGAWA, Y.; SAWADA, H.; TSUKAHARA, J.; WAKABAYASHI, S.; UCHIUMI, T.; NUNTAGIJ, A.; KOTEPONG, S.; SUZUKI, A.; HIGASHI, S.; ABE, M. A novel symbiotic nitrogen-fixing member of the *Ochrobactrum clade* isolated from root nodules of *Acacia mangium*. **The Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 50, n. 1, p. 17-27, Feb. 2004.

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 feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp)**. 2006. 188 p. Tese (Doutorado em Microbiologia do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Minireview: principles and applications of methods for DNA based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 6, p. 1661-1669, June 1999.

PADULOSI, S.; NG, N. Q. Origin taxonomy, and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: SINGH, B .B.; MOHAN, R.; DASHIELL, K. E; JACKAI, L. E. N. (Ed.). **Advances in Cowpea Research**. Tsukuba: IITA JIRCAS, 1997. p. 1-12.

PEREIRA, C. A.; VIEIRA, I. C. G. A importância das florestas secundárias e os impactos de sua substituição por plantios mecanizados de grãos na Amazônia. **Interciência**, Caracas, v. 26, n. 8, p. 337-341, ago. 2001.

PEREIRA, J. P. R.; FERREIRA, P. A. A.; VALE, H. M. M.; MOREIRA, F. M. S.; ANDRADE, M. J. B. Nodulação e produtividade de *Vigna unguiculata* cv Poços de Caldas por estirpes selecionadas de rizóbio em Iguatama, MG. In: CICESAL 17., 2004. **Anais...** Lavras: UFLA, 2004. CD-ROOM.

PEREIRA, J. P. R.; PEREIRA, G.; EUGENE, E.; PEREIRA, B.; KUMAR, N.; PEREIRA, I.; MORAIS, C.; SILVEIRA, A. **Cultura do feijão-caupi, *Vigna unguiculata* (L.) Walp; descrição e recomendações técnicas de cultivo.** Goiânia: EMBRAPA-CNPAP, 1984. (Circular Técnica, 18).

PUEPPKE, S. G.; RUIZ-SAINZ J.; BROUGHTON, W. I.; MARTINEZ, E. Host range analysis of rhizobia that nodulate *Glycine max* and *Phaseolus vulgaris*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON DIVERSITY AND TAXONOMY OF RHIZOBIA, 1994, Wuhan. **Anais...** Wuhan: China Agricultural, 1994. p. 9.

RADEMAKER, J. L. W.; BRUJIN F. D. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis. In: CAETANO-ANOLLÉS G.; GRESSHOFF P.M. (Ed.). **DNA markers: protocols, application and overviews**. New York: J. Wiley, 1997.

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

ROHLF, F. J. **NTSYSpc: numerical taxonomy and multivariate analyses system**, version 2.0. New York: Exeter, 1997. CD-ROM.

RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P. A. Fixação biológica de nitrogênio, In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**, Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p. 280-335.

SANTOS, D.; VICENTINI, R. **Fijación biológica em soja: Experiencias com isolneas com y sin capacidad de nodular**. Argentina: Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária, 2003.

SANTOS, M. A.; VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Characterization of soybean bradyrhizobia strains adapted to the Brazilian cerrados region. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 30, p. 261-272, 1999.

SAS INSTITUTE. **Learning edition 2.0**. Cary, 2004. p. 86.

SELENSKA-POBELL, S.; GIGOVA, L.; PETROVA, N. Strain-specific fingerprints of *Rhizobium galegae* generated by PCR with arbitrary and repetitive primers. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 79, n. 4, p. 425-431, Oct. 1995.

SHEN, B. F.; ZHU, H. R.; LI, J. Response of rice to inoculation with genetic engineered strains of associative diazotrophics. **Chinese Rice Research Newsletter**, Beijing, v. 4, p. 4-5, 1996.

SIKORA, S.; DEDZEPOVIC, S.; BRADIC, M. Genomic fingerprinting of *Bradyrhizoiium japonicum* isolates by RAPD and rep-PCR. **Research in Microbiology**, Paris, v, 157, n. 3, p. 213-219, Apr. 2002.

SILVEIRA, E. B.; GOMES, A. M. A.; MARIANO, R. L. R.; NETO, E. B. S. Bacterização de sementes e desenvolvimento de mudas de pepino. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n. 2, p.217-221, abr./jun. 2004.

SILVEIRA, P. M.; BRAZ, A. J. B. P.; DIDONET, A. D. Uso de clorofilômetro como indicador da necessidade de adubação nitrogenada em cobertura no feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 9, p. 1083-1087, set. 2003.

SIQUEIRA, J. O.; FRANCO, A. A. **Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas**. Brasília: Ministério de Educação, Escola Superior de Agricultura de Lavras, Fundação de Apoio ao Ensino Pesquisa e Extensão e Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior, 1988.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-512, Sept. 1974.

SMITH, N. J. H.; FALESI, I. C.; ALVIN, P. T. Agroforestry trajectories among smallholders in the Brazilian Amazon: innovation and resiliency in pioneer and older settled areas. **Ecological Economics**, Amsterdam, v. 18, n. 1, p. 15-27, July 1996.

SOARES, A. L. L.; PEREIRA, J. P. A. R.; FERREIRA, P. A. A. F.; VALE, H. M. M. do; LIMA, A. S.; ANDRADE, M. J. B.; MOREIRA, F. M. S. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG): (I) Caupi. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 30, n. 5, p. 795-802, set./out. 2006.

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

TATUM, H. W.; EWING, W. H.; WEAVER, R. E. Miscellaneous gram-negative bacteria. LENNETTE, E. H.; SPAULDING, E. H.; TRUANT, J. P. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 2. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1974. p. 270-294.

TEIXEIRA, M. A.; MELO, I. S. de; VIEIRA, R. F. **Ocorrência de bactérias diazotróficas endofíticas na mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2005. 20 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 34).

TRUJILLO, M. E.; WILLENS, A.; ABRIL, A.; PLNCHUELO, A.; RIVAS, R.; LUDEÑA, D.; MATEOS, P. F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E. Nodulation of *Lupinus albus* by Strains of *Ochrobactrum lupine*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 3, p. 1318-1327, Mar. 2005.

VALVERDE, A.; VELÁZQUEZ, E.; FERNÁNDEZ-SANTOS, F.; VIZCAÍNO, N.; RIVAS, R.; MATEOS, P. F. *Phylobacterium trifolii* sp.nov. nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. **Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 55, n. 5, p. 1985-1989, Sept. 2005.

VARGAS, M. A. T.; SUHET, A. R. Adubação nitrogenada, inoculação e épocas de calagem para a soja em solos do Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 8, p. 1127-1132, ago. 1982.

VARVEL, G. E.; SCHEPERS, J. S.; FRANCIS, D. D. Ability for In-Season Correction of Nitrogen Deficiency in Corn Using Chlorophyll Meters. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 61, n. 4, p. 1233-1239, July/Aug. 1997.

VERDCOURT, B. Studies in the *Leguminosae-Papilionoidea* for the flora of tropical East Africa. IV. **Kew Bulletin**, London, v.24, p.597-569, 1970.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, New York, v. 5, n. 1, p. 25-40, 1994.

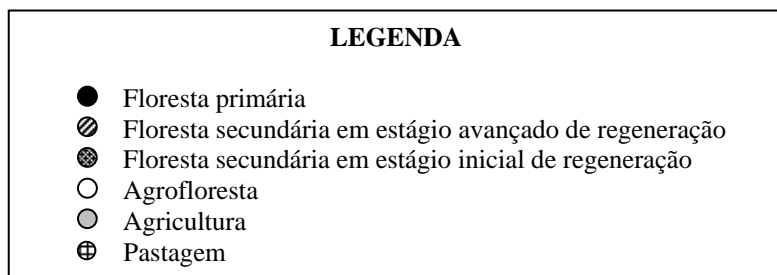
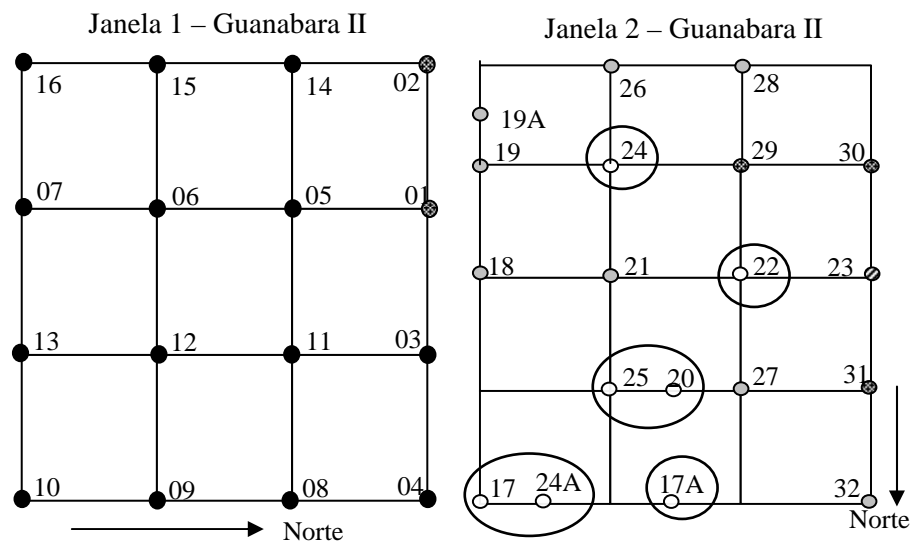
VINUESA, P.; RADEMAKER, J. L. W.; de BRUIJN, F. J.; WERNER, D. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strain nodulation endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-RFLP of genes encoding 16S rRNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer, REP-PCR genomic fingerprinting and partial 16S rDNA sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 6, p. 2096-2104, June 1998.

WATT, E. E.; ARAUJO, J. P. P. **Cowpea Research in Brazil**. Brasília: International Institute of Tropical Agriculture / Embrapa, 1988.

ZILLI, J. E.; VALICHESKI, R. R.; RUMJANEK, N. G.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; FREIRE FILHO, F. R.; NEVES, M. C. P. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solo do cerrado em caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 5, p. 811-818, maio 2006.

ANEXO

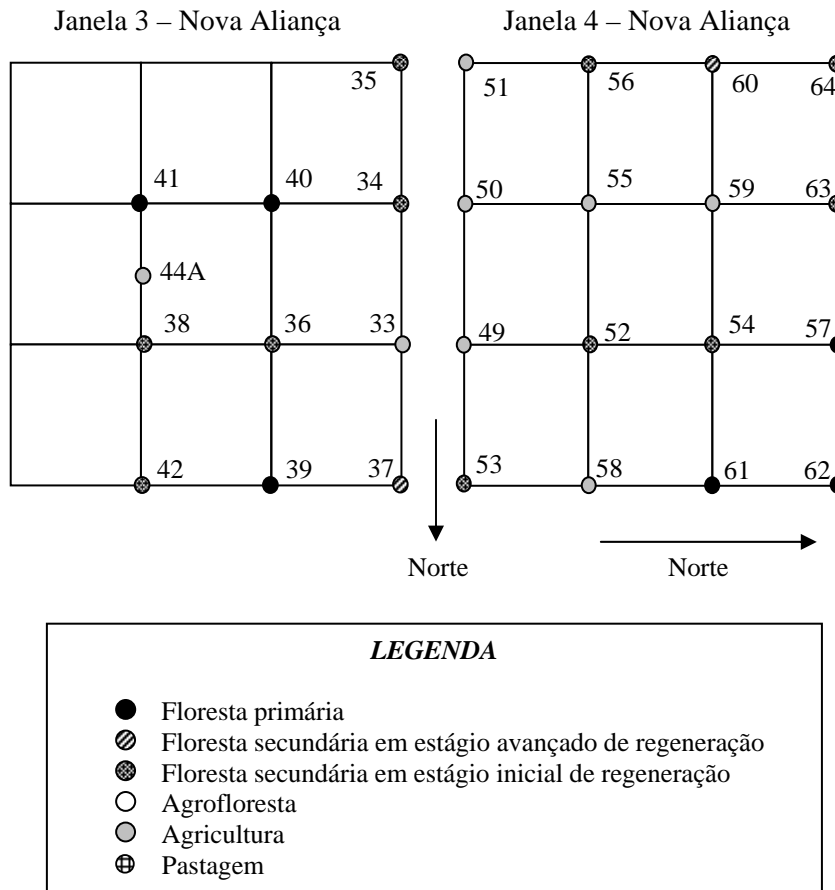
FIGURA 1A Croqui de campo das áreas amostradas, janelas 1e 2.



*Os pontos de amostragem de solo estão equidistantes entre si 100m, na maioria dos casos. No entanto, para uma melhor amostragem das áreas, essa distância foi alterada sempre que considerado conveniente.

**Pontos circulados correspondem ao local de coleta das amostras de solos de onde foram isoladas as estirpes em estudo.

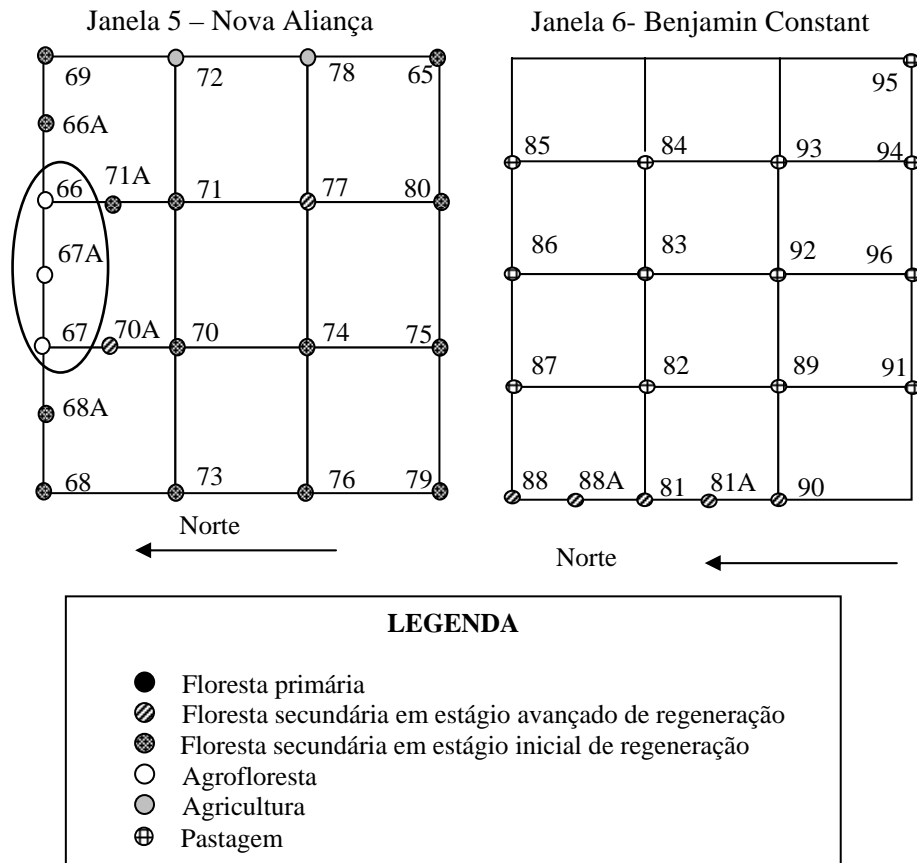
FIGURA 2A Croqui de campo das áreas amostradas, janelas 3 e 4



*Os pontos amostrados estão equidistantes entre si 100m, na maioria dos casos. No entanto, para uma melhor amostragem das áreas, essa distância foi alterada sempre que considerado conveniente.

**Pontos circulados correspondem ao local de coleta das amostras de solos de onde foram isoladas as estirpes em estudo.

FIGURA 3A Croqui de campo das áreas amostradas, janelas 5 e 6



*Os pontos de amostragem de solo estão equidistantes entre si 100m, na maioria dos casos. No entanto, para uma melhor amostragem das áreas, essa distância foi alterada sempre que considerado conveniente.

**Pontos circulos correspondem ao local de coleta das amostras de solos de onde foram isoladas as estirpes em estudo.

TABELA 1A Quadro de ANOVA, avaliando a variável NN (Sem transformação)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	96	1694,342784	17,649404	8,782	0,0000
Erro	191	383,878663	2,009836		
Total	198	2078,221447			

CV= 45,26%

TABELA 2A Quadro de ANOVA, avaliando a variável Índice SPAD (Com transformação: Log x)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	96	1694,342784	17,649404	8,782	0,0000
Erro	191	383,878663	2,009836		
Total	287	2078,221447			

CV= 46,25%

TABELA 3A Quadro de ANOVA, avaliando a variável MFPA (Sem transformação)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	96	165,515464	1,724119	4,794	0,0000
Erro	191	68,690086	0,359634		
Total	198	234,205552			

CV= 26,60%

TABELA 4A Quadro de ANOVA, avaliando a variável MSN (Sem transformação)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	96	180808,979381	1883,426869	18,650	0,0000
Erro	191	68193,141671	357,032155		
Total	287	249002,121			

CV= 48,63%

TABELA 5A Quadro de ANOVA, avaliando a variável MSPA (Sem transformação)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	96	2647462,697595	27577,736433	3,072	0,0000
Erro	191	1714422,801296	8976,035609		
Total	287	4361885,498			

CV= 31,95%

TABELA 6A Quadro de ANOVA, avaliando a variável ER% (Sem transformação)

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	96	53794,667526	560,361120	3,654	0,0000
Erro	191	29293,051772	153,366763		
Total	287	83087,71929			

CV= 30,42%