

**EFICIÊNCIA E DIVERSIDADE DE
BACTÉRIAS SIMBIÓTICAS FIXADORAS DE
NITROGÊNIO ISOLADAS DE SOLOS SOB
FLORESTA SECUNDÁRIA E PASTAGEM NA
AMAZÔNIA OCIDENTAL**

AMANDA APARECIDA DE OLIVEIRA NEVES

2007

AMANDA APARECIDA DE OLIVEIRA NEVES

**EFICIÊNCIA E DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS SIMBIÓTICAS
FIXADORAS DE NITROGÊNIO ISOLADAS DE SOLOS SOB
FLORESTA SECUNDÁRIA E PASTAGEM NA AMAZÔNIA
OCIDENTAL**

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

Orientadora
Profa. Dra. Fátima Maria de Souza Moreira

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2007

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

Neves, Amanda Aparecida de Oliveira.

Eficiência e diversidade de bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio isoladas de solos sob floresta secundária e pastagem na Amazônia Ocidental.

/ Amanda Aparecida de Oliveira Neves. -- Lavras : UFLA, 2007.
92 p. : il.

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

1. Fixação biológica de nitrogênio. 2. Caupi. 3. Eficiência simbiótica. 4. Sistema de Uso da Terra – SUT. 5. Biodiversidade. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD- 589.90133

AMANDA APARECIDA DE OLIVEIRA NEVES

**EFICIÊNCIA E DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS SIMBIÓTICAS
FIXADORAS DE NITROGÊNIO ISOLADAS DE SOLOS SOB
FLORESTA SECUNDÁRIA E PASTAGEM NA AMAZÔNIA
OCIDENTAL**

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

APROVADA em 26 de fevereiro de 2007.

Prof. Dr. Romildo da Silva

UFLA

Pesq. Dr. Ivanildo Evódio Marriel

Embrapa Milho e Sorgo

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

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

Aos meus pais, **Armando e Shirley**, e aos meus irmãos, **Júnia e Philip**, por serem meu refúgio, meu alicerce, meu porto seguro.

Ofereço

A **Deus**, força maior que me permitiu sempre seguir em frente.

A **Ricardo Fernandes Teixeira** por toda espera, carinho, respeito, cumplicidade, amor e paciência.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me permitir seguir em frente, mostrando o caminho e me direcionando para o que fosse melhor. E por sempre sentir sua presença em minha vida.

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

A Fapemig, pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Fátima Maria de Souza Moreira pela orientação, apoio, amizade e confiança durante o Mestrado.

Aos professores do Departamento de Ciência do Solo.

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

Aos membros da banca examinadora, Pesq. Dr. Ivanildo Evódio Marriel, Prof. Romildo da Silva e Profa. Fátima Maria de Souza Moreira.

Aos funcionários Marlene Aparecida de Souza e Manuel Aparecido da Silva pela amizade, carinho, disponibilidade, paciência e enorme ajuda na execução deste trabalho.

Ao Dr. Ivanildo Evódio Marriel pela orientação anterior, pela iniciação em microbiologia do solo, pelo direcionamento, apoio, amizade, oportunidades, confiança e consideração.

Aos amigos da EMBRAPA Milho e Sorgo, Dr. Fernando Tavares, Dr. Nicésio, Osni, Vieira, Branco, Sr. Ademar, Ruy, Luciane (Lú) e Yhara, que sempre estiveram presentes durante este tempo, com carinho, apoio e grande amizade.

A todos os amigos e professores do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade de Alfenas pelo carinho, apoio e amizade.

A Rafaela (Rafa) e ao Prof. Júlio pela acolhida, orientações, carinho, amizade e pela herança deste trabalho.

A Rogério e Lílian pelas oportunidades, confiança e amizade.

A Fernanda e Lúcio pelo companheirismo, amizade e companhia.

A Alice, assistente extraordinária, por toda ajuda dedicação, compreensão e amizade. A Ana Paula e aos mascotes, Pablo e Larissa, pela ajuda.

A Patrícia e Renata, companheiras de república, por toda amizade, carinho e cumplicidade.

Aos amigos adquiridos durante o curso, Taís, Michele Rocha, Michele Aparecida, Ligiane, Plínio, José Geraldo e Valéria, Silvana, Adriana, Alexandre, Éderson, Fabrício, Kátia, Ivoney, Cláudio, Márcia, Pedro, Mário, Sandro, Maíra, Ayodelle, Eliane, Flávio, Bruno Dias, Évio, Euzelina, Ênio, Tácio, Janaína, Anderson, Luciene, Quintiliano, Natascha e Lucélia.

Aos amigos de todas as horas, Krisle (irmã de coração), André (primo japonês preferido), Meire, Gláucia, Cândido, Paulo e Jussara, pela amizade, carinho, cumplicidade, paciência e companheirismo sempre.

Aos meus afilhados, Vinícius, Sávio e Núbya, que entenderam minha ausência, apesar da pouca idade.

Aos meus amigos Alexandre (Gordinho), Mislaine (Mis), Alexandra (Alê) e Alisson (Rosinha) por todo o carinho nesses anos de amizade.

A toda a minha família, avô, tios e primos por serem minha base.

A Ricardo pelo carinho, respeito, amor.....

Aos meus pais e meus irmãos por serem meu chão, meu alicerce, e por serem responsáveis por tudo que sou.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Importância do estudo sobre diversidade de bactérias que nodulam leguminosas.....	3
2.2 Floresta Amazônica.....	7
2.3 Sistemas de uso da terra (SUT).....	9
2.4 Caupi (<i>Vigna unguiculata</i>).....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Coleta das amostras.....	14
3.2 Estirpes.....	18
3.3 Análise de eficiência simbiótica e autenticação dos isolados por meio de inoculação no hospedeiro original.....	19
3.4 Análise visual de sintomas de deficiência de nitrogênio.....	21
3.5 Análise de proteínas totais por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	22
3.6 Índices de diversidade.....	23
3.7 Caracterização cultural X Caracterização por proteínas totais (SDS-PAGE).....	23
3.8 Amplificação e sequenciamento parcial do gene 16S do DNA ribossomal.....	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1 Autenticação dos isolados por meio de inoculação no hospedeiro original e Eficiência Simbiótica	25

4.1.1 SUT floresta secundária (em estágio avançado de regeneração).....	25
4.1.2 SUT pastagem.....	31
4.1.3 Comparação entre SUT floresta secundária (em estágio avançado de regeneração) e pastagem.....	38
4.2. Análise visual de sintomas de deficiência de nitrogênio.....	40
4.3 Análise de proteínas totais por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	41
4.3.1 SUT floresta secundária (em estágio avançado de regeneração).....	41
4.3.2 SUT pastagem.....	42
4.3.3 SUT floresta secundária (em estágio avançado de regeneração) X SUT pastagem.....	43
4.4 Índices de diversidade.....	53
4.5 Caracterização cultural X Caracterização por proteínas totais (SDS-PAGE).....	57
4.6 Amplificação e sequenciamento parcial do gene 16S do DNA ribossomal.....	58
5 CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
ANEXOS.....	77

RESUMO

Neves, Amanda Aparecida de Oliveira. **Eficiência e diversidade de bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio isoladas de solos sob floresta secundária e pastagem na Amazônia Ocidental**. 2007. 92p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG¹.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência simbiótica e a diversidade fenotípica e genética de bactérias que nodulam leguminosas obtidas através da planta isca caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp], de solos sob floresta secundária em estágio avançado de regeneração e pastagem na Amazônia Ocidental. As estirpes de bactérias fixadoras de N₂ utilizadas no presente trabalho foram isoladas de nódulos obtidos através da inoculação de suspensões de solos (10⁻¹), oriundos de dois sistemas de uso da terra, sendo obtidas 122 estirpes oriundas de solos sob floresta secundária e 159 estirpes de solos sob pastagem. A autenticação e a eficiência simbiótica foram verificadas no mesmo experimento. A autenticação teve como objetivo verificar a capacidade nodulífera no hospedeiro original, caupi. Para análise de autenticação e eficiência simbiótica foram realizados três experimentos com caupi cultivar BR-17 Gurgueia, de fevereiro a agosto de 2005, utilizando-se delineamento inteiramente casualizado. A análise estatística foi realizada por meio do teste de Scott-Knott, utilizando o programa Sisvar. Como controles foram utilizadas as estirpes recomendadas para o caupi INPA 03-11B e Ufla 03-84 e plantas sem inóculos com nitrogênio e sem nitrogênio. Foram avaliados massa seca da parte aérea (MSPA), número (NN) e massa seca de nódulos (MSN), e eficiência relativa expressa pela fórmula $Efr = (MSPA_{inoculada} / MSPA_{com\ nitrogênio}) \times 100$. Durante o experimento, 10, 20 e 30 dias após plantio, foram avaliados os sintomas de deficiência de nitrogênio, por meio do critério visual. A diversidade fenotípica dos isolados foi avaliada por meio de análise de proteínas totais SDS-PAGE. Os índices de diversidade de Shannon e o índice Chao1 foram usados para estimativas de riqueza. Também se realizou uma análise de rarefação com base nas características fenotípicas (proteína total) de modo a permitir a comparação entre as duas áreas. Os dois sistemas de uso da terra apresentaram isolados eficientes, sendo que os isolados 88AB3, 90C1, 90A4, 90A8, 88AB10a, 88AB6, 88A10 e 88AC2 do SUT floresta secundária e 83C3 da pastagem foram equivalentes à estirpe recomendada, ou à adubada com N mineral. O aparecimento de clorose nas plantas só foi detectado após 20 dias de plantio, caracterizando estes isolados como ineficientes. O perfil protéico dos isolados revelou uma grande diversidade. Na floresta secundária em estágio avançado de regeneração foram formados quatro grupos a 100% de similaridade e na pastagem, cinco. A partir dos grupos formados a 100% de similaridade, os

próximos grupos foram formados a 92% (94 grupos) e 90% (62 grupos) de similaridade nos SUT floresta secundária e pastagem, respectivamente, e os últimos, a 8% (1 grupo) e 9% (3 grupos) de similaridade em floresta secundária em estágio avançado de regeneração e pastagem, respectivamente. A diversidade de bactérias que nodulam caupi, mostrada pelos dendogramas de similaridade nos dois SUT analisados, foi comprovada pelo índice de diversidade de Shanon, visto que o número de isolados obtidos em cada uma delas (tamanho da amostra) foi diferente. Os resultados indicam que a diversidade e a riqueza são similares para as duas áreas estudadas. As curvas de rarefação com o índice de Shannon quase atingiram o platô (assíntota). As curvas de acumulação de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) também não atingiram a assíntota. O número de Singletons foi maior na floresta secundária em estágio avançado de regeneração e menor na pastagem. A floresta secundária em estágio avançado de regeneração também obteve a maior quantidade de Uniques. A diversidade obtida por caracterização cultural foi similar à obtida por perfis de proteína.

¹ Orientadora: Fátima Maria de Souza Moreira – UFLA

ABSTRACT

Neves, Amanda Aparecida de Oliveira. **Efficiency and diversity of nodulating bacteria isolated of soils under old secondary forest and pasture in the Western Amazon**. 2007. 92p. Dissertation (Master degree in Soil Science and Plant Nutrition). Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

The aim of this work was to evaluate the symbiotic efficiency and phenotypic and genotypic diversities of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] nodulating bacteria isolated from soils old secondary forest and pasture in the Western Amazon. The bacterial strains used in our work were isolated from cowpea nodules obtained after the inoculation of plants with soil suspensions (10^{-1}) from two land use systems (LUS): old secondary forest and pasture, being 122 and 159 isolates from old secondary forest and pasture soils, respectively. Authentication and symbiotic efficiency were evaluated in the same experiment. The authentication aimed to verify the isolates capacity of inducing nodule formation in cowpea. Three completely randomized design experiments were carried out with the cowpea cultivar BR-17, from February to August 2005. The analysis of variance and the Scott-Knott test were performed by the program Sisvar. The strains INPA 03-11B and Ufla 03-84 and controls with and without mineral nitrogen were included for comparison. The shoot dry matter weight (SDMW) and the number (NN) and dry matter weight of nodules (DMWN) were evaluated, and the relative efficiency was calculated with the following formula: Relative efficiency = (SDMW inoculated / SDMW with nitrogen) x 100. Symptoms of deficiency were evaluated 10, 20 and 3 days after sowing by the visual criterion. The phenotypic diversity was evaluated by total protein profiling – SDS-PAGE. The Shannon and Chao1 indexes were used to estimate diversity and richness, respectively. A rarefaction analysis was also performed in order to allow the comparison between the two LUS. Efficient isolates were found in the two LUS. The isolates 88AB3, 90C1, 90A4, 90A8, 88AB10a, 88AB6, 88A10 e 88AC2 (old secondary forest) and 83C3 (pasture) presented a performance similar to the recommended inoculant strain or the control with N. Chlorosis symptoms appeared 20 days after sowing in plants inoculated with inefficient isolates. A high diversity was revealed by the total protein profiles. Four and five groups with 100% of similarity were formed in the old secondary forest and in the pasture, respectively. Other groups were formed at the level of 92% (94 groups) and 90% (62 groups) of similarity in the old secondary forest and in the pasture, respectively, and the last groups formed, respectively, at 8% (1 groups) and 9% (3 groups) of similarity in the old secondary forest and in the pasture. The diversity shown by the dendrograms was confirmed by the Shannon index, since the number of isolates (sample size) was different between LUS.

The results indicate that the diversity and richness are similar for the two LUS. The rarefaction curves and the accumulation curve of operational taxonomic units almost the asymptote. More singletons and uniques were found in the old secondary forest soils than in the pasture soils. The cultural- based and the total protein profile- based diversities were similar.

¹Adviser: Fátima Maria de Souza Moreira – UFLA.

1 INTRODUÇÃO

O aumento significativo da interferência antrópica em ecossistemas resulta na perda de diversidade acima do solo, o que pode alterar a diversidade abaixo dele, afetando de maneira prejudicial processos biológicos importantes para o bom funcionamento deste ambiente.

A atividade antrópica e seus impactos sobre as demais espécies que habitam o nosso planeta têm causado grande preocupação ao homem, uma vez que podem ocasionar, em sua maioria, a redução na diversidade e funções de organismos do solo, importantes para o bom funcionamento do ecossistema, pela realização de processos vitais à produtividade e sustentabilidade do ecossistema, tendo como consequência a diminuição da sua capacidade de resistir e de se recuperar de perturbações (Swift & Anderson, 1994). A camada superficial do solo representa o principal reservatório de microrganismos e, portanto, qualquer fator que exerça impacto sobre esta parte do perfil do solo exercerá grande influência na ecologia e nas funções dos microrganismos. Porém, graças a sua diversidade e dinâmica, os microrganismos estão continuamente mudando e, assim, se adaptam às alterações ambientais. Por isso, os microrganismos são considerados ótimos e sensíveis bioindicadores às mudanças que ocorrem no solo, advindas de modificações em seu manejo (Kennedy & Papendick, 1995) e do tipo de cobertura vegetal (Prasad et al., 1994). Desse modo, um fator a exercer grande influência nos microrganismos e seus processos são os diferentes sistemas de uso da terra (Pankhurt et al., 1995; Melloni et al., 2003), o que justifica o estudo do impacto causado por este tipo de alteração em áreas de intensa cobertura vegetal como a Amazônia.

A Amazônia constitui numa das poucas regiões do planeta ainda pouco exploradas pela atividade agrícola. Nesta região, os microrganismos e seus processos são ainda muito pouco conhecidos, embora os estudos já realizados

demonstrem a ocorrência de microrganismos benéficos que se associam às plantas, tanto em área de várzeas quanto de terra firme (Oliveira et al, 1996), sendo estes de grande importância para a sustentabilidade do ecossistema (Moreira & Siqueira, 2006). A bacia amazônica possui cerca de sete milhões de quilômetros quadrados, é constituída por uma floresta exuberante, com grande diversidade de espécies vegetais, e pode contribuir para maior diversidade também de microrganismos.

O feijão caupi é uma cultura de destaque na economia do norte e nordeste do Brasil, representando cerca de 70% do feijão produzido (Vieira, 1989), e constitui o principal alimento protéico e energético do homem rural. É também consumido em outros países, como a África, uma vez que possui alta rusticidade e se adapta às condições adversas do ambiente e a solos de baixa fertilidade.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência simbiótica e a diversidade fenotípica e genética de bactérias diazotróficas obtidas através da planta isca *Vigna unguiculata* (L.) Walp cultivar BR-17 Gurgueia, isoladas de solos sob floresta secundária (em estágio avançado de regeneração ou capoeira velha) e pastagem na Amazônia Ocidental.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Importância do estudo sobre diversidade de bactérias que nodulam leguminosas

Os microrganismos que realizam o processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) atmosférico, também conhecidos como microrganismos diazotróficos, podem viver em simbioses com plantas hospedeiras, livremente no solo ou em associações (Moreira & Siqueira, 2006). Estes microrganismos, através da enzima nitrogenase, conseguem reduzir N_2 para a forma inorgânica combinada NH_3 , podendo, então, ser aproveitados pelas plantas e/ou microrganismos ou lixiviado no ambiente.

O solo é um ambiente dinâmico que abriga processos importantes mediados por microrganismos, tais como ciclagem de nutrientes, ocorrência de doenças do sistema radicular, controle biológico de patógenos e pragas e absorção de nutrientes via simbiose, entre outros (Carter, 2002; Bending et al, 2004).

As espécies da comunidade microbiana do solo respondem de modo distinto a eventos como adição de matéria orgânica, revolvimento, cobertura do solo com palhada, compactação e aplicação de insumos, que estressam ou estimulam os microrganismos. Sendo assim, a capacidade produtiva de um solo não depende unicamente de suas características físico-químicas, mas também da interação entre diversos fatores no sistema solo-planta-microbiota.

A exploração dos recursos naturais pelo homem de forma desordenada tem interferido de maneira negativa no equilíbrio dos ecossistemas, constituindo uma das principais causas de degradação do solo e do ambiente. A degradação do solo torna-se evidente pela redução da capacidade produtiva das terras agrícolas, provocadas pelas perdas de matéria orgânica e pelos efeitos do impacto direto das chuvas sobre áreas sem a proteção adequada da cobertura

vegetal. O conhecimento das práticas corretas de manejo do solo é imprescindível para a garantia da preservação ou mesmo da melhoria de suas características em sistemas sustentáveis, o que se torna um dos desafios para a agricultura atual. O aumento demasiado das atividades antrópicas tem acelerado a destruição dos ecossistemas, com posterior perda da biodiversidade no planeta, implicando não apenas na interrupção da integridade dos ciclos biológicos, como também colocando em risco a própria sobrevivência humana.

Os microrganismos estão diretamente envolvidos nos ciclos dos nutrientes no solo e a quantificação de grupos importantes dá indicação de como os processos estão ocorrendo.

Tem sido considerado um fator importante na sustentabilidade de ecossistemas a diversidade microbiana do solo. Tal diversidade pode ser definida como a variabilidade entre organismos vivos e geralmente é atribuída à diversidade de espécies; no entanto, pode ser medida em vários níveis taxonômicos (família, gênero, intraespécies, etc.) ou, ainda, em termos de determinadas características genéticas ou fenotípicas (morfológicas, bioquímicas, fisiológicas, simbióticas) (Moreira & Siqueira, 2006). O conhecimento sobre diversidade de bactérias diazotróficas que nodulam leguminosas é ainda limitado devido à falta de conhecimentos sobre os microsimbiontes da grande maioria das espécies leguminosas, principalmente nos trópicos. Entretanto, nas últimas décadas, estudos revelaram uma grande diversidade de rizóbio de espécies florestais até então desconhecidas (Moreira et al., 1993; Dupuy et al., 1994; Willems, et al., 2000). Jesus (2004), Lima et al. (2005) e Nóbrega (2006) relatam grande diversidade de bactérias diazotróficas na região do alto Solimões, na Amazônia Ocidental.

Embora sejam de grande importância na manutenção da biosfera, estima-se que menos de 1% dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos.

A caracterização de uma bactéria envolve a descrição de muitas propriedades relativas a morfologia, cultivo, nutrição, bioquímica, metabolismo, ácidos nucléicos, patogenicidade e ecologia, as quais são pré-requisitos para a identificação e base da sistemática desse grupo de organismos. Graças aos avanços da biotecnologia moderna e agricultura houve descobertas significativas na área de biologia molecular de microrganismos. Por meio do emprego de técnicas moleculares está sendo desvendada uma enorme gama da diversidade microbiana existente, sendo possível, ainda, correlacioná-la com o funcionamento de ecossistemas. Devido a estes avanços na área, a eletroforese de proteínas totais (SDS-PAGE) tem se mostrado com grande potencial para o estudo da diversidade de microrganismos, em geral (Kampfer et al., 1995) na caracterização de diferentes estirpes de bactérias fixadoras de N₂ (Dreyfus et al., 1988; Moreira et al., 1993; Dupuy et al., 1994; Lajudie et al., 1998; Pereira, 2000), pois permite a identificação de espécies bacterianas, produzindo informações sobre suas características e taxonomia. Esta técnica permite a distinção de grupos, apesar de não permitir identificar os microrganismos que não são similares a estirpes conhecidas e identificadas. O genoma microbiano é resultante de mais ou menos 2000 moléculas de proteína. E tem-se demonstrado haver correlação entre a análise de hibridação DNA-DNA e do perfil eletroforético de proteínas (Vandamme et al., 1990; Kampfer et al., 1995). É possível mensurar a identificação, e a conseqüente diversidade de microrganismos, por meio da amplificação de genes que codificam pequenas sub-unidades do rRNA (16S, 23S e 5S) diretamente do DNA extraído destes microrganismos. Os RNAs ribossomais são considerados cronômetros moleculares, pois são moléculas universais, com funções altamente específicas, estabilizadas ao longo da evolução e que não sofrem influência por mudanças no meio ambiente, sendo o gene 16S um dos mais utilizados para detectar as relações entre bactérias (Woese, 1991). O gene 16S pode ser amplificado pela

reação em cadeia da polimerase (PCR) e o produto da reação pode ser clonado para o sequenciamento ou sequenciado diretamente (Weisburg et al., 1991). Por isso, esta técnica pode ser empregada com facilidade em estudos de diversidade e para a identificação de espécies. As seqüências de bases de genes obtidas em todo o mundo são submetidas a banco de dados como o GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/), podendo, então, ser comparadas com seqüências já conhecidas. Até o dia 23/03/07, o GenBank continha 12090 seqüências de bases de genes de bactéria submetidas (www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/txstat.cgi).

Os microrganismos facilitam o desenvolvimento da estrutura edáfica e controlam a disponibilidade de nutrientes às plantas por meio da mediação dos ciclos biogeoquímicos dos elementos e do melhoramento de limitações químicas ou físicas (Tate & Klein, 1985). Os efeitos do uso do solo sobre a diversidade microbiana têm sido demonstrados sistematicamente para alguns grupos de microrganismos. Estes efeitos podem afetar a abundância e a composição de espécies no local e, conseqüentemente, a diversidade do solo. O resultado da perda desta diversidade é negativo, uma vez que um solo, ecologicamente balanceado, depende da ciclagem de nutrientes e do balanço entre matéria orgânica, organismos do solo e diversidade de plantas.

A diversidade das comunidades biológicas (Magurran, 1987) pode ser mensurada por meio da aplicação dos índices de diversidade; estes, por sua vez, têm sido aplicados para estudo de comunidades de microrganismos, resultando em vários trabalhos publicados com este enfoque. As medidas de diversidade podem ser divididas em três tipos: índices de riqueza de espécies, modelos de abundância de espécies e índices baseados na abundância proporcional de espécies. A determinação do número total de espécies de uma comunidade é extremamente útil, mas geralmente isto não é possível, principalmente para comunidades microbianas. Sendo assim, o número de espécies é estimado com base em amostras retiradas da comunidade estudada e realizado por meio de

índices ou estimadores de riqueza de espécies. O índice de Shannon é amplamente usado para cálculo dos índices de diversidade, conforme Ricklefs (1993). Este autor relata que quando se deseja padronizar medidas de diversidade para comparação, deve-se baseá-las em amostras comparáveis. Se estas amostras incluem um diferente número de indivíduos, a comparabilidade pode ser obtida com um procedimento estatístico denominado rarefação, no qual subamostras de igual tamanho de indivíduos são retiradas aleatoriamente do total. Este efeito produz relação entre o número de espécies e o tamanho da amostra. O índice de Chão I também se mostra eficiente para utilização em estudos com microrganismos (Hughes et al., 2001).

Têm sido usados novos índices que permitem trabalhar com a diversidade genética combinada com a abundância proporcional de espécies (Hill et al., 2003), permitindo trabalhar com dados obtidos através de técnicas moleculares e análises filogenéticas. Pode ser, também, calculado o número de Singletons (grupos com apenas um indivíduo) e Uniques (grupos que ocorrem em apenas uma amostra), conforme descrito por Colwell & Coddington (1994).

Desta maneira, os organismos são componentes e não meramente habitantes do solo, apresentando relações estreitas entre biodiversidade e atividade biológica, sendo estas essenciais para a manutenção e sua capacidade produtiva.

2.2 Floresta Amazônica

As florestas tropicais têm a maior megadiversidade do mundo, pois detêm pelo menos 50% de todas as espécies do planeta. Conseqüentemente, estes ecossistemas são fonte de recursos genéticos importantes, não só pelo aspecto ecológico, mas também por seu potencial econômico. Todavia, o conhecimento sobre florestas tropicais é ainda escasso, tanto pelas dificuldades logísticas que apresentam e, principalmente, por limitações econômicas dos

países onde se situam. A falta de recursos humanos com formação adequada apresenta-se com principal fator limitante para o estudo de todos os grupos de organismos deste ecossistema.

Brasil, Colômbia, México e Indonésia são os países mais ricos em biodiversidade global, sendo o Brasil representante da maior diversidade biológica do planeta, distribuída em vários ecossistemas, incluindo a floresta Amazônica, entre as mais importantes.

A Amazônia legal compreende 60% de todo território nacional, com aproximadamente 5,000,000Km². Está alocada entre as latitudes 5°N e 16°S e entre as longitudes 44°W e 74°W, envolvendo nove estados do Brasil, que são Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (Santos et al. 2006). O clima da região é tropical úmido ou superúmido (Af segundo a classificação de Köppen), sem estação seca, com temperatura média anual de 25,7°C e precipitação média anual de 2.562 mm. Sua ampla extensão resulta em grande diversidade, caracterizando diferentes sistemas de uso da terra. A preservação dos serviços ecológicos da floresta Amazônica deve ser prioridade dentro de estratégias de conservação e uso da biodiversidade da região. Dessa forma estarão sendo conservadas as funções básicas que mantêm a biosfera ativa e, conseqüentemente, as espécies de microorganismos existentes, conhecidas e desconhecidas.

Uma significativa parcela da região amazônica constitui uma das poucas regiões do planeta que ainda se encontra sem intervenção antrópica. Essa região possui uma imensa diversidade de espécies vegetais, sendo encontradas de 100 a 300 espécies diferentes de árvores, em um hectare de floresta Amazônica, dependendo do sítio e do diâmetro mínimo de caule amostrado (CIMA, 1991). Esta diversidade vegetal se traduz em uma grande diversidade animal, conforme Erwin (1997), devido ao grande número de nichos existentes. Embora ainda

muito pouco estudada, acredita-se que a diversidade microbiana dos solos da Amazônia seja elevada e, de certa forma, relacionada à alta diversidade vegetal.

Moreira et al. (1998), pesquisando a diversidade por meio do sequenciamento do gene 16S do DNA ribossomal de 44 isolados de leguminosas arbóreas de várias florestas do Brasil, encontraram 15 seqüências diferentes, sendo seis novas. Foram encontradas, entre as seis seqüências novas, três na região Amazônica, que representaram a descoberta de novas espécies.

Borneman & Triplett (1997) verificaram grande diversidade principalmente nos solos sob floresta, onde foram encontradas seqüências não conhecidas de microrganismos não cultiváveis e que não podem ser classificadas em nenhum filo de Bacteria. Tais trabalhos evidenciam a imensidão de microrganismos ainda desconhecidos, pois estes não são cultiváveis nos atuais meios de cultura desenvolvidos.

Entre as famílias botânicas existentes na Amazônia, a família Leguminosae é a mais rica em espécies e a quinta em densidade (Ducke, 1949; Black et al., 1995; Prance et al., 1976 citados por Moreira et al., 1992). Esta família apresenta a peculiaridade de sua maioria formar nódulos em simbiose com bactérias diazotróficas. A grande diversidade de espécies de leguminosas na região tropical, e especialmente na Amazônia, pode refletir em uma grande diversidade de bactérias diazotróficas que nodulam leguminosas. E os estudos sobre a nodulação de leguminosas nativas desta região, bem como de bactérias isoladas destas leguminosas, podem contribuir para o conhecimento desta diversidade. Assim, justifica-se o interesse da pesquisa em microbiologia do solo em áreas da região Amazônica.

2.3 Sistemas de uso da terra (SUT)

O sistema de uso da terra pode ter forte impacto sobre a população e a diversidade de organismos do solo. Este impacto pode diminuir a população de

organismos e, conseqüentemente, reduzir a resiliência de diversos processos que ocorrem no solo.

A transição de área natural, com muitas espécies de plantas e animais convivendo em equilíbrio ecológico dinâmico, para área agrícola, com reduzido número de espécies convivendo em desequilíbrio, pode resultar em uma diminuição da diversidade de bactérias do solo, podendo alterar a estrutura populacional de outros organismos situados ao longo da cadeia trófica. O sistema de uso do solo pode alterar a densidade e composição de microrganismos (Melloni et al, 2004).

A caracterização fenotípica e genotípica de bactérias diazotróficas é ferramenta útil para conhecimento da diversidade destes organismos e compreensão de como os sistemas de uso do solo podem afetar a população destes microrganismos.

2.4 Caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]

As leguminosas possuem o mecanismo simbiótico mais sofisticado e eficiente entre as associações de plantas com bactérias fixadoras de N₂ e as leguminosas de grão e forrageiras têm papel importante na agricultura tropical. A maioria das espécies de importância econômica é capaz de nodular e fixar N₂ atmosférico em condições mínimas de nitrogênio. A taxa de fixação varia com a espécie, mas é geralmente limitada pelas condições abióticas do solo, como acidez do solo, temperatura e umidade e metais pesados. As leguminosas assumem grande importância na agricultura, pois além da sua utilização pelos animais, podem servir de cobertura do solo e matéria orgânica para o solo, além da fixação de N₂ atmosférico.

O feijão caupi (*Vigna unguiculata*) é a mais importante leguminosa de grãos do semi-árido brasileiro (Teixeira et al., 1998, citados por Santos et al., 2000) e exerce função de suprir parte das necessidades protéicas das populações

mais carentes da região. Esta leguminosa ocupa 60% das áreas cultivadas com feijão (*Phaseolus vulgaris*) e caupi no nordeste do Brasil e representa 26,8% da área total plantada com feijão no Brasil, alcançando de 95% a 100% do total das áreas plantadas com feijão nos estados do Maranhão, Piauí, Ceará e Rio Grande do Norte (Oliveira e Carvalho, 1988). É uma excelente fonte de proteínas, que apresenta todos os aminoácidos essenciais, carboidratos, vitaminas e minerais, além de possuir grande quantidade de fibras dietéticas, ter baixa quantidade de gordura e não conter colesterol. Sua origem está ligada ao continente africano, sendo introduzida no Brasil no século XVII, pelos portugueses colonizadores e seus escravos africanos (nas regiões tropicais), onde encontrou características edafoclimáticas (distintas) adequadas ao seu desenvolvimento. Nunes (2006) relata, ainda, sua importância como fonte de proteínas também para os romanos.

Esta leguminosa possui vários nomes vulgares, podendo ser conhecido pelas regiões do Brasil como feijão de corda, feijão massacar, feijão de praia, feijão catador, feijão de estrada, feijão gerutuba e feijão fradinho.

O feijão Caupi é uma espécie também usada como planta isca na obtenção de rizóbio e apresenta alta rusticidade e adaptabilidade às condições de estiagem prolongadas e capacidade de se desenvolver em solo de baixa fertilidade (Oliveira & Carvalho, 1988). Além disso, seus resíduos podem contribuir com N e outros nutrientes quando incorporados ao solo ou quando fornecidos como alimento aos animais (Brito, 1992). Nodula com vários gêneros de rizóbio (Lewin et al., 1987), sendo, hoje, descritos um total de 12 gêneros e 54 espécies de BNL (Moreira e Siqueira, 2006). A eficiência em fixar nitrogênio das bactérias que estabelecem simbiose com leguminosas, assim como sua capacidade de sobreviver e formar nódulos no solo, dependem dos fatores genéticos inerentes aos simbioses e da interação com fatores edáficos e climáticos (Moreira & Siqueira, 2006). A grande diversidade vegetal, inclusive de leguminosas, encontrada nos sistemas de uso da terra (capoeira e pastagem)

da Amazônia, pode abrigar também uma grande variabilidade de rizóbios (Moreira et al., 1993; Pereira, 2000), adaptados a condições de baixos valores de pH e temperaturas elevadas (predominantes nos solos brasileiros), cujo potencial ainda é pouco conhecido.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho faz parte do projeto “*Conservation and Sustainable Management of Below-Ground Biodiversity*”, implementado pelo “*United Nations Programme (UNEP)*” e executado no Brasil, Costa do Marfim, Índia, Indonésia, Kênia, México e Uganda, sendo no Brasil coordenado pela Universidade Federal de Lavras. O projeto aborda vários aspectos da biota do solo, incluindo estudos sobre bactérias que nodulam e fixam nitrogênio. As áreas estudadas estão localizadas na Amazônia Ocidental, incluindo comunidades indígenas do município de Benjamin Constant, no estado do Amazonas. O local de estudo situa-se a aproximadamente 1100 km a oeste de Manaus, no município de Benjamin Constant, e está localizado na base do Rio Solimões (FIGURA 1). As comunidades indígenas estão organizadas em associações, praticando agricultura itinerária de pequena escala, agrofloresta e extrativismo vegetal; dessa forma, a intensidade de uso da terra é baixa. As comunidades existentes são formadas por representantes dos índios Ticuna e Cocamo.

Como se trata de um projeto de abordagem multidisciplinar, os procedimentos gerais de escolha dos sistemas de uso da terra (SUT) 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, sistema de amostragem, localização das janelas de estudo e os métodos utilizados foram padronizados pela equipe global do projeto. Do mesmo modo, a amostragem destinada aos estudos microbiológicos do solo também foi padronizada.

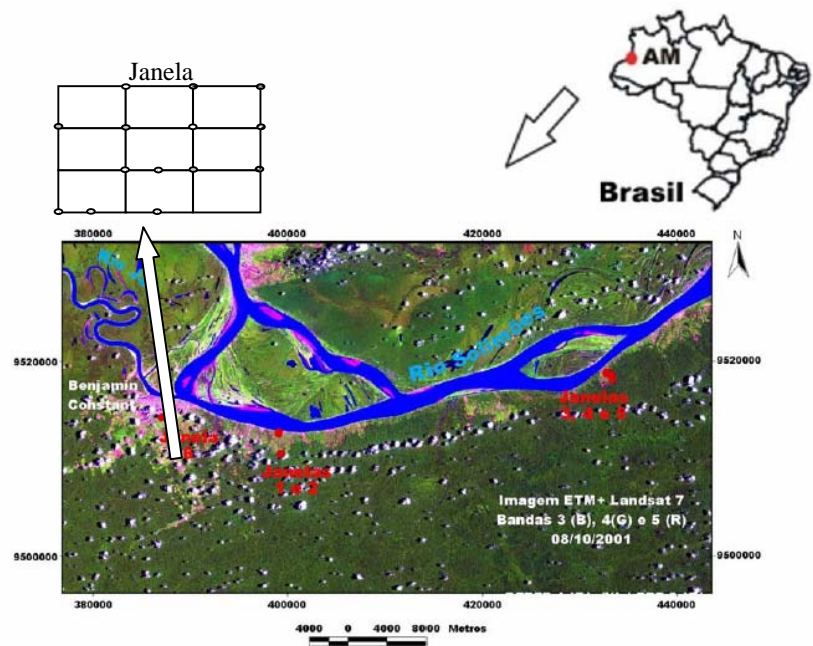


FIGURA 1 Local da realização das áreas de coleta (cidade de Benjamin Constant e comunidades indígenas Nova Aliança e Guanabara II, no município de Benjamin Constant) (Fidalgo et al., 2005).

3.1 Coleta das amostras

Foram estabelecidas seis janelas, Janela 1 - Guanabara II, Janela 2 - Guanabara II, Janela 3 - Nova Aliança, Janela 4 - Nova Aliança, Janela 5 - Nova Aliança e Janela 6 - Benjamin Constant, e 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) (www.biosbrasil.ufla.br). As amostras foram coletadas em março de 2004, por uma equipe específica, e cada amostra, representando o ponto georreferenciado, constituiu-se de 12 amostras simples: 4 coletadas num raio de 3 m e 8 coletadas num raio de 6 m do ponto principal à profundidade de 0-20 cm. No presente trabalho foram utilizadas as estirpes isoladas por Nóbrega (2006). A maior parte dos pontos amostrados utilizados neste trabalho (pontos em floresta secundária em estágio avançado de regeneração e pastagem) estão contidos na Janela 2 – Guanabara II e Janela 6 – Benjamin Constant. Os esquemas de coleta das amostras simples de solo estão exemplificados na figura 2. As localizações, identificações de culturas e os croquis de campo das Janelas estão exemplificados na figura 3.

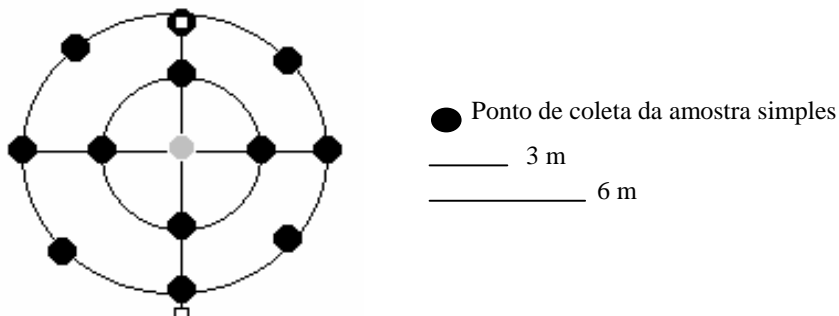


FIGURA 2 Esquema de coleta das amostras simples de solo em cada local. O ponto do centro do círculo (em cinza) foi georreferenciado. Os 12 pontos em negrito representam as amostras simples.

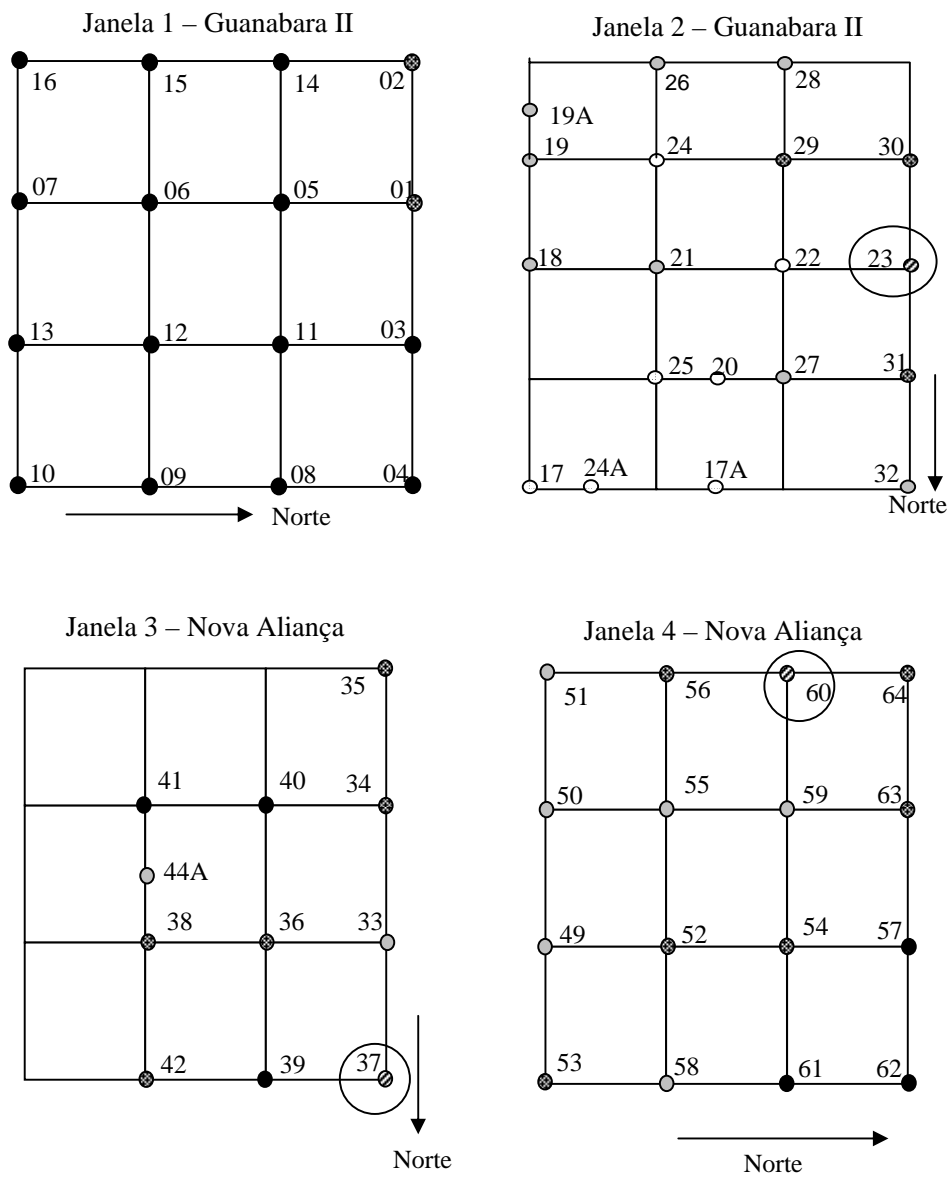
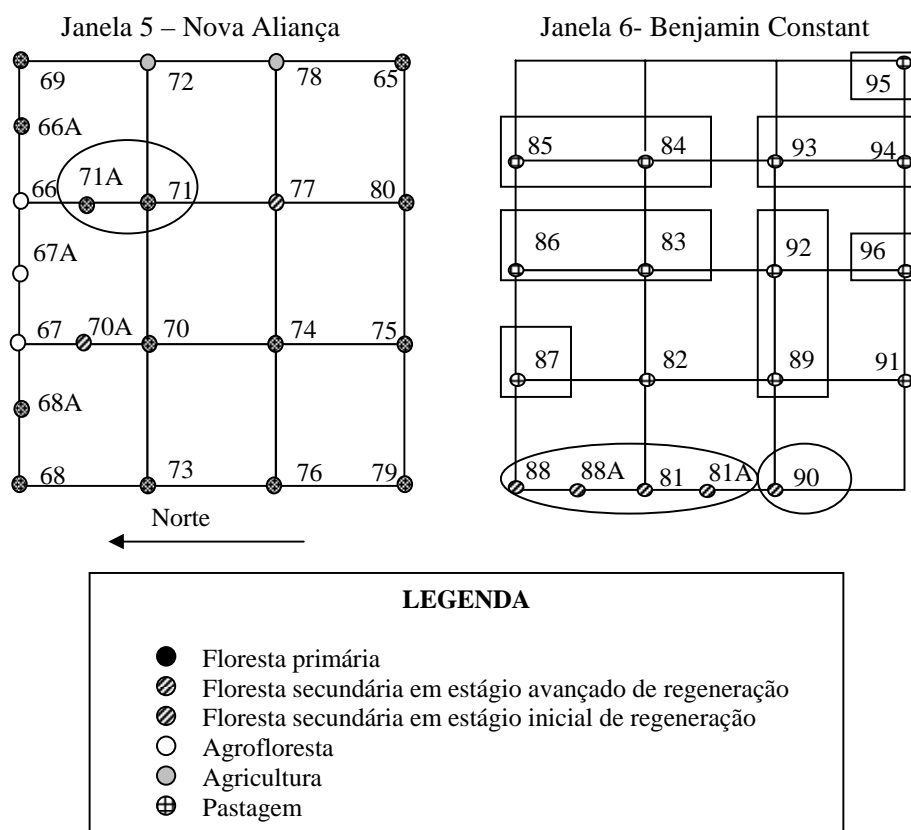


FIGURA 3 Localização, identificação das culturas e o croqui de campo de duas das áreas nas comunidades (janelas) (Continua...).



Os pontos destacados no croqui de campo das janelas (Figura 3) foram os pontos de origem dos estudos do presente trabalho. Os pontos destacados com a elipse são referente ao SUT floresta secundária (em estágio avançado de regeneração ou capoeira velha) e os destacados com o retângulo são referentes ao SUT pastagem.

FIGURA 3 Localização, identificação das culturas e o croqui de campo de duas das áreas nas comunidades (janelas).

Para a amostragem, a serrapilheira foi retirada e o instrumento de coleta (trado) foi lavado e flambado antes e após a coleta de diferentes amostras compostas, para evitar a contaminação entre amostras. Cerca de 300g de cada

amostra composta foram destinados à análise microbiológica e 200g, à análise das características físicas e químicas do solo (Nóbrega & Moreira, 2004). As amostras destinadas à análise microbiológica foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis Millipore, armazenadas em recipientes de isopor para sua conservação e levadas o mais rápido possível para o laboratório, onde foram conservadas a 4°C até o uso.

3.2 Estirpes

Foram testadas estirpes de bactérias fixadoras de N₂ no presente trabalho, isoladas de nódulos de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp], BR-17 Gurgueia, inoculadas com suspensões na diluição de 10⁻¹ de amostras de solo de dois SUT: floresta secundária (em estágio avançado de regeneração ou capoeira velha), 122 isolados e pastagem, 159 isolados (Nóbrega, 2006). As estirpes foram isoladas em meio 79 (Fred & Waksman, 1928) e mantidas sob refrigeração (a 4°C e a -80°C), sendo suas características culturais determinadas também por Nóbrega (2006). A identificação das estirpes é referente ao ponto amostrado, à repetição do vaso de Leonard utilizado no experimento e ao número do nódulo isolado na planta.

Ex: 71AB5 em que:

71A = ponto amostrado;

B = repetição do vaso de Leonard utilizado no experimento;

5 = número do nódulo isolado na planta.

Ex: 37C4 em que:

37 = ponto amostrado;

C = repetição do vaso de Leonard utilizado no experimento;

4 = número do nódulo isolado na planta.

3.3 Autenticação dos isolados por meio de inoculação no hospedeiro original e Eficiência Simbiótica

Foram utilizados 122 e 159 isolados oriundos, respectivamente, de solos sob floresta secundária em estágio avançado de regeneração e pastagem, os quais foram selecionados para autenticação e avaliação da eficiência simbiótica por meio de reinoculação em caupi. Efetuou-se a autenticação com o objetivo de verificar a capacidade de nodular das estirpes no hospedeiro utilizado como planta isca, caupi.

Em função do número elevado de estirpes a serem testadas, foram realizados e avaliados três experimentos, os quais foram conduzidos por 45 dias cada um. O primeiro foi montado com parte (85) dos isolados do SUT floresta secundária (em estágio avançado de regeneração ou capoeira velha); o segundo, com o restante (37) dos isolados do SUT floresta secundária (em estágio avançado de regeneração ou capoeira velha) e 75 isolados da pastagem; e o terceiro, com os demais isolados restantes (84) do SUT pastagem. O segundo experimento foi montado com os isolados dos dois SUT devido a problemas com os recipientes utilizados na montagem dos experimentos, que não foram suficientes para montagem completa dos dois SUT em dois únicos experimentos (um apenas para floresta secundária ou capoeira e um apenas para pastagem). Foram utilizados frascos de 500 ml de vidro do tipo "long neck" âmbar; os experimentos ficaram acondicionados em casa-de-vegetação com data de implantação de 23/02/06, 10/05/06 e 17/08/06, respectivamente. Para a montagem das garrafas foram utilizados papel de filtro, fita adesiva e papel alumínio. O papel de filtro foi cortado nas dimensões da garrafa (altura), com 2 cm de largura para servir como suporte às raízes. As garrafas já montadas, com papel de filtro e contendo a solução nutritiva de Jensen modificada (K_2HPO_4 0,2 g L⁻¹; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g L⁻¹, NaCl 0,2 g L⁻¹, $CaHPO_4$ 1 g L⁻¹, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,1 g L⁻¹; H_3BO_3 2,86 mg L⁻¹; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 2,03 mg L⁻¹; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,22 mg L⁻¹;

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $0,08 \text{ mg L}^{-1}$ e $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ $0,09 \text{ mg L}^{-1}$), diluída quatro vezes, foram autoclavadas por 40 minutos à pressão de $1,5 \text{ kg/cm}^2$, a 127°C .

O delineamento estatístico usado foi o inteiramente casualizado (DIC), com três repetições e 122 tratamentos para floresta secundária (capoeira velha) e 159 tratamentos para pastagem, constituídos pela inoculação individual das estirpes citadas anteriormente e de 2 das estirpes usadas como inoculante INPA – 03 11B, UFLA 03-84, mais dois controles (N mineral e testemunha sem N e sem inoculação). O nitrogênio foi aplicado em 2 vezes, no décimo e vigésimo dias após o plantio, totalizando 70 mg de $\text{N-NH}_4\text{NO}_3$ por vaso ($1,75\text{mL}$ por vaso). Para a composição dos tratamentos inoculou-se 1 mL de meio 79 líquido com os isolados na fase log de seu crescimento (quatro dias de cultivo a 28°C), em cada semente.

A cultivar de caupi utilizada foi a BR-17 Gurguéia. As sementes utilizadas foram desinfestadas superficialmente com etanol 70% por 5 segundos e hipoclorito de sódio 1% por 2 minutos. Em seguida, foram lavadas oito vezes com água destilada esterilizada. Ao término deste processo, foram imersas em água estéril por 2 horas e colocadas em placas de petri com algodão umedecido (autoclavado) por 72h, em temperatura ambiente até que a radícula fosse emitida nas sementes. As placas de petri ficaram acondicionadas na bancada de trabalho do laboratório de microbiologia do solo. Os dados obtidos de cada experimento, referentes a massa seca da parte aérea, número de nódulos, matéria seca de nódulos e eficiência relativa, expressa pela fórmula $Efr = (\text{MSPA}_{\text{inoculada}} / \text{MSPA}_{\text{comN}}) \times 100$, em que Efr: eficiência relativa; MSPA inoculada: matéria seca da parte aérea da planta inoculada; MSPA com N: matéria seca da parte aérea da planta com N, foram submetidos à análise de variância empregando-se o programa de análise estatística SISVAR, versão 4.0. As variáveis número de nódulos e matéria seca de nódulos sofreram a transformação Raiz quadrada de $Y+1$.

Para análise dos dados apresentados pelas variáveis respostas número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN) e eficiência relativa (EFR) foram estabelecidos grupos de acordo com a análise estatística feita pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância. Para análise da variável massa seca da parte aérea (MSPA) foram estabelecidos três grupos de eficiência para o SUT floresta (secundária em estágio avançado de regeneração ou capoeira velha) e quatro grupos de eficiência para o SUT pastagem, de acordo com a análise estatística feita pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância, em que, para o SUT floresta secundária (em estágio avançado de regeneração ou capoeira):

a1 = baixa eficiência (de 0,000 a 0,213 g de MSPA, similar estatisticamente à testemunha sem N e sem inoculação);

a2 = média eficiência (de 0,265 a 0,346 g de MSPA);

a3 = alta eficiência (de 0,418 a 0,596 g de MSPA, similar estatisticamente à testemunha com N e sem inoculação);

e para o SUT pastagem:

a1 = baixa eficiência (de 0,028 a 0,184 g de MSPA, similar estatisticamente à testemunha sem N e sem inoculação);

a2 = média eficiência (de 0,203 a 0,344 g de MSPA);

a3 = alta eficiência (de 0,387 a 0,476 g de MSPA);

a4 = eficiência muito alta (de 0,564 a 0,596 g de MSPA, similar estatisticamente à testemunha com N e sem inoculação).

3.4 Análise visual de sintomas de deficiência de nitrogênio

A avaliação do aparecimento de sintomas de deficiência de nitrogênio foi efetuada aos 10, 20 e 30 dias após a implantação dos experimentos por meio de critério visual.

3.5 Análise de proteínas totais por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Durante todo o processo para a realização da análise de diversidade fenotípica as condições de cultivo foram rigorosamente padronizadas para todas as estirpes, incluindo as estirpes-tipo e referência. Nesta análise foram utilizadas apenas as estirpes que nodularam no hospedeiro original, caupi, após a autenticação. As estirpes foram crescidas em meio de cultura 79 sólido por 4 dias e, em seguida, foram crescidas duas vezes sucessivas em meio TY sólido com mesmo tempo de incubação. As colônias isoladas foram inoculadas em 50 ml de meio de cultura líquido TY e incubadas durante 4 dias, sob agitação constante de 120 rpm, a 28°C. Em seguida, o meio com cada cultura foi centrifugado a 12000 rpm por 10 min, à temperatura 4°C, e o sobrenadante foi descartado. O “pelet” formado foi ressuspenso em tampão NaPBS. Este procedimento foi repetido duas vezes, para lavagem das células. Setenta miligramas do “pellet” foram transferidos para tubos de 1,5 mL e a eles foram adicionados 0,9 mL do tampão da amostra (TTA) e 0,1 mL de SDS 20%, para solubilização das proteínas. Esta mistura foi aquecida em banho-maria a 95°C por 15 min. As amostras de proteínas solubilizadas foram centrifugadas a 12000 rpm por 10 min, à temperatura de 4°C. A alíquota de 50 µL de cada amostra foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), de acordo com o método proposto por Laemmli (1970), com modificações descritas por Jackman (1985), utilizado para rizóbio por Moreira et al. (1993). Para eletroforese, utilizou-se um gel de sistema descontínuo com concentração de poliacrilamida a 12% para o gel separação e a 5% para o gel de concentração.

Após a obtenção dos perfis, estes foram comparados aos das estirpes-tipo e de referência de *Rhizobium* spp.: ER316ci0a, ATCC14480^T, CFN42^T, CIAT899^T, HAMBI1147; *Sinorhizobium* spp.: NZP4027^T, USDA205^T, A321^T; *Mesorhizobium* spp.: NZP2213^T, INPA12A, UPMCa7^T, CCBAU2609^T,

UPMca36^T; *Bradyrhizobium* spp.: BR 29 estirpe recomendada como inoculante para a soja (*Glycine max* (L.)Merrill) pela RELARE e identificada como *Bradyrhizobium elkanii*; ATCC 10324^T estirpe tipo de *Bradyrhizobium japonicum*, CPAC7, CPAC15, USDA76^T, SEMIA587, BTA-1T, BC-C2, BC-P5; Azorhizobium spp.: ORS571^T, BR5401; Allorhizobium spp.: Sp7, Z67, M130; utilizando-se, ainda, as estirpes INPA 0311B, isolada da Amazônia ocidental eficiente para caupi (Magalhães, 1986; Lacerda et al.,2004), e UFLA 0384, estirpe de alta eficiência em caupi (Lacerda et al., 2004), sendo estas duas últimas atualmente recomendadas como inoculante para caupi pela RELARE. As bandas foram comparadas e suas semelhanças foram estimadas pelo coeficiente de Jacard (S_j), em que $S_j = a/a + b + c$. Os isolados e as estirpes foram agrupados pelo método UPGMA (average linkage clustering) e representados graficamente por um dendrograma (NTSYS-pc, versão 2.1t).

3.6 Índices de diversidade

As curvas do índice de diversidade de Shannon, do índice estimador de riqueza de Chao I, a curva de rarefação de Chao I e a curva de coleta foram calculadas com o auxílio do programa EstimateS, versão 7.5. Também por meio desse programa foi possível calcular o número de Singletons (grupos com apenas um indivíduo) e Uniques (grupos que ocorrem em apenas uma amostra) (Colwell & Coddington, 1994).

3.7 Caracterização cultural X Caracterização por proteínas totais (SDS-PAGE)

Foi realizada a comparação entre a caracterização cultural e a caracterização feita por proteínas totais (SDS-PAGE) por meio de uma curva de acumulação construída com os grupos culturais formados nos dendogramas e

com os perfis de proteína total utilizando o índice de Shannon (H'), calculado também com o auxílio do programa EstimateS, versão 7.5 (Cowell, 2005).

3.8 Amplificação e sequenciamento parcial do gene 16S do DNA ribossomal

Os isolados foram crescidos em meio de cultura 79 sólido (Fred & Waksman, 1928). Colônias isoladas foram retiradas e colocadas em tubos “*eppendors*” contendo 1000 μL de água ultra pura estéril e aquecidas por 10 minutos a 95°C . Estas amostras foram diluídas 10 vezes e uma alíquota de 20 μL foi utilizada para a reação em cadeia da polimerase (PCR), para um volume final de 100 μL por reação. A concentração final dos reagentes por reação foi 0,2 μM de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores, 27F (5AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT), 2,5 mM de cloreto de magnésio, tampão 1X para PCR, 0,2 μM de cada dNTP e 0,02 U Taq DNA polimerase (PlatinumTM Taq DNA polimerase, Invitrogen). As temperaturas do ciclo de amplificação foram uma desnaturação inicial a 94°C por 5 min., 30 ciclos de desnaturação (94°C por 40 s), anelamento (55°C por 40 s) e extensão (72°C por 1,5 min) extensão final a 72°C por 7 min. Os produtos de amplificação foram avaliados em gel de agarose a 1,5 % e corados em brometo de etídeo ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$). O produto amplificado foi reamplificado utilizando-se o kit Big Dye TM; após a reamplificação, foi purificado utilizando-se a precipitação com etanol. As amostras foram, então, submetidas ao sequenciamento no seqüenciador automático 3730Xl. As seqüências obtidas foram comparadas às existentes no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para a possível identificação das espécies.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Autenticação dos isolados por meio de inoculação no hospedeiro original (planta isca) e Eficiência Simbiótica

A comparação entre os três experimentos foi possível devido aos valores das repetições das testemunhas sem nitrogênio e sem inoculação e com nitrogênio e sem inoculação terem sido semelhantes nos três experimentos, variando em faixas de 0,04 a 0,09 g para testemunha sem nitrogênio e sem inoculação e de 0,498 a 0,705 g para testemunha com nitrogênio e sem inoculação. Desta forma pôde-se agrupar e comparar todos os isolados do SUT floresta secundária (em estágio avançado de regeneração) e pastagem. Lima et al (2005), estudando a diversidade fenotípica e a eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. de solos da Amazônia, encontraram valores de matéria seca da parte aérea (MSPA) em caupi superiores aos acima mencionados para testemunha sem nitrogênio e sem inoculação (0,49g) e para testemunha com nitrogênio sem inoculação (12,00g). Nóbrega (2006), em estudos sobre a ocorrência e eficiência das populações de bactérias que nodulam caupi em diferentes sistemas de uso da terra (SUT) utilizando vasos de Leonard, obteve os seguintes valores para testemunha sem nitrogênio e sem inoculação e com nitrogênio sem inoculação, respectivamente: 0,6 e 3,4g de MSPA.

4.1.1 SUT floresta secundária (em estágio avançado de regeneração ou capoeira velha)

Os valores médios das características avaliadas encontram-se no quadro 1. Os tratamentos influíram em todas as características avaliadas, de forma significativa, a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott. Foram autenticados neste SUT 71 isolados.

Os isolados 71AB9, 81AC10, 88A10, 71AC6, 71AC4, 71AB7, 88AC1, 90A10, 90A8, 60B1, 90C1, 88AC3, 88AC2, 71AB8, 90A4, 88AB8, 81B3 e

81AA3 apresentaram os maiores valores para número de nódulos, e se agruparam às estirpes referência recomendadas para caupi INPA 03-11B e UFLA 03-84, apresentando, esta última, o maior valor do grupo a3. O grupo a3 foi formado por um total de 20 representantes, sendo que 66,67% destes apresentam crescimento lento, 22,22% apresentam crescimento rápido e 11,11% apresentam crescimento intermediário. Este grupo não teve nenhum representante de crescimento muito lento. A variação de valores da variável número de nódulos entre os tratamentos neste grupo foi de 37,666 a 62,000.

O grupo a2 foi formado por 25 representantes, apresentando uma variação de 18,333 a 36,000 entre os tratamentos. Este grupo tem um único representante de crescimento muito lento (4%), 56% de isolados com crescimento lento, 12% de isolados com crescimento rápido e 28% de isolados com crescimento intermediário. Os 81 indivíduos restantes nesta variável foram agrupados ao grupo a1, variando de 0,000 a 13,666 entre os tratamentos. Neste grupo, 73,41% dos isolados são de crescimento rápido, 18,98% de crescimento lento e 7,61% de crescimento intermediário. Não se detectou, neste grupo, isolado de crescimento muito lento.

Já na variável matéria seca de nódulos (MSN), apenas os grupos a1, com 125 representantes, e a2, com 1 representante, foram formados. O isolado 71AB10 de crescimento lento se destacou, permanecendo no grupo a2 e apresentando 2,671g de MSN. Os demais isolados analisados nesta variável resposta foram englobados no grupo a1, sendo que 54,54% destes são de crescimento rápido, 31,40% de crescimento lento e 13,22% de crescimento intermediário. Apenas 1 isolado (0,84%) apresentou crescimento muito lento neste grupo. Os valores de MSN neste grupo variaram de 0,000 a 0,186g entre os tratamentos.

Os maiores valores apresentados para a variável eficiência relativa (EFR) pertencem aos isolados 88AB10a, 88AB6, 88A10 e 88AC2, que se

agruparam com a estirpe referência UFLA 03-84 e com a testemunha nitrogenada a qual apresentou 100% de EFR, formando, assim, o grupo a3, com 6 representantes. Neste grupo, apenas o isolado 88AB10a apresenta crescimento intermediário (25%), sendo que os demais representantes do grupo são de crescimento lento (75%). A faixa de variação entre os tratamentos neste grupo foi de 80,096% a 100,000%. O grupo a2 foi formado por 7 representantes, sendo que 71,42% deles apresentaram crescimento lento, mas contendo um isolado de crescimento intermediário (14,29%) e um isolado de crescimento rápido (14,29%). A variação entre os valores dos tratamentos neste grupo foi de 53,343% a 75,826%. O grupo a1 conteve a maioria de representantes (113). Neste grupo, os indivíduos são representados por 57,67% de crescimento rápido, seguidos por 28,82% de crescimento lento, 12,61% de crescimento intermediário e 1 representante de crescimento muito lento (0,90%). Os tratamentos apresentaram uma variação de valores de 6,373% a 44,560%.

Na variável analisada massa seca da parte aérea (MSPA), o grupo a1 (baixa eficiência), similar à testemunha sem N e sem inoculação, foi composto de 109 representantes, juntamente com a testemunha sem nitrogênio e sem inoculação. A maior parte dos isolados deste grupo é de crescimento rápido (59,25%), seguidos por isolados de crescimento lento (27,77%) e intermediário (12,03%) e apresentando um único representante de crescimento muito lento (0,95%). Os valores de MSPA neste grupo variaram de 0,000 a 0,213g entre os tratamentos. O grupo a2 (média eficiência) foi composto de 7 representantes, juntamente com a estirpe referência INPA 03-11B. Os representantes deste grupo são, em sua maioria (50%), de crescimento lento, seguidos por isolados de crescimento rápido (33,33%) e apresentando um único representante de crescimento intermediário (16,67%). Os valores de MSPA do grupo a2 (média eficiência) variaram de 0,265 a 0,343g entre os tratamentos. Os isolados 88AB3, 90C1, 90A4, 90A8, 88AB10a, 88AB6, 88A10 e 88AC2 apresentaram os

maiores valores, destacando-se e permanecendo no grupo a3 (alta eficiência), similar à testemunha com N e sem inoculação, formado por 10 representantes, ao qual a estirpe referência UFLA 03-84 recomendada como inoculante para caupi e a testemunha nitrogenada são pertencentes. Apenas o isolado 88AB10a apresenta crescimento intermediário (12,5%); os demais representantes deste grupo apresentam crescimento lento (87,5%). Os valores de MSPA neste grupo variaram de 0,418 a 0,596g entre os tratamentos.

QUADRO 1 Valores médios de número de nódulos por planta (NN), quantidade de matéria seca de nódulos por planta (MSN), eficiência relativa (Efr) e massa seca da parte aérea (MSPA) em caupi, no sistema de uso da terra floresta secundária (em estágio avançado de regeneração ou capoeira).

Isolados	NN	MSN	EFR	MSPA
		g planta ⁻¹	%	g planta ⁻¹
88AC4	0,333 a1	0,000 a1	6,373 a1	0,036 a1
23A4	0,000 a1	0,000 a1	6,843 a1	0,040 a1
71AC9	0,000 a1	0,000 a1	6,646 a1	0,040 a1
81AC1	0,000 a1	0,000 a1	6,940 a1	0,040 a1
23C8	0,000 a1	0,000 a1	6,370 a1	0,040 a1
23B6	0,000 a1	0,000 a1	7,513 a1	0,043 a1
88B3	0,000 a1	0,000 a1	7,496 a1	0,046 a1
81AB4	0,000 a1	0,000 a1	7,790 a1	0,046 a1
88AC10	0,000 a1	0,000 a1	8,283 a1	0,049 a1
88AC6	0,000 a1	0,000 a1	8,666 a1	0,050 a1
88AC7	0,000 a1	0,000 a1	8,566 a1	0,051 a1
88A7	0,000 a1	0,000 a1	8,963 a1	0,052 a1
SN	0,000 a1	0,000 a1	9,286 a1	0,052 a1
81AA10	0,000 a1	0,000 a1	9,716 a1	0,053 a1
81AC9a	6,333 a1	0,001 a1	8,830 a1	0,053 a1
88A8	0,000 a1	0,000 a1	9,313 a1	0,054 a1
90C5	0,000 a1	0,000 a1	9,826 a1	0,054 a1
71AB5	0,000 a1	0,000 a1	10,083 a1	0,056 a1
81B5	0,000 a1	0,000 a1	9,690 a1	0,056 a1
81AC2	11,666 a1	0,001 a1	9,596 a1	0,056 a1
Continua...				

Continua...				
88AB2	31,666 a2	0,005 a1	10,283 a1	0,056 a1
81AC7	26,000 a2	0,004 a1	9,300 a1	0,056 a1
23C2	1,0666 a1	0,003 a1	9,893 a1	0,056 a1
37B11	19,333 a2	0,002 a1	10,086 a1	0,056 a1
81AB1	0,000 a1	0,000 a1	10,070 a1	0,060 a1
88AA2	0,000 a1	0,000 a1	10,466 a1	0,060 a1
23B4	0,000 a1	0,000 a1	10,070 a1	0,060 a1
88C1	0,000 a1	0,000 a1	10,463 a1	0,060 a1
90C6	4,333 a1	0,000 a1	11,196 a1	0,062 a1
88AC8	0,000 a1	0,000 a1	10,700 a1	0,063 a1
90C9	0,000 a1	0,000 a1	10,746 a1	0,063 a1
71AB9	48,666 a3	0,007 a1	11,033 a1	0,063 a1
81AC4	0,000 a1	0,000 a1	11,406 a1	0,066 a1
81AB3	0,000 a1	0,000 a1	11,803 a1	0,066 a1
81AB6	0,000 a1	0,000 a1	11,016 a1	0,000 a1
37B11	32,666 a2	0,004 a1	11,210 a1	0,000 a1
71AC7	0,000 a1	0,000 a1	11,306 a1	0,000 a1
90C7	0,000 a1	0,000 a1	11,510 a1	0,068 a1
88C9	0,000 a1	0,000 a1	11,480 a1	0,068 a1
88A3	0,000 a1	0,000 a1	11,286 a1	0,069 a1
71AC8	0,000 a1	0,000 a1	11,683 a1	0,070 a1
88B4	0,000 a1	0,000 a1	11,820 a1	0,000 a1
37C1	7,333 a1	0,002 a1	12,170 a1	0,000 a1
71AC2	0,000 a1	0,000 a1	12,376 a1	0,000 a1
37C2	0,006 a1	0,006 a1	12,276 a1	0,000 a1
88AA4	0,000 a1	0,000 a1	11,926 a1	0,071 a1
88AC9	0,000 a1	0,000 a1	12,226 a1	0,072 a1
37C4	0,006 a1	0,006 a1	11,960 a1	0,073 a1
37B5	0,004 a1	0,004 a1	12,646 a1	0,000 a1
81AB8	0,000 a1	0,000 a1	13,223 a1	0,076 a1
81AA2	0,002 a1	0,002 a1	13,416 a1	0,000 a1
88A6	0,000 a1	0,000 a1	13,470 a1	0,077 a1
37B8	0,003 a1	0,003 a1	13,303 a1	0,080 a1
71AB4	0,000 a1	0,000 a1	13,786 a1	0,000 a1
23A2	0,004 a1	0,004 a1	13,696 a1	0,000 a1
81AA5	0,005 a1	0,005 a1	13,986 a1	0,000 a1
90B4	0,000 a1	0,000 a1	14,493 a1	0,080 a1
81AA9	0,004 a1	0,004 a1	14,656 a1	0,083 a1
71AC3	0,007 a1	0,007 a1	14,553 a1	0,000 a1
23B7	0,002 a1	0,002 a1	14,456 a1	0,000 a1
81B1	0,000 a1	0,000 a1	14,160 a1	0,000 a1
81AB10	0,004 a1	0,004 a1	13,576 a1	0,000 a1
Continua...				

Continua...				
23A9	0,003 a1	0,003 a1	13,756 a1	0,086 a1
23B10	0,005 a1	0,005 a1	14,143 a1	0,000 a1
88C5	0,000 a1	0,000 a1	15,183 a1	0,000 a1
71AB6	0,003 a1	0,003 a1	14,813 a1	0,090 a1
81AC6	0,010 a1	0,010 a1	14,033 a1	0,000 a1
71AC5	0,007 a1	0,007 a1	15,893 a1	0,000 a1
71AB7	41,333 a3	0,005 a1	15,406 a1	0,000 a1
37B6	25,666 a2	0,002 a1	15,390 a1	0,093 a1
71AC10	0,000 a1	0,000 a1	16,073 a1	0,000 a1
23A7	0,000 a1	0,000 a1	16,813 a1	0,096 a1
23C4	2,333 a1	0,004 a1	16,253 a1	0,096 a1
81B6	0,000 a1	0,000 a1	16,743 a1	0,096 a1
37C6	0,000 a1	0,000 a1	16,300 a1	0,099 a1
90A9	13,666 a1	0,005 a1	16,720 a1	0,100 a1
81B3	62,666 a3	0,011 a1	16,623 a1	0,000 a1
23A5	0,000 a1	0,006 a1	17,976 a1	0,103 a1
81AA6	29,333 a2	0,010 a1	17,100 a1	0,000 a1
81AC9b	33,000 a2	0,007 a1	18,863 a1	0,000 a1
23B1	34,666 a2	0,007 a1	18,086 a1	0,000 a1
37B9	18,333 a2	0,007 a1	16,983 a1	0,000 a1
37C5	22,000 a2	0,013 a1	17,473 a1	0,000 a1
71AB10	36,000 a2	2,671 a2	18,640 a1	0,106 a1
60B2	29,000 a2	0,003 a1	17,456 a1	0,000 a1
37B10	33,666 a2	0,011 a1	18,533 a1	0,110 a1
37B12	18,666 a2	0,008 a1	18,923 a1	0,000 a1
23B2	11,333 a1	0,003 a1	17,946 a1	0,000 a1
71AB2	10,000 a1	0,005 a1	20,480 a1	0,113 a1
37B4	33,000 a2	0,014 a1	19,186 a1	0,116 a1
90C8	0,000 a1	0,000 a1	20,653 a1	0,000 a1
88C10	0,000 a1	0,000 a1	22,470 a1	0,118 a1
88AB8	59,000 a3	0,009 a1	20,443 a1	0,120 a1
23A8	0,000 a1	0,000 a1	20,963 a1	0,122 a1
88AA1	34,666 a2	0,009 a1	21,483 a1	0,126 a1
23A3	0,000 a1	0,000 a1	23,276 a1	0,135 a1
90A5	0,000 a1	0,000 a1	25,676 a1	0,139 a1
71AC6	45,333 a3	0,014 a1	26,330 a1	0,140 a1
71AC4	40,000 a3	0,011 a1	24,356 a1	0,000 a1
37B7	27,333 a2	0,014 a1	23,670 a1	0,000 a1
71AB1	24,000 a2	0,012 a1	23,943 a1	0,143 a1
81B9	19,000 a2	0,009 a1	24,493 a1	0,146 a1
88C7	9,000 a1	0,002 a1	25,883 a1	0,150 a1
88AB4	22,666 a2	0,009 a1	24,500 a1	0,000 a1
Continua...				

Continua...				
88C2	32,333 a2	0,023 a1	29,680 a1	0,165 a1
81AC10	39,333 a3	0,041 a1	32,690 a1	0,180 a1
71AC1	0,000 a1	0,000 a1	37,030 a1	0,192 a1
60B1	45,666 a3	0,017 a1	32,396 a1	0,193 a1
81AA3	62,000 a3	0,024 a1	36,130 a1	0,213 a1
03-11B	58,666 a3	0,044 a1	44,433 a1	0,265 a2
81AC3	39,666 a2	0,025 a1	42,916 a1	0,266 a2
90A10	42,666 a3	0,186 a1	43,343 a1	0,267 a2
88AC1	41,000 a3	0,052 a1	44,560 a1	0,278 a2
88AB7	29,000 a2	0,028 a1	53,343 a2	0,289 a2
88AC3	49,666 a3	0,062 a1	59,113 a2	0,343 a2
71AB8	54,333 a3	0,055 a1	61,206 a2	0,346 a2
88AB3	32,000 a2	0,043 a1	70,740 a2	0,418 a3
90C1	47,666 a3	0,054 a1	73,543 a2	0,430 a3
90A4	56,333 a3	0,042 a1	74,123 a2	0,441 a3
90A8	46,666 a3	0,048 a1	75,826 a2	0,448 a3
03-84	71,000 a3	0,072 a1	80,096 a3	0,476 a3
88AB10a	0,000a1	0,000 a1	84,453 a3	0,496 a3
88AB6	26,666 a2	0,045 a1	88,203 a3	0,509 a3
88A10	37,666 a3	0,080 a1	90,733 a3	0,524 a3
88AC2	51,666 a3	0,081 a1	93,310 a3	0,530 a3
CN	0,000 a1	0,000 a1	100,000 a3	0,596 a3

⁽¹⁾Em cada coluna, médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo segundo o teste de Scott- Knott a 5%.

4.1.2 SUT Pastagem

Os valores médios das características avaliadas encontram-se no quadro 2. Os tratamentos também influíram de forma significativa em todas as características avaliadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Foram autenticados 59 isolados neste SUT.

O grupo a1, na variável número de nódulos (NN), foi composto por 113 representantes, sendo que 86,24% destes apresentam crescimento rápido, seguidos por 8,26% dos isolados de crescimento lento e 5,50% de crescimento intermediário. Nenhum isolado com crescimento muito lento faz parte desse grupo. A faixa de variação de valores entre os tratamentos deste grupo, nesta

variável, foi de 0,000 a 9,666. As estirpes referência INPA 03-11B e UFLA 03-84 estão incluídas neste grupo. Vinte e quatro isolados formaram o grupo a2. A maior parte dos isolados deste grupo apresentam crescimento lento (83,33%), seguidos dos de crescimento rápido (12,5%) e de um representante de crescimento intermediário (4,17%). A faixa de variação entre os valores dos tratamentos neste grupo foi de 10,666 a 30,666. O grupo a3, nesta variável, foi constituído de 25 indivíduos, em que 72% apresentam crescimento lento, 24% apresentaram crescimento rápido e apenas um representante apresentou crescimento intermediário (4%). A faixa de variação de valores entre os tratamentos foi de 27,000 a 61,000. Não houve a formação do grupo a4 nesta variável analisada.

Na variável analisada matéria seca de nódulos (MSN), o grupo a1 foi formado com 160 representantes. Estes são, em sua maioria, de crescimento rápido (63,92%), seguidos dos de crescimento lento (30,38%) e intermediário (5,70%), respectivamente. Os valores entre os tratamentos neste grupo variaram de 0,000 a 0,060g. Os grupos a2 e a3 foram formados com as estirpes referência INPA 03-11B e UFLA 03-84, respectivamente. Nesta variável não houve a formação do grupo a4.

Cento e trinta indivíduos formaram o grupo a1 na variável analisada eficiência relativa (EFR); também foi confirmada, neste grupo, a maior parte de isolados com crescimento rápido (75,97%), seguidos dos isolados de crescimento lento (17,83%) e intermediário (6,20%). Os valores entre os tratamentos tiveram variação de 4,822 a 31,705%. O grupo a2 foi composto por 23 representantes e estes obedeceram à seguinte ordem em relação à característica crescimento: crescimento lento (86,36%), rápido (9,09%) e intermediário, com um apenas isolado (4,55%). Os tratamentos deste grupo apresentaram a seguinte variação entre seus valores: 34,839 a 56,985%. Sete indivíduos formaram o grupo a3, sendo que apenas dois (33,33%) apresentam

crescimento rápido e os demais (66,67%), crescimento lento. Não houve presença de isolados de crescimento intermediário neste grupo. A variação de valores de EFR entre os tratamentos para este grupo foi de 60,214 a 80,105%.

O isolado 83C3 apresentou valores semelhantes à testemunha nitrogenada (100% EFR), constituindo, assim, o grupo a4, destacando-se em um único grupo e mostrando-se superior aos isolados restantes. Este isolado apresenta crescimento lento e obteve 99,516% de EFR.

Na variável analisada massa seca da parte aérea (MSPA), o grupo a1 (baixa eficiência), similar à testemunha sem N e sem inoculação, foi composto por 130 representantes, sendo que a testemunha sem nitrogênio e sem inoculação também está contida neste grupo. A maior parte dos isolados deste grupo é de crescimento rápido (75,19%), seguidos por isolados de crescimento lento (18,60%) e intermediário (6,20%). Os valores de MSPA neste grupo variaram de 0,028 a 0,184g entre os tratamentos. O grupo a2 (média eficiência) foi composto de 25 isolados sendo que a estirpe referência INPA 03-11B também está incluída neste grupo. Os representantes deste grupo são, em sua maioria, de crescimento lento (83,33%), seguidos por isolados de crescimento rápido (12,5%) e apenas 1 apresenta crescimento intermediário (4,17%). Os valores de MSPA do grupo a2 (média eficiência) variaram de 0,203 a 0,344g entre os tratamentos. O grupo a3 (alta eficiência) foi composto por 5 representantes, sendo que, destes, apenas um isolado apresenta crescimento rápido (25%) e os demais (75%) apresentam crescimento lento. A estirpe inoculante UFLA 03-84 está contida neste grupo. A variação de valores entre os tratamentos neste grupo foi de 0,387 a 0,476g de MSPA. Houve destaque do isolado 83C3, que foi similar à testemunha com N e sem inoculação em valores para esta variável analisada, constituindo, assim, o grupo a4 (eficiência muito alta) e se destacando dos demais. Este isolado apresenta crescimento lento.

QUADRO 2 Valores médios de número de nódulos (NN), quantidade de matéria seca de nódulos (MSN) por planta, eficiência relativa (EFR) e massa seca da parte aérea (MSPA) em caupi no sistema de uso da terra pastagem.

Isolados	NN	MSN	EFR	MSPA
		g planta ⁻¹	%	g planta ⁻¹
94C6	0,000 a1	0,000 a1	4,822 a1	0,028 a1
94B11	10,666 a1	0,002 a1	5,757 a1	0,034 a1
94B4	0,000 a1	0,000 a1	6,533 a1	0,036 a1
87B2	0,000 a1	0,000 a1	6,289 a1	0,038 a1
83B10	0,000 a1	0,000 a1	6,514 a1	0,038 a1
89A6	0,000 a1	0,000 a1	7,171 a1	0,043 a1
84B11	0,000 a1	0,000 a1	7,180 a1	0,044 a1
86A5	0,000 a1	0,000 a1	7,681 a1	0,044 a1
95B1	2,000 a1	0,001 a1	7,680 a1	0,045 a1
95C1	0,000 a1	0,000 a1	7,937 a1	0,046 a1
94B1	0,000 a1	0,000 a1	7,950 a1	0,046 a1
87C2	0,000 a1	0,000 a1	7,915 a1	0,047 a1
95A3	0,000 a1	0,000 a1	8,740 a1	0,049 a1
96C8	0,333 a1	0,000 a1	8,697 a1	0,050 a1
92A1A	0,000 a1	0,000 a1	8,478 a1	0,050 a1
94B3	0,000 a1	0,000 a1	8,396 a1	0,052 a1
92B8	0,000 a1	0,000 a1	9,042 a1	0,052 a1
SN	0,000 a1	0,000 a1	9,292 a1	0,052 a1
87C5A	0,000 a1	0,000 a1	9,484 a1	0,054 a1
94A4	0,000 a1	0,000 a1	9,865 a1	0,057 a1
95B8	0,000 a1	0,000 a1	10,231 a1	0,058 a1
95A9	0,000 a1	0,000 a1	9,773 a1	0,059 a1
95B4	0,000 a1	0,000 a1	9,768 a1	0,059 a1
92A8B	0,000 a1	0,000 a1	10,200 a1	0,060 a1
87C5B	0,000 a1	0,000 a1	9,740 a1	0,060 a1
94A6	0,000 a1	0,000 a1	9,966 a1	0,060 a1
87C9	0,000 a1	0,000 a1	9,828 a1	0,060 a1
92A1B	0,000 a1	0,000 a1	10,308 a1	0,061 a1
94A5	0,000 a1	0,000 a1	11,088 a1	0,061 a1
94B9	0,000 a1	0,000 a1	10,548 a1	0,061 a1
83B8	0,000 a1	0,000 a1	10,970 a1	0,062 a1
89A9	0,000 a1	0,000 a1	10,785 a1	0,062 a1
87C8	0,000 a1	0,000 a1	10,421 a1	0,062 a1
86C6	0,000 a1	0,000 a1	10,378 a1	0,063 a1
Continua...				

Continua...				
87C4	0,000 a1	0,000 a1	10,470 a1	0,063 a1
94A8	0,000 a1	0,000 a1	10,498 a1	0,063 a1
87C7	0,000 a1	0,000 a1	11,004 a1	0,064 a1
95C10	17,000 a2	0,007 a1	11,399 a1	0,066 a1
89B8	0,000 a1	0,000 a1	11,017 a1	0,066 a1
83B1	0,000 a1	0,000 a1	11,708 a1	0,066 a1
84C1	0,000 a1	0,000 a1	11,312 a1	0,067 a1
84A6	0,000 a1	0,000 a1	11,147 a1	0,067 a1
86C7	0,000 a1	0,000 a1	11,196 a1	0,068 a1
87C6	0,000 a1	0,000 a1	11,698 a1	0,068 a1
89A2	0,000 a1	0,000 a1	10,787 a1	0,068 a1
94C5	0,000 a1	0,000 a1	11,451 a1	0,069 a1
86C3	0,000 a1	0,000 a1	13,129 a1	0,069 a1
95A8	0,000 a1	0,000 a1	11,735 a1	0,069 a1
92B2	0,000 a1	0,000 a1	12,150 a1	0,069 a1
95C2b	0,000 a1	0,000 a1	12,443 a1	0,070 a1
92B6	0,000 a1	0,000 a1	12,723 a1	0,070 a1
95C8	0,000 a1	0,000 a1	12,711 a1	0,071 a1
94C8	0,000 a1	0,000 a1	12,330 a1	0,072 a1
83A2	14,000 a2	0,005 a1	12,559 a1	0,072 a1
92C6	0,000 a1	0,000 a1	12,379 a1	0,072 a1
93C5	0,000 a1	0,000 a1	12,049 a1	0,072 a1
92C9	0,000 a1	0,000 a1	12,745 a1	0,075 a1
92B10	0,000 a1	0,000 a1	12,700 a1	0,076 a1
87B7	0,000 a1	0,000 a1	13,097 a1	0,077 a1
95A4	0,000 a1	0,000 a1	13,187 a1	0,077 a1
95A5	0,000 a1	0,000 a1	13,141 a1	0,079 a1
92B9	0,000 a1	0,000 a1	13,660 a1	0,080 a1
94A7	0,000 a1	0,000 a1	13,991 a1	0,080 a1
89C1	0,000 a1	0,000 a1	12,857 a1	0,081 a1
84B2	0,000 a1	0,000 a1	13,908 a1	0,081 a1
92A3a	0,000 a1	0,000 a1	14,349 a1	0,081 a1
92A3b	7,333 a1	0,001 a1	14,530 a1	0,082 a1
95A6	0,000 a1	0,000 a1	13,707 a1	0,083 a1
95C4	0,000 a1	0,000 a1	13,819 a1	0,084 a1
89C5	0,000 a1	0,000 a1	14,248 a1	0,084 a1
96C4	0,000 a1	0,000 a1	13,573 a1	0,085 a1
89A10	11,666 a1	0,008 a1	14,548 a1	0,086 a1
87B3	8,000 a1	0,005 a1	16,127 a1	0,088 a1
89C8	0,000 a1	0,000 a1	14,547 a1	0,088 a1
95A1	0,000 a1	0,000 a1	15,287 a1	0,090 a1
86A6	0,000 a1	0,000 a1	15,731 a1	0,091 a1
Continua...				

Continua...				
95C2a	0,000 a1	0,000 a1	15,387 a1	0,091 a1
92A6	0,000 a1	0,000 a1	15,703 a1	0,092 a1
92B5	0,000 a1	0,000 a1	15,737 a1	0,094 a1
95B2	0,000 a1	0,000 a1	16,109 a1	0,094 a1
94C7	0,000 a1	0,000 a1	16,375 a1	0,098 a1
92A5	0,000 a1	0,000 a1	17,580 a1	0,099 a1
92C4	0,000 a1	0,000 a1	16,286 a1	0,102 a1
83A4	39,666 a3	0,009 a1	17,925 a1	0,102 a1
84A1	12,000 a2	0,008 a1	18,303 a1	0,103 a1
84B12	0,000 a1	0,000 a1	18,211 a1	0,103 a1
89A7	0,000 a1	0,000 a1	14,298 a1	0,103 a1
94C3	0,000 a1	0,000 a1	17,916 a1	0,104 a1
84A9	0,000 a1	0,000 a1	18,768 a1	0,105 a1
92A8A	0,000 a1	0,000 a1	19,658 a1	0,106 a1
94A3	0,000 a1	0,000 a1	18,482 a1	0,107 a1
92A7	0,000 a1	0,000 a1	18,602 a1	0,107 a1
96A4	19,000 a2	0,038 a1	18,379 a1	0,108 a1
92C1	0,000 a1	0,000 a1	18,137 a1	0,109 a1
85B1	0,000 a1	0,000 a1	20,249 a1	0,114 a1
89C6	0,000 a1	0,000 a1	20,290 a1	0,114 a1
84A4	38,000 a3	0,015 a1	20,861 a1	0,116 a1
86A2	52,333 a3	0,010 a1	19,780 a1	0,117 a1
87AB2	0,000 a1	0,000 a1	19,916 a1	0,118 a1
95A2	30,666 a2	0,012 a1	22,524 a1	0,119 a1
94B2	27,666 a3	0,007 a1	19,245 a1	0,121 a1
86A4	0,000 a1	0,000 a1	21,725 a1	0,121 a1
89A3	9,666 a1	0,012 a1	21,321 a1	0,127 a1
84A8	9,000 a1	0,002 a1	22,196 a1	0,129 a1
92B7	41,000 a3	0,023 a1	21,841 a1	0,129 a1
94A10	0,000 a1	0,000 a1	24,196 a1	0,129 a1
83A3	28,666 a3	0,012 a1	22,674 a1	0,129 a1
86C4	0,000 a1	0,000 a1	22,151 a1	0,130 a1
89C9	0,000 a1	0,000 a1	22,338 a1	0,131 a1
95A7	0,000 a1	0,000 a1	24,005 a1	0,134 a1
92B1	0,000 a1	0,000 a1	24,043 a1	0,140 a1
94B7	16,333 a2	0,016 a1	22,546 a1	0,140 a1
96A2	43,000 a3	0,021 a1	23,303 a1	0,143 a1
94C1	24,000 a2	0,020 a1	24,582 a1	0,143 a1
86C9	0,000 a1	0,000 a1	23,799 a1	0,145 a1
92B3	0,000 a1	0,000 a1	25,086 a1	0,145 a1
87B6	0,000 a1	0,000 a1	26,253 a1	0,147 a1
87B1	36,666 a3	0,050 a1	27,887 a1	0,157 a1
Continua...				

Continua...				
87B9	12,666 a2	0,016 a1	30,399 a1	0,158 a1
96A3	10,666 a2	0,015 a1	27,922 a1	0,160 a1
94B6	19,666 a2	0,019 a1	27,749 a1	0,165 a1
93B1	0,000 a1	0,000 a1	29,549 a1	0,167 a1
86C10	48,333 a3	0,028 a1	28,224 a1	0,167 a1
84A5	24,666 a2	0,025 a1	27,490 a1	0,169 a1
93C6	0,000 a1	0,000 a1	29,275 a1	0,170 a1
96C1	36,000 a3	0,026 a1	28,351 a1	0,171 a1
87A6	28,333 a2	0,032 a1	30,234 a1	0,171 a1
89B1	0,000 a1	0,000 a1	31,705 a1	0,178 a1
86C2	18,333 a2	0,013 a1	30,985 a1	0,178 a1
94C4	31,666 a3	0,023 a1	29,425 a1	0,184 a1
87A3	16,000 a2	0,033 a1	36,893 a2	0,203 a2
87A2	16,000 a2	0,028 a1	34,839 a2	0,203 a2
96C2a	29,666 a2	0,028 a1	36,283 a2	0,205 a2
84B10	0,000 a1	0,000 a1	35,509 a2	0,213 a2
87B8	30,333 a3	0,029 a1	36,872 a2	0,216 a2
89B10	20,333 a2	0,029 a1	37,563 a2	0,218 a2
89C2	6,666 a1	0,007 a1	37,546 a2	0,222 a2
92C3	14,666 a2	0,014 a1	40,050 a2	0,223 a2
96C3	9,333 a1	0,006 a1	38,985 a2	0,227 a2
84A3	34,000 a3	0,044 a1	41,142 a2	0,230 a2
83C2	42,000 a3	0,049 a1	39,625 a2	0,233 a2
87A1	23,333 a2	0,026 a1	39,892 a2	0,234 a2
96C9	27,333 a3	0,028 a1	40,926 a2	0,238 a2
87B5	14,333 a2	0,040 a1	44,857 a2	0,254 a2
93C2	32,333 a3	0,033 a1	43,566 a2	0,257 a2
87B10	24,666 a2	0,034 a1	46,188 a2	0,257 a2
03-11B	0,044 a1	58,666 a2	44,435 a2	0,265 a2
95B3	19,333 a2	0,012 a1	45,858 a2	0,274 a2
96C10	17,000 a2	0,035 a1	52,008 a2	0,293 a2
95C6	43,333 a3	0,040 a1	50,735 a2	0,305 a2
83C4	34,000 a3	0,043 a1	54,188 a2	0,308 a2
83B3	27,000 a3	0,032 a1	51,527 a2	0,312 a2
87C1	0,000 a1	0,000 a1	62,087 a3	0,324 a2
95B5	23,666 a2	0,050 a1	60,214 a3	0,338 a2
89B2	27,000 a3	0,057 a1	56,985 a2	0,344 a2
95C3	61,000 a3	0,037 a1	67,929 a3	0,387 a3
95C5	48,666 a3	0,051 a1	69,921 a3	0,398 a3
95B9	39,000 a3	0,056 a1	68,766 a3	0,411 a3
95B10	38,000 a3	0,060 a1	75,702 a3	0,431 a3
03-84	0,072 a1	71,333 a3	80,105 a3	0,476 a3
Continua...				

Continua...				
83C3	43,666 a3	0,057 a1	99,516 a4	0,564 a4
CN	0,000 a1	0,000 a1	100,000 a4	0,596 a4

⁽¹⁾Em cada coluna, médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo segundo o teste de Scott- Knott a 5%.

4.1.3 Comparação entre SUT floresta secundária (em estágio avançado de regeneração ou capoeira) e SUT pastagem

Foi detectada, nos dois SUT analisados, a presença de bactérias eficientes na simbiose com o caupi. O SUT capoeira apresentou menor porcentagem de isolados eficientes, 13,93%, em relação à pastagem, 20,12%. A presença de bactérias eficientes na simbiose se explica devido à grande diversidade das mesmas nestes sistemas de uso da terra. Lacerda et al. (2004) exemplificam o potencial da região tropical como fonte de novas estirpes quando relatam que estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solos da Amazônia foram altamente eficientes em caupi, até mesmo superando as estirpes recomendadas, particularmente no Estado de Minas Gerais, mostrando potencial para serem utilizadas como inoculantes em outras regiões do Brasil. Nóbrega (2006), avaliando a ocorrência e eficiência das populações de bactérias diazotróficas que nodulam caupi em vasos de Leonard nos SUT floresta primária; floresta secundária em estágio inicial de regeneração; roça (agricultura); pastagem; floresta secundária em estágio avançado de regeneração e agrofloresta, encontrou os seguintes valores médios em pastagem e floresta secundária em estágio avançado de regeneração para número e peso fresco de nódulos: 41 e 0,8 g e 42 e 0,8 g, respectivamente. A quantidade de bactérias eficientes nestes SUT é considerada alta e corrobora os resultados mostrados neste trabalho, com valores médios de número de nódulos de 38 para floresta secundária (em estágio avançado de regeneração) e 28 para pastagem, sendo o número de nódulos um reflexo do número de bactérias presentes nas amostras, o

qual se aplica como uma medida semi quantitativa do número de células presentes.

Nóbrega (2006) ainda relata que as populações de bactérias que nodulam caupi promoveram acréscimos nos valores de matéria seca da parte aérea e matéria seca total em relação ao controle (com nitrogênio e sem inoculação) em pastagem e floresta secundária em estágio avançado de regeneração, indicando que suas populações são mais eficientes que as dos sistemas de uso da terra agrofloresta, floresta primária, agricultura e floresta secundária em estágio inicial de regeneração, o que é comprovado pelos resultados apresentados em nosso trabalho. Este nosso trabalho mostra que estas populações apresentam isolados com eficiência variável. Pode ainda ser usado como exemplo o ponto da pastagem, em que o valor máximo para obtenção de MSPA foi semelhante ao produzido com a estirpe recomendada para caupi INPA 03-11B. No entanto, a grande eficiência de bactérias em fixar nitrogênio está relacionada ao desenvolvimento da planta e, assim, automaticamente com a maior aquisição de nitrogênio e produção de matéria seca da parte aérea. De acordo com Lima et al. (2005), as estirpes referência recomendadas para caupi UFLA 03-84 e INPA 03-11B apresentaram a mesma produção de MSPA que o controle com adição de nitrogênio mineral, 13,06 e 9,97 g, respectivamente e NN de 871 e 753, respectivamente.

Assim, verifica-se que as coberturas vegetais floresta em estágio avançado de regeneração e pastagem foram os fatores determinantes da ocorrência e eficiência das populações de bactérias diazotróficas que nodulam caupi nos dois SUT analisados. Pode-se considerar que as populações que nodularam caupi nestes dois SUT possuem isolados altamente eficientes, que apresentam potencial como fonte de recursos genéticos para inoculantes nos trópicos, sendo que a tolerância a altas temperaturas e os valores baixos de pH devem ser enfatizados na seleção de estirpes eficientes nos trópicos.

4.2 Análise visual de sintomas de deficiência de nitrogênio

Por meio da análise visual, não foi detectada a deficiência de nitrogênio nos 10 primeiros dias após a implantação do experimento, uma vez que a planta ainda se nutre da reserva de N contida nos cotilédones que não foram retirados.

Aos 15 dias após a implantação do experimento foi constatado o início da formação de nódulos na maioria dos vasos inoculados.

A deficiência de nitrogênio começou a ser observada a partir do vigésimo dia após a implantação do experimento, através de uma clorose parcial na testemunha sem N e sem inoculação, e também em algumas plantas inoculadas em relação à testemunha com nitrogênio e sem inoculação, que se manteve verde durante todo o período de condução do experimento. Aos 30 dias após a implantação do experimento na maioria dos vasos inoculados já era possível ver nódulos bem desenvolvidos. Aos trinta dias, as populações eficientes apresentavam desempenho semelhante à testemunha com nitrogênio e sem inoculação, enquanto as plantas inoculadas com populações ineficientes e testemunha sem nitrogênio e sem inoculação apresentavam clorose generalizada e menor crescimento vegetativo em relação à testemunha com nitrogênio e sem inoculação. Aos 45 dias após a implantação de experimento, quando foi realizada a colheita das plantas, era possível discriminar os vasos que apresentavam populações eficientes dos que apresentavam populações ineficientes, pois os que apresentaram populações eficientes eram semelhantes à testemunha com nitrogênio e sem inoculação e os demais eram semelhantes à testemunha sem nitrogênio e sem inoculação. Também houve vasos que não apresentaram nodulação, e estes seguiram o comportamento da testemunha sem nitrogênio e sem inoculação. No segundo experimento houve a incidência da doença oídio, que foi detectada aos 21 dias após a implantação do experimento e controlada com a utilização do fungicida Kumulus-S (BASF), de composição 800g/Kg de enxofre e 20% m/m de ingredientes inertes, utilizando-se 2g/L em

solução e fazendo-se 2 pulverizações semanais no experimento desde o aparecimento da doença até a colheita. O elevado número de nódulos observado indica que estas deficiências não prejudicaram a nodulação nos vasos.



FIGURA 4 Diagnose visual de sintomas de deficiência de N. De cima para baixo: experimento 1, experimento 2 e experimento 3. (A) 10 dias, (B) 20 dias e (C) 30 dias após implantação.

4.3 Análise de proteínas totais por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

4.3.1 SUT floresta secundária (em estágio avançado de regeneração)

O dendograma de similaridade formado pelo agrupamento dos isolados está apresentado na Figura 5. Quatro grupos de isolados apresentaram 100% de similaridade, sendo eles representados pelos isolados: grupo I – 88AB6, 88AC3,

90A8; grupo II – 71AC5, 37C5; grupo III – 90A10, 90C1 e grupo IV – 81AA2, 81AC6, 90C6. Não houve agrupamento dos isolados que apresentaram 100% de similaridade com as estirpes-tipo e/ou referência. Depois do agrupamento a 100% de similaridade, os primeiros grupos formados foram a 92% (94 grupos), e os últimos, a 8% (1 grupo) de similaridade, respectivamente. Todos os isolados em estudo neste SUT apresentaram perfil protéico em gel de poliacrilamida. Consta-se que, à medida que o valor de similaridade diminui em escala no gráfico, os ramos do dendograma são menos discriminativos para os isolados em estudo, originando, nestas porcentagens, grupos com maior número de indivíduos.

4.3.2 SUT pastagem

O dendograma de similaridade formado pelo agrupamento dos isolados está apresentado na Figura 6. Não foi possível avaliar o perfil protéico dos isolados 84B1, 84A5, 87B10, 93C2, 83A3, 83A2, 83A4 e 89A3. Cinco grupos de isolados apresentaram 100% de similaridade, sendo eles representados pelos isolados: grupo I – 95C3, 95C10; grupo II – 87B9, 96A2; 86A2, 96C9; grupo III – 84A4, 87A2; grupo IV – 96A4, 87B3 e grupo V – 94B6, 96C10, 87B1. Não houve agrupamento dos isolados que apresentaram 100% de similaridade com as estirpes-tipo e/ou referência. Neste SUT foi verificado que, após a formação dos grupos a 100% de similaridade, os primeiros grupos formados foram a 90% (62 grupos), e os últimos, a 9% (3 grupos) de similaridade, o que corrobora a tendência de que à medida que os valores decrescem em escala no gráfico (dendograma) há formação de menor número de grupos, porém estes grupos apresentam maior número de indivíduos, sendo, então, menos discriminativos.

4.3.3 Sistema de uso da terra floresta secundária em estágio avançado de regeneração X Sistema de uso da terra pastagem

O dendograma de similaridade formado pelo agrupamento dos isolados dos dois SUT está apresentado na Figura 7. Foram formados 10 grupos a 100% de similaridade e, entre eles, dois agruparam isolados dos sistemas de uso da terra floresta secundária (em estágio avançado de regeneração) e pastagem. Estes grupos são representados pelos isolados grupo I- 90A10(F), 90C1(F), 95B9(P) e grupo II- 71AB9(F), 83C2(P). Os demais grupos formados a 100% de similaridade são compostos por isolados de apenas um dos SUT. Estes são representados pelos isolados do SUT floresta secundária (em estágio avançado de regeneração): grupo III- 88AB6, 90A8, 88AC3; grupo IV- 81AA2, 81AC6, 90C6; grupo V- 71AC5, 37C5 e pelos isolados do SUT pastagem: grupo VI- 87B9, 96C9, 96A2, 86A2; grupo VII- 95C3, 95C10; grupo VIII- 84A4, 87A2; grupo IX- 96A4, 87B3; e grupo X- 94B6,96C10,87B1. Os demais grupos foram formados entre 92% (135 grupos) até 8% (2 grupos) de similaridade, respectivamente.

Analisando os dendogramas de similaridade formados pelo agrupamento de perfis protéicos dos isolados dos dois SUT, foi possível verificar uma elevada diversidade entre os isolados obtidos, inferindo-se, assim, uma alta diversidade de bactérias diazotróficas que nodulam caupi. A maioria dos grupos formados nos dois SUT não apresentou agrupamento com nenhuma estirpe-tipo e/ou referência e com nenhum isolado, o que comprova esta diversidade, indicando, também, a provável presença de novas espécies de bactérias diazotróficas que nodulam caupi.

Foi verificada, de acordo com Lima et al. (2005), elevada diversidade entre 46 estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia (monocultura, capoeira, pastagem, floresta e sistema agroflorestal), sendo formados 11 grupos com 80% de similaridade através do

perfil protéico total SDS-PAGE. Estes autores observaram que diversos isolados diferiram das espécies *B. elkanii*, *B. japonicum* e *B. liaoningense* atualmente descritas e que podem representar fenótipos diferentes das espécies descritas atualmente. A análise de proteína total por SDS-PAGE permite avaliar a diversidade de bactérias com confiabilidade, rapidez e baixo custo.

Avaliando o efeito dos sistemas de uso da terra (cultivo de mandioca, pupunheira e floresta de terra firme) da Amazônia ocidental sobre a diversidade fenotípica cultural de 257 bactérias que nodulam siratro (*Macropitilium atropurpureum*), Jesus et al. (2005) relatam que nas áreas em que foi cultivada mandioca houve maior diversidade e riqueza de bactérias.

Nóbrega, (2006) avaliando os SUT floresta primária; floresta secundária em estágio inicial de regeneração; agricultura; pastagem; floresta secundária em estágio avançado de regeneração e agrofloresta, observaram uma grande diversidade de fenótipos mediante análise de proteína total por SDS-PAGE.

Neste trabalho foi utilizada a nova espécie de *Bradyrhizobium canariense* BTA-1^T e BC-P5 (Vinuesa et al., 2005).

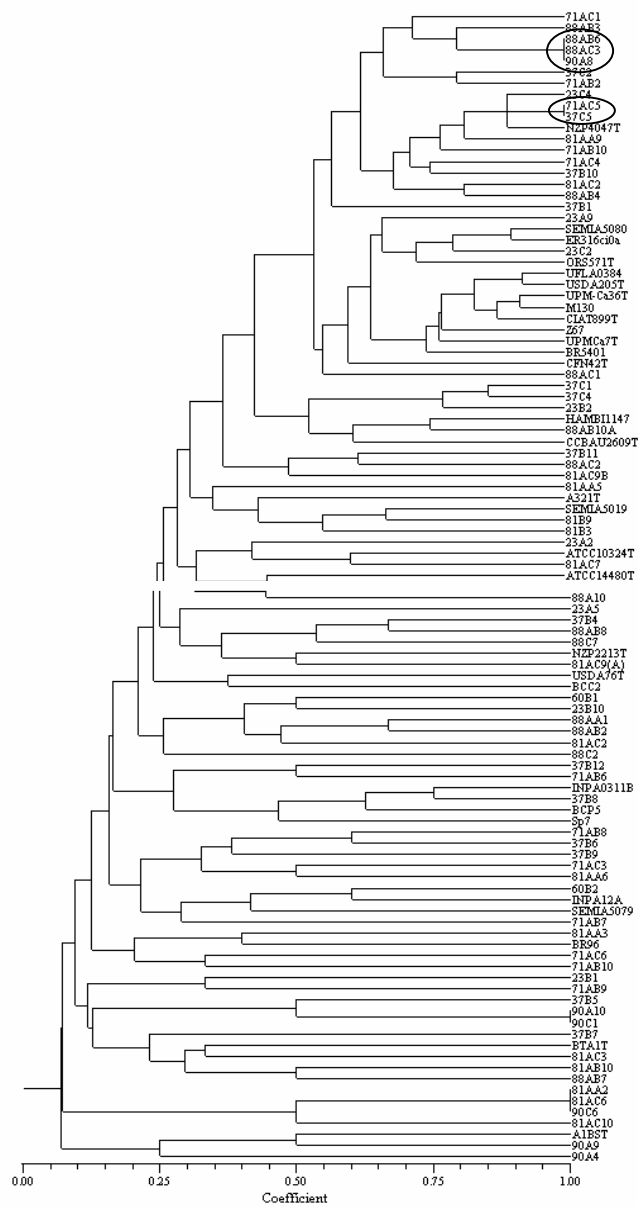


FIGURA 5 Dendrograma de similaridade construído de acordo com o perfil protéico total dos isolados do SUT floresta secundária (em estágio avançado de regeneração) e estirpes-tipo e referência.

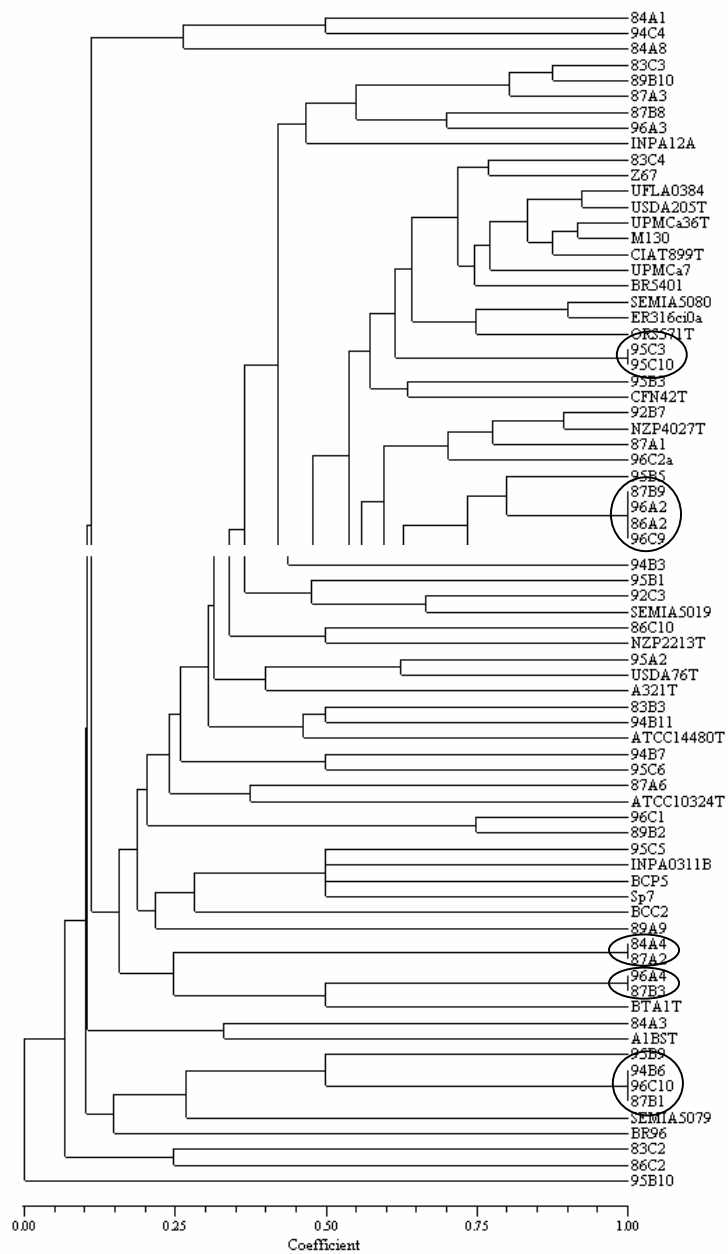


FIGURA 6 Dendrograma de similaridade construído de acordo com o perfil protéico total dos isolados do SUT pastagem e estirpes-tipo e referência.

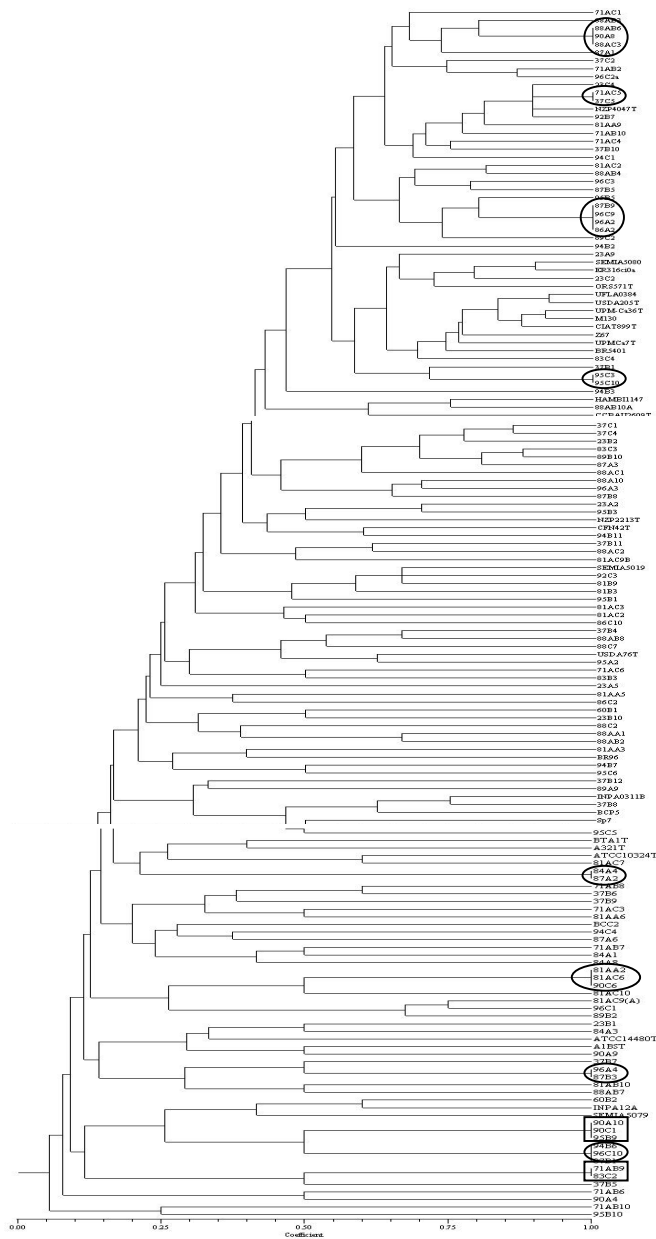


FIGURA 7 Dendrograma de similaridade construído de acordo com o perfil proteico total dos isolados dos SUT floresta secundária (em estágio avançado de regeneração) e pastagem com estirpes-tipo e referência.

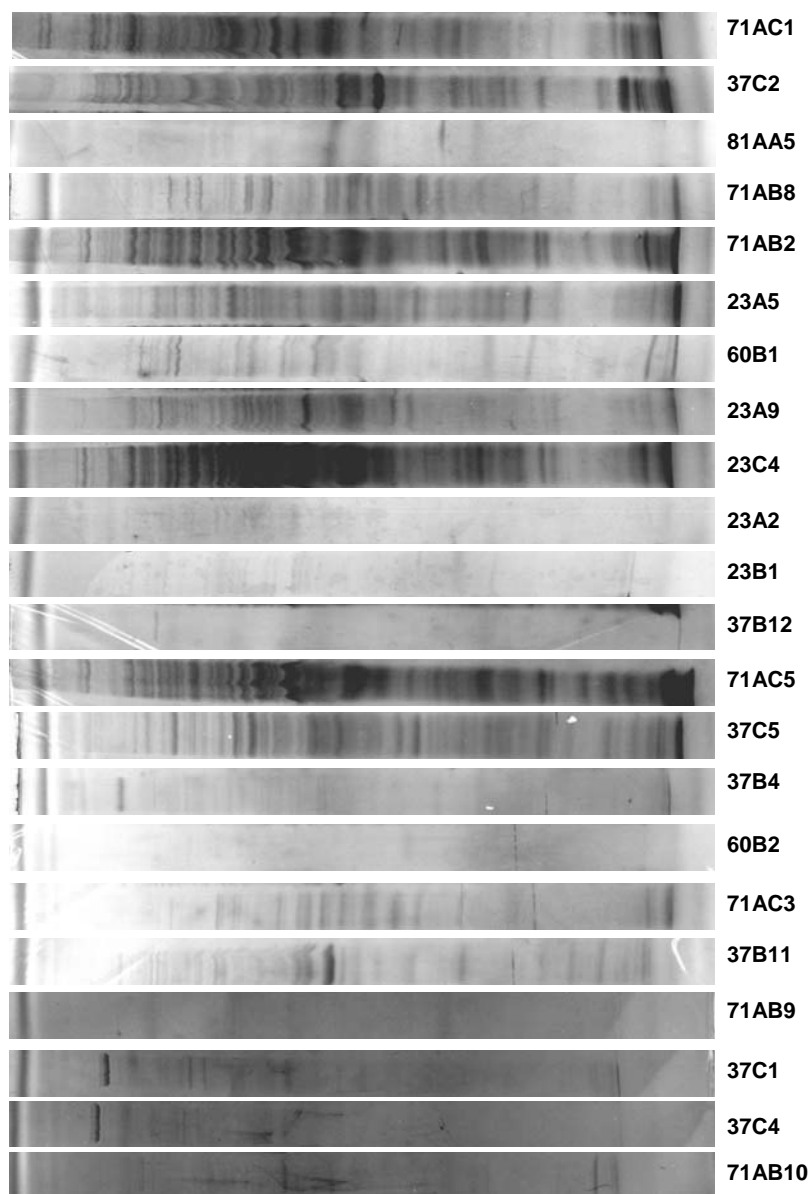


FIGURA 8 Perfis de proteína celular total, de isolados dos SUT floresta secundária (em estágio avançado de regeneração) e pastagem, obtidas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). (Continua...)

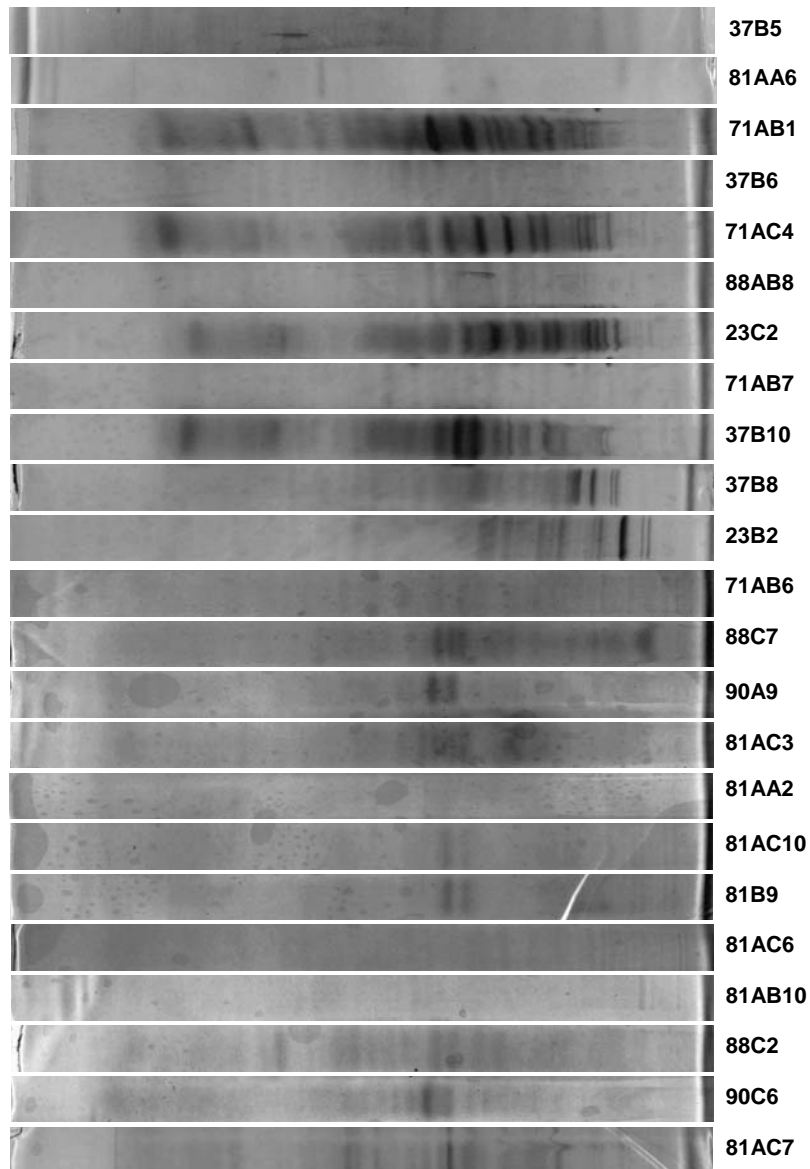


FIGURA 8 Perfis de proteína celular total, de isolados dos SUT floresta secundária (em estágio avançado de regeneração) e pastagem, obtidas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). (Continua...)

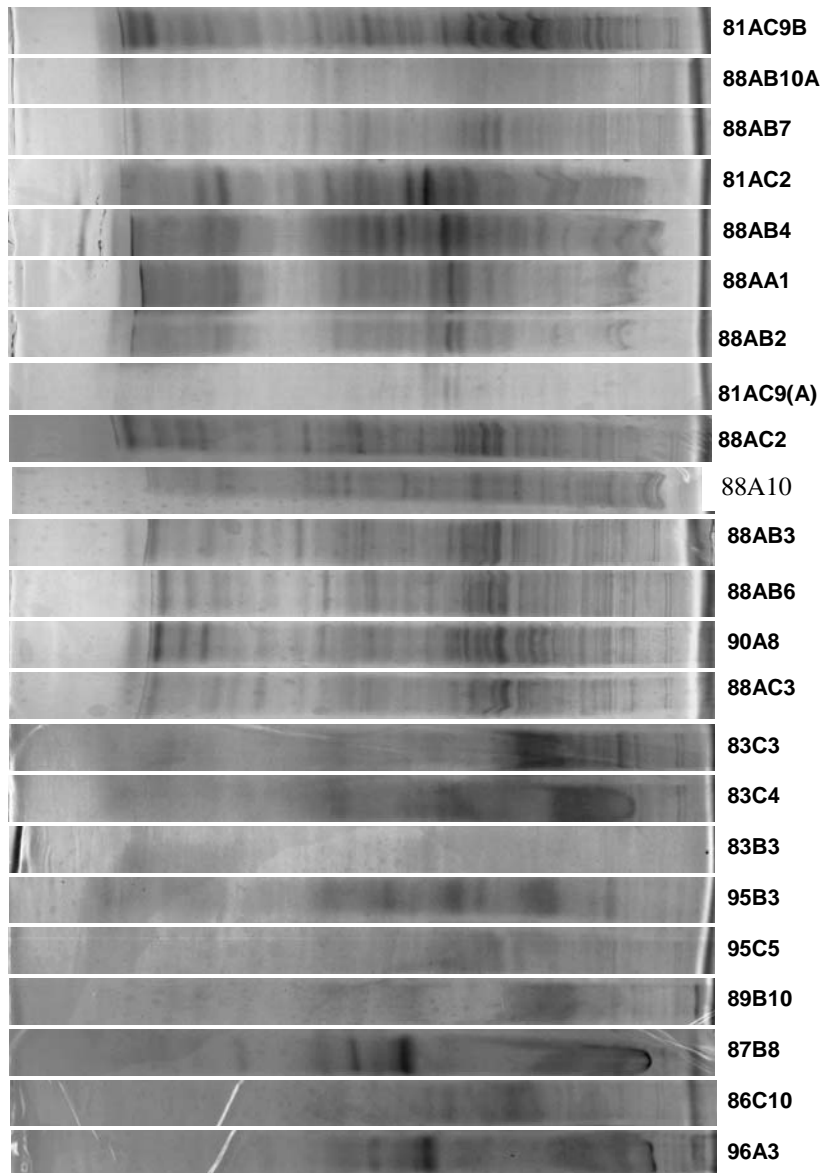


FIGURA 8 Perfis de proteína celular total, de isolados dos SUT floresta secundária (em estágio avançado de regeneração) e pastagem, obtidas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). (Continua...)

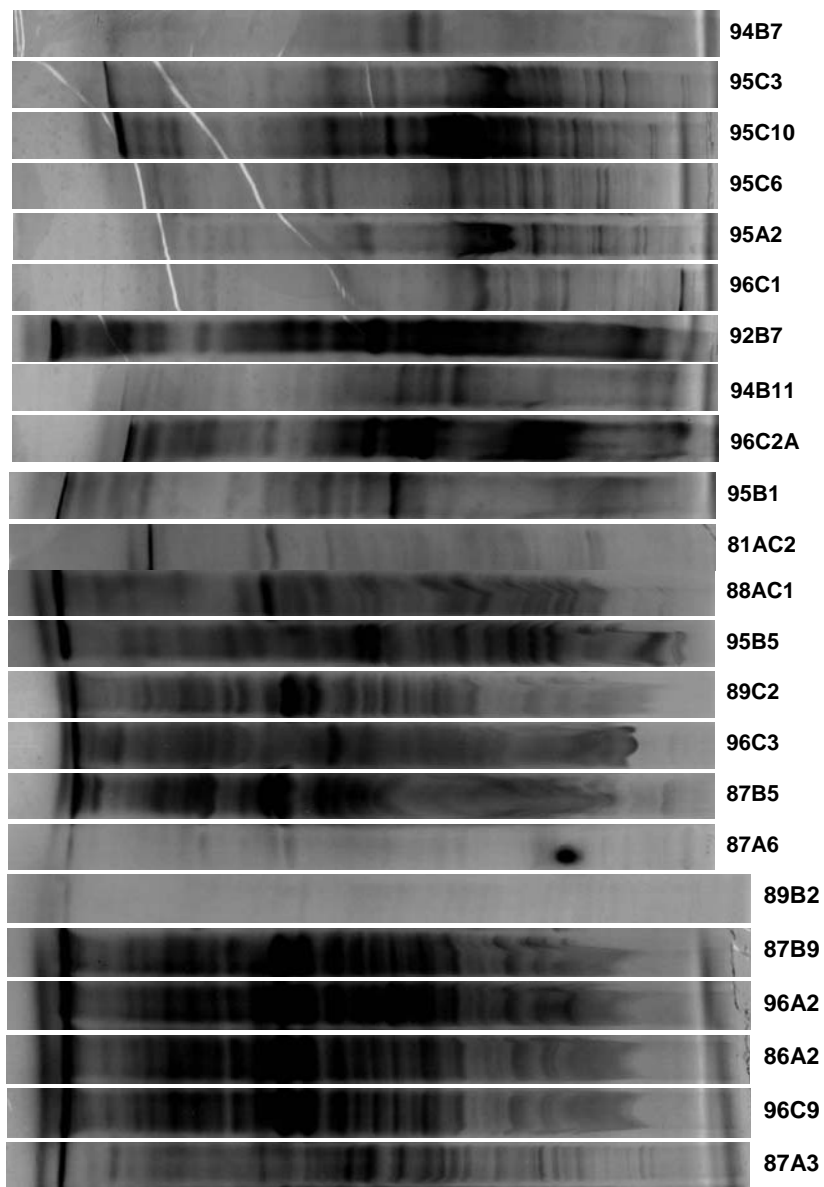


FIGURA 8 Perfis de proteína celular total, de isolados dos SUT floresta secundária (em estágio avançado de regeneração) e pastagem, obtidas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). (Continua...)

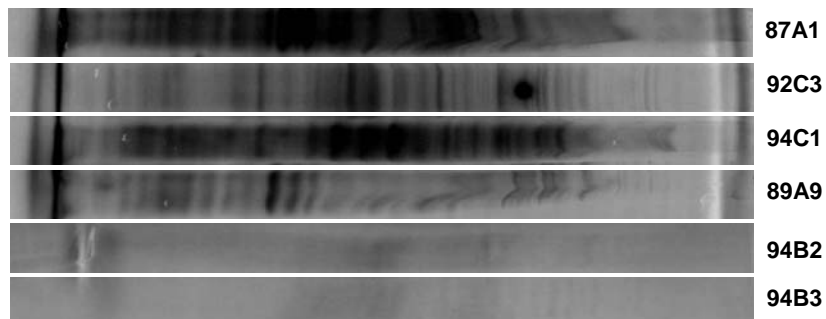


FIGURA 8 Perfis de proteína celular total, de isolados dos SUT floresta secundária (em estágio avançado de regeneração) e pastagem, obtidas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

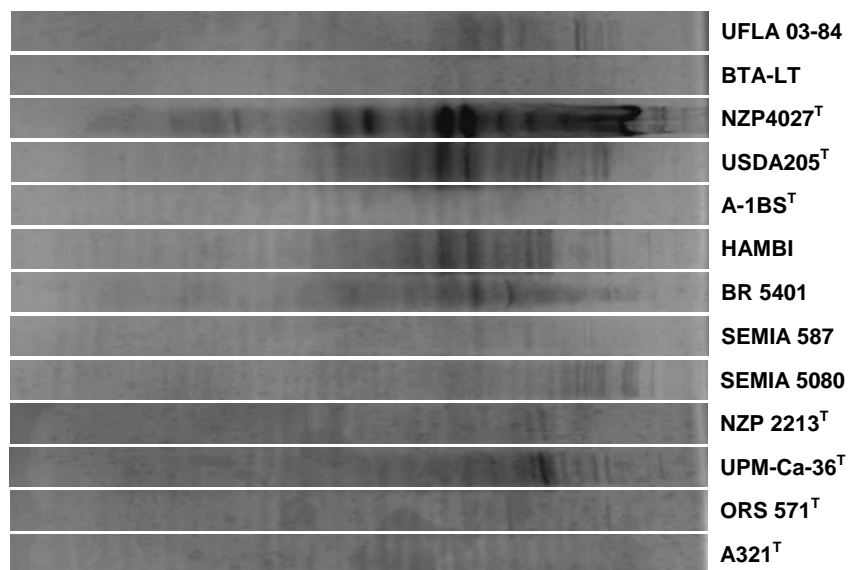


FIGURA 9 Perfis de proteína celular total, de estirpes tipo e de referência, obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). (Continua...)

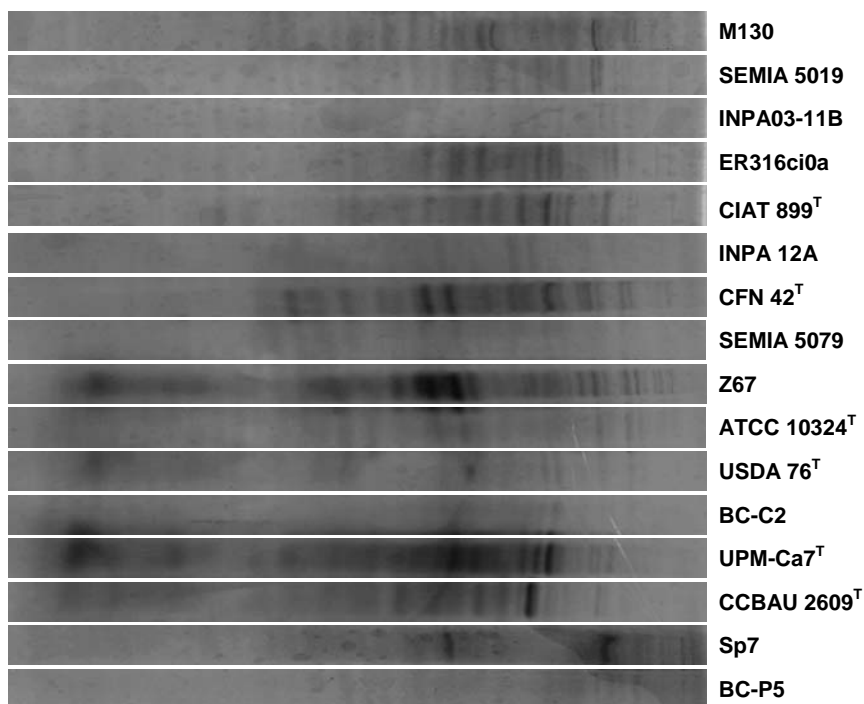


FIGURA 9 Perfis de proteína celular total, de estirpes tipo e de referência, obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).

4.4 Índices de diversidade

Os índices de diversidade de Shannon (figura 10) e o índice Chao1 (figura 11), usados para estimativas de riqueza, foram utilizados. Realizou-se também uma análise de rarefação (figura 12) visando à comparação entre as duas áreas, visto que o número de isolados obtidos em cada uma delas (tamanho da amostra) foi diferente. As curvas de coleta (figura 13) para os mesmos índices foram calculadas para estimar os índices de diversidade e riqueza. Os resultados indicam que a diversidade e a riqueza são similares para as duas áreas estudadas.

As curvas de rarefação com o índice de Shannon quase atingiram o platô (assíntota). Isso significa que se mais isolados fossem amostrados, o valor do

índice mudaria. Deste modo, mais isolados teriam que ser coletados para que uma boa estimativa da diversidade fosse realizada. Contudo, isso não impede que as comunidades sejam comparadas. As curvas para as comunidades das duas áreas se sobrepõem, indicando que a diversidade é similar.

As curvas de acumulação de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) também não atingiram a assíntota; pelo contrário, elas sobem continuamente, mostrando que a riqueza de UTOs seria subestimada. Por isso, utilizou-se o índice de Chao1 para fazer uma estimativa da diversidade.

Há 218 e 634 UTOs nas áreas de pastagem e floresta secundária em estágio avançado de regeneração, respectivamente, de acordo com o índice de Chao1. Embora a estimativa seja bem maior para floresta secundária em estágio avançado de regeneração, os intervalos de confiança se sobrepuseram, indicando que essa diferença não é significativa.

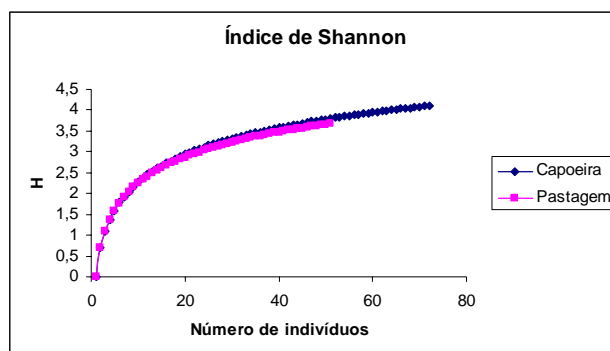


FIGURA 10 Índice de diversidade de bactérias que nodulam caupi de dois SUTs na Amazônia Ocidental.

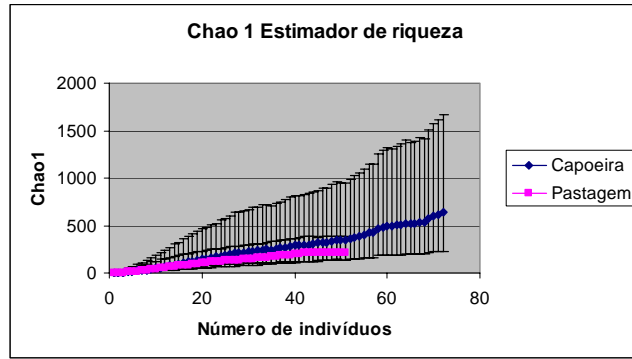


FIGURA 11 Estimador de riqueza de dois SUTs na Amazônia Ocidental.

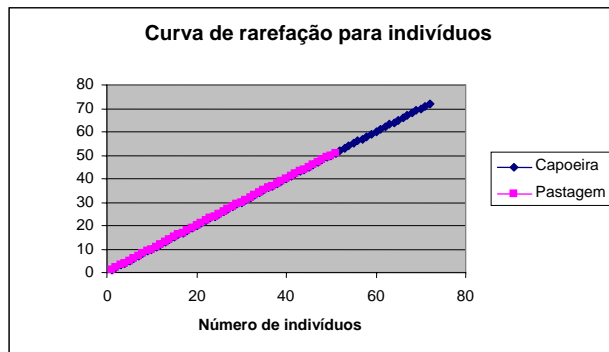


FIGURA 12 Curva de rarefação para indivíduos de dois SUT na Amazônia Ocidental.

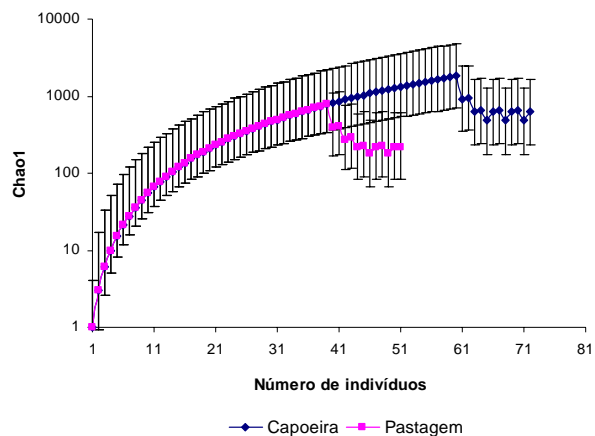


FIGURA 13 Curva de coleta de dois SUTs na Amazônia Ocidental.

TABELA 1 Índices de grupos fenotípicos de bactérias isoladas de caupi que nodulam e fixam nitrogênio.

Índices	C ⁽¹⁾	P ⁽²⁾
Singletons	59	38
Uniques	59	38

⁽¹⁾capoeira (C). ⁽²⁾Pastagem (P).

O número de Singletons (grupos com apenas um indivíduo) foi maior na capoeira, com 59 grupos com apenas um indivíduo, e menor na pastagem, com 38 grupos contendo apenas um isolado. A capoeira também obteve a maior quantidade de Uniques (grupos que ocorrem em apenas uma amostra). O número de uniques, tanto para capoeira quanto para pastagem, foi igual ao número de singletons.

4.5 Caracterização cultural X Caracterização por proteínas totais (SDS-PAGE)

Analisando os isolados dos dois sistemas de uso da terra verificar-se-á, em ambas as análises, que o número de grupos formados foi bem próximo, o que pode ser comprovado por meio da curva de acumulação do índice de Shannon (H'), (Figura 14), construída com os grupos culturais formados nos dendogramas e com os perfis de proteína total.

Deste modo, com a análise de características culturais bem detalhadas, pode-se ter uma indicação da diversidade e riqueza dos isolados de bactérias que nodulam leguminosas, sendo este, portanto, um bom método quando se trabalha com um número muito grande de isolados, como é o caso deste estudo, o que corrobora o encontrado por Nóbrega (2006) analisando 114 isolados pelo método de proteínas totais e características culturais em diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental.

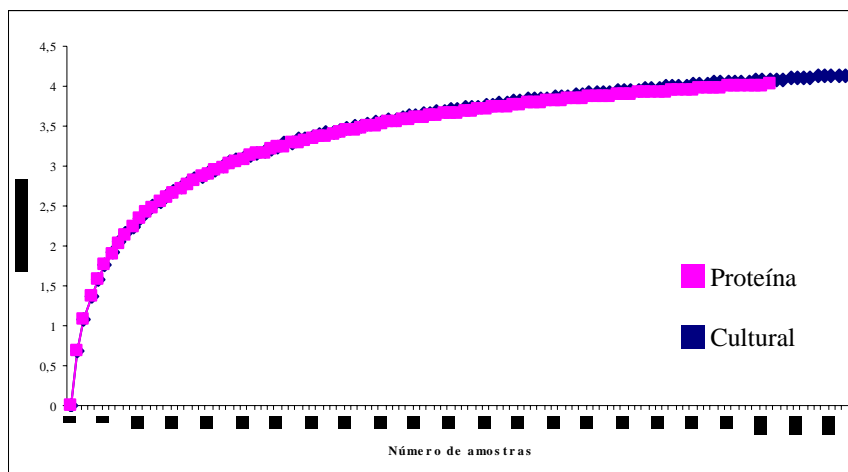


FIGURA 14 Variação do índice de Shannon (H') em função de isolados dos SUT floresta secundária (em estágio avançado de regeneração) e pastagem analisados através do perfil de proteínas totais, e também pela análise cultural.

4.6 Amplificação e sequenciamento parcial do gene 16S do DNA ribossomal

Sessenta e seis isolados referentes aos SUT floresta secundária (em estágio avançado de regeneração) e pastagem foram sequenciados. A sequência do gene 16S rDNA mais similar a destes isolados foi pesquisada no Gen Bank. Dezesete isolados tiveram seqüências similares ao gênero *Bradyrhizobium*. Destes, os isolados 37B5, 60B2, 37B1, 37B10, 37B8, 37B12, 71AB9 são pertencentes ao SUT floresta secundária e os isolados 96A4, 84A3, 83C4, 84A8, 87B9, 87A6, 83B3, 87A3, 84A4 e 96A3 ao SUT pastagem. Este gênero foi predominante em similaridade nas seqüências submetidas ao banco de dados Gen Bank. Este gênero, classificado como α -Proteobactérias, é bem conhecido em simbiose com leguminosas .

Os isolados 90C6, 23B1, 23A2, 81AC9(A) e 88AB7 do SUT floresta secundária, e 87B8, 83C2, 86C2, 84A1 do SUT pastagem tiveram suas sequências similares ao gênero *Enterobacter*, classificado como γ -Proteobactérias. Nove isolados tiveram suas sequências similares ao gênero *Pseudomonas sp.*, sendo que os isolados 88AB8, 71AC1, 23C4, 81AC2 e 37B4 pertencem ao SUT floresta secundária e os isolados 94B2, 95B9, 95C3 e 95B5, ao SUT pastagem. Este gênero pertence à classe γ -Proteobactérias. Outros dois isolados tiveram suas sequências similares ao gênero *Stenotrophomonas* cuja classe também é γ -Proteobactérias. São eles os isolados 23A5 e 81AC9(A) (SUT floresta secundária). De acordo com Teixeira et al. (2005) em estudo sobre ocorrência de bactérias diazotróficas endofíticas na mandioca (*Manihot esculenta* Grantz) três espécies do gênero *Enterobacter* apresentaram amplicons para o gene *nifH* (*E. cancerogenus*, *E. hormaechei* e *E. agglomerans*), sendo este gênero citado como diazotrófico em diferentes espécies de plantas. Duas espécies do gênero *Pseudomonas* (*P. rhodesiae* e *P. fluorescens*) apresentaram também o gene *nifH*. Várias estirpes classificadas como *Pseudomonas* spp. são relatadas na literatura como diazotróficas. O gene *nifH* foi também encontrado por Teixeira et al. (2005) em dois isolados de *Stenotrophomonas maltophilia*, os quais verificaram que algumas bactérias que não foram capazes de crescer em meio de cultura livre de nitrogênio apresentaram reação de PCR positiva para o gene *nifH*. Isto ocorreu com bactérias do gênero *Enterobacter* e *Pseudomonas*.

Ao gênero *Pantoea* seis isolados apresentaram sequências similares, sendo eles: 71AC5, 88AB3, 81B9, 81AA3 e 88C7, pertencentes ao SUT floresta secundária, e 95B1 pertencente ao SUT pastagem. Ao gênero *Citrobacter* o isolado 81AC10 (SUT floresta secundária) teve sua sequência similar. Os gêneros *Pantoea* e *Citrobacter* pertencem à classe γ -Proteobacteria. Segundo Magnani (2005), verificando a diversidade bacteriana endofítica de colmo e folha de cana-de-açúcar utilizando métodos bioquímicos e moleculares,

encontrou representantes dos gêneros *Pantoea* e um provável *Citrobacter* estes mostrando-se com potencial para promoção de crescimento vegetal e fixação de nitrogênio.

Os isolados 71AB8 (SUT floresta secundária) e 94B11 (SUT pastagem) tiveram suas seqüências similares ao gênero *Rhizobium*; este gênero pertence á classe α -Proteobactérias. A capacidade de leguminosas como o caupi de fixarem nitrogênio atmosférico em associação com bactérias como, por exemplo, do gênero *Rhizobium*, são bastante relatadas na literatura no processo de fixação biológica de N² como podendo substituir os adubos minerais no fornecimento de N para várias culturas de interesse comercial.

Ao gênero *Paenibacillus* os isolados 86C10 (SUT pastagem) e 71AC6 (SUT floresta secundária) tiveram seqüências similares. Este gênero pertence à classe Firmicutes. Estudos de isolamento e caracterização de genes envolvidos na captação de sideróforos em linhagens de *Paenibacillus* fixadoras de nitrogênio, relatam que muitas espécies do gênero *Paenibacillus* são bactérias promotoras de crescimento vegetal, pois agem como fixadoras de nitrogênio, produtoras de fito hormônios e de antibióticos, podendo ser bons candidatos a inoculantes de lavouras. Tais estudos também demonstraram que diferentes linhagens de *Paenibacillus* fixadoras de nitrogênio produzem sideróforos.

Os isolados 92B7 do SUT pastagem e 88AB10(A) do SUT floresta secundária tiveram suas seqüências similares ao gênero *Burkholderia* que pertence à classe β - Proteobactérias. A inoculação com *Burkholderia* foi capaz de promover aumentos na produção de milho (Riggs et al., 2001) e feijão (Peix et al., 2001). O isolado 71AB7 (SUT floresta secundária) teve sua seqüência similar ao gênero *Streptomyces* pertencente á classe Firmicutes (Actinobactéria-actinomicetos). O grupo actinomicetos constitui uma proporção considerável dos microrganismos do solo. Dentro deste grupo, o gênero *Streptomyces* é o de maior interesse comercial, sendo que mais de 70% antibióticos processados

industrialmente são produzidos por exemplares deste gênero. Não há, na literatura, relato deste gênero em fixação biológica de N². O isolado 87B5 (SUT pastagem) teve a sua seqüência similar ao gênero *Chryseobacterium* que pertence à família dos Firmicutes. Queiroz (2006), em visualização *in vitro* da colonização de raízes por rizobactérias, constatou a presença do gênero *Chryseobacterium* obtido da rizosfera de feijoeiro, cenoura e citros.

Já o isolado 96C2 (SUT pastagem) teve sua seqüência similar ao gênero *Achromobacter*, este gênero pertence à classe dos Firmicutes é um patógeno humano responsável por causar infecção neonatal. Não há, na literatura, relato deste gênero em fixação biológica de N². Um isolado (23B2) do SUT floresta secundária teve a sua seqüência similar ao gênero *Desulfovibrio* que pertence à classe Δ -Proteobactéria. Este gênero têm a capacidade de utilizar o enxofre presente em hidrocarbonetos poliaromáticos. O isolado 94B7 (SUT pastagem) teve sua seqüência similar ao gênero *Chitinophaga*, que pertence à classe α -Proteobacteria. Não, há na literatura, relato deste gênero em fixação biológica de N². O isolado 37C1 (SUT floresta secundária) teve a sua seqüência similar ao gênero *Staphylococcus*, que pertence à classe Firmicutes. Este é um dos gêneros patogênicos mais virulento e comum, juntamente com a *Escherichia coli*. Os isolados 37B7, 88A10, 37B11, 81AC7, 71AC3, 60B1 e 88AB4 (SUT floresta secundária) tiveram suas seqüências similares a uma bactéria referida como “Uncultured bacterium”.

TABELA 2 Sequência mais similar encontrada no Gen Bank em relação à sequência parcial do gene 16S rDNA de cada isolado oriundo do Sut floresta secundária (em estágio avançado de regeneração) ou pastagem na Amazônia Ocidental.

Isolados	GenBank*	Nº bases sequenciadas ¹	Identidade (B.D/S.I) ²	Similaridade (%)	Nº de acesso NCBI*
87B5	<i>Chryseobacterium</i> sp. 124NP21	851	775/792	97%	AB242684
96C2	<i>Achromobacter xylooxidans</i> strain B8L	855	834/834	100%	DQ466568
71AB8	<i>Rhizobium</i> sp. CCBAU 33107	851	824/827	99%	DQ993274
71AB7	<i>Streptomyces ambofaciens</i> ATCC 23877	875	21/21	100%	AM238663
95C3	<i>Pseudomonadaceae</i> bacterium KVD-unk-78	851	832/832	100%	DQ490324
88AB8	<i>Pseudomonas</i> sp. H9zhy	848	830/833	99%	AM410625
81AB10	Uncultured gamma proteobacterium clone CLi21	853	833/834	99%	AF529319
90C6	<i>Enterobacter</i> sp. FMB-1	845	813/813	100%	DQ855282
71AB6	<i>Bacterium</i> PSB-1-33	846	820/820	100%	AY822567
96A4	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> strain S 127	845	827/827	100%	DQ485704
37B7	Uncultured bacterium clone E2aB09	852	827/827	100%	DQ103610
3B1	<i>Enterobacter</i> sp. FMB-1	847	818/818	100%	DQ855282
71AC5	<i>Pantoea agglomerans</i> strain Sc-4	849	812/832	97%	AY924376
94B7	<i>Chitinophaga</i> sp. KP01	845	812/825	98%	AB278570
71AC1	<i>Pseudomonas</i> sp. PHLL 16S	848	832/832	100%	DQ192539

Continua...

Continua...					
95B1	<i>Pantoea sp.</i>	849	800/800	100%	DQ512489
84A3	<i>Bradyrhizobium elkanii strain CCBAU 53142</i>	853	836/836	100%	EF394150
83C4	<i>Bradyrhizobium yuanmingense strain CCBAU 53119</i>	850	835/835	100%	EF394145
90A8	<i>Bacterium PSB-1-33</i>	861	754/798	94%	AY822567
84A8	<i>Bradyrhizobium elkanii strain CCBAU 53142</i>	853	834/834	100%	EF394150
84A1	<i>Enterobacter sp. MACL08B</i>	848	824/826	99%	EF198245
23C4	<i>Pseudomonas sp.</i>	848	826/831	99%	AM410625
88AB3	<i>Pantoea agglomerans strain XW123</i>	858	828/829	99%	AY941838
81B9	<i>Pantoea agglomerans strain XW123</i>	851	830/832	99%	AY941838
88A10	Uncultured bacterium clone PNAOKL1C08	823	90/106	87%	AY938554
87B9	<i>Bradyrhizobium sp. CCBAU</i>	849	820/821	99%	DQ222225
87A6	<i>Bradyrhizobium elkanii strain CCBAU 53142</i>	848	823/824	99%	EF394150
87B8	<i>Enterobacter sp. MACL08B</i>	836	757/796	95%	EF198245
86C10	<i>Paenibacillus sp. DS-1</i>	848	824/828	99%	AB042938
23A2	<i>Enterobacter sp. MACL08B</i>	844	768/814	94%	EF198245
37C1	<i>Staphylococcus sp.</i>	851	833/834	99%	EF012765
37B5	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	857	826/828	99%	AJ785289
83B3	<i>Bradyrhizobium elkanii strain</i>	853	829/835	99%	DQ485704
71AC6	<i>Paenibacillus sp.</i>	847	808/824	98%	AY518675
94B11	<i>Rhizobium tropici</i>	765	330/371	88%	EF054890
Continua...					

Continua...					
92B7	<i>Burkholderia sp</i>	847	826/829	99%	AY839565
83C2	<i>Enterobacter aerogenes strain HK 20-1</i>	849	719/822	87%	AY335554
37B11	Uncultured bacterium clone 33-PA27B98	816	142/176	87%	AF469363
86C2	<i>Enterobacter sp. MACL08B</i>	829	798/807	98%	EF198245
95B5	<i>Pseudomonas sp.</i>	848	827/829	99%	AM410625
81AC2	<i>Pseudomonas sp.</i>	838	725/773	93%	EF419337
81AC7	Uncultured bacterium clone 1-65	863	26/26	100%	EF040510
81AA3	<i>Pantoea ananatis strain 3Pe76</i>	837	702/774	90%	EF178449
87A3	<i>Bradyrhizobium elkamii</i>	826	800/811	98%	AF239846
60B2	<i>Bradyrhizobium genosp.</i>	852	832/833	99%	AJ810378
94B2	<i>Pseudomonas sp.</i>	833	624/729	85%	AY303257
23A5	<i>Stenotrophomonas as sp.</i>	846	251/295	85%	DQ129696
81AC9 (B)	<i>Stenotrophomonas as sp.</i>	846	533/640	83%	EF221778
95B9	<i>Pseudomonas sp.</i>	850	829/832	99%	AM410625
81AC10	<i>Citrobacter gillienii strain P9</i>	839	621/749	82%	DQ223881
37B1	<i>Bradyrhizobium genosp.</i>	837	765/777	98%	AJ785289
88C7	<i>Pantoea agglomerans strain XW123</i>	848	806/827	96%	AY941838
37B4	<i>Pseudomonas sp.</i>	849	818/822	99%	AY014817
88AB10 (A)	<i>Burkholderia sp.</i>	823	656/660	98%	DQ777739
81AC9 (A)	<i>Enterobacter cloacae</i>	843	792/816	97%	EF120473

Continua...

Continua...					
88AB7	<i>Enterobacter cloacae</i>	843	813/829	98%	EF120473
71AC3	Uncultured gamma proteobacterium clone CLi21	846	825/829	99%	AF529319
23B2	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> G20	944	23/23	100%	CP000112
37B10	<i>Bradyrhizobium</i> <i>genosp.</i>	850	819/819	100%	AJ785289
37B8	<i>Bradyrhizobium</i> <i>genosp.</i>	850	830/830	100%	AJ785289
37B12	<i>Bradyrhizobium</i> <i>genosp.</i>	834	593/612	96%	AJ785289
84A4	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> strain	821	761/779	97%	EF394150
96A3	<i>Bradyrhizobium elkanii</i> strain	835	804/812	99%	EF394150
71AB9	<i>Bradyrhizobium</i> <i>genosp.</i>	837	293/323	90%	AJ785289
60B1	Uncultured bacterium	848	90/106	84%	DQ131845
88AB4	Uncultured bacterium clone GO117.36	813	34/37	91%	AY512272

*NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) consultado em 19/03/2007; ¹ F e R – oligonucleotídeo iniciador “forward” e “reverse”; ² B.D/S.I – Banco de dados/Seqüência dos isolados. **n.s. – não significativo com nenhuma seqüência depositada no GenBank.

5 CONCLUSÕES

Existem populações com eficiência variável de bactérias nodulíferas de caupi nos dois sistemas de uso da terra (SUT) estudados.

O sistema de uso da terra pastagem apresentou maior porcentagem de isolados eficientes (20,12%) do que o sistema de uso da terra floresta secundária em estágio avançado de regeneração (13,93%).

Os grupos de eficiência, em sua maioria, são compostos por isolados de crescimento lento, sendo 58,82% no SUT floresta secundária (em estágio avançado de regeneração) e 74,41% no SUT pastagem.

Observou-se grande diversidade fenotípica com base nos perfis de proteína total nos dois SUT, apresentando também alta diversidade e alta riqueza através dos índices estudados.

A caracterização cultural pode ser utilizada para estimar a diversidade de bactérias que nodulam leguminosas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, J. M. et al. **Aplicação foliar de molibidênio em caupi (vigna unguiculata (L.) WALP)**. Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida, 2002. Universidade Fed. Rural do Rio de Janeiro.

ALVES, L.; MESQUITA, E.; GINO, F. M. Dessulfurização bacteriana de combustíveis fósseis. **Boletim de Biotecnologia**, n.62, p.1-8, abr. 1999.

ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R.; CARVALHO, E. M. S. Effect of composted textile sludge on growth, nodulation and nitrogen fixation of soybean and cowpea. **Science Direct**, p.1028-1032, June 2006.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.77, n.3, p.549-579, 2005.

BENDING, G. D. et al. Microbial and biochemical soil quality indicators and their potential for differentiating areas under contrasting agricultural management regimes. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.36, n.11, p.1785-1792, Nov. 2004.

BERG, G.; EBERL, L.; HARTMANN, A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. **Environmental Microbiology**, v.7, n.11, p.1673-1685, 2005.

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**, Whashington, v.63, n.7, p.2647-2653, July 1997.

BRASIL, M. S.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Ocorrência e diversidade de bactérias diazotróficas associadas a gramíneas forrageiras do pantanal sul matogrossense. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.29, p.179-190, 2005.

BRITO, M. de M. P. **Marcha de absorção do nitrogênio do solo, do fertilizante e da fixação simbiótica em caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) e feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) determinada usando ¹⁵N.** 1992. 197p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP.

CARTER, M. R. Soil quality for sustainable land management: organic matter and aggregation interactions that maintain soil functions. **Agronomy Journal**, Madison, v.94, n.1, p.38-47, Jan./Feb. 2002.

CATTELAN, A. J. **Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associados com bactérias promotoras do crescimento vegetal.** Londrina: Embrapa Soja, 1999. 36p. (Embrapa Soja. Documentos, 139).

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

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

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

CORDEIRO, L. G. et al. Fator de sensibilidade ao déficit hídrico da cultura do feijão caupi (*vigna unguiculata* (L.) WALP.). **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, PB, v.2, n.2, p.153-157, 1998.

COSTA, P. B. et al. **Isolamento e caracterização de genes envolvidos na captação de sideróforos em linhagens de *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio.** Porto Alegre: UFRGS, 2006. p.119-172. (Sessão 37, Microbiologia B, Ciências Biológicas, 330).

DE-POLLI, H.; FRANCO, A. A. **I inoculação de sementes de leguminosas.** Seropédica: Embrapa-UAPNPBS, 1985. 31p. (Circular Técnica, 1).

DREYFUS, B.; GARCIA, J. L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., a Stem-Nodulating Nitrogen-Fixing Bacterium Isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.38, n.1, p.89-98, Jan. 1988.

DUPUY, N. et al. Phenotypic and genotypic characterization of bradyrhizobia nodulating the leguminous tree *Acacia albida*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.44, n.3, p.461-473, July 1994.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Atlas do meio ambiente do Brasil**. Brasília, 1994.

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

ESPÍNDOLA, J. A. A.; GUERRA, J. G. M.; ALMEIDA, D. L. **Adubação verde: estratégia para uma agricultura sustentável**. Seropédica: Embrapa – Agrobiologia, 1997. 20p. (Embrapa – CNPAB. Documentos, 42).

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. 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,

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M., HUNGRIA, M. Seleção de rizóbios nativos para guandu, caupi e feijão de porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n.7, p.835-842, jul. 2003.

FERREIRA, D. F. Análises estatística por meio do SISVAR (Sistema para análise de variância) para Windows 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.

FIDALGO, E. C. C. et al. **Levantamento do uso e cobertura da terra de seis áreas amostrais relacionadas ao projeto “Conservation and sustainable management of below-ground biodiversity: Phase 1”**, Município de Benjamin Constant (AM). Seropédica: Embrapa, 2005. Apostila.

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

FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; BARRETO, P. D.; SANTOS, C. A. **Melhoramento genético do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) na região do Nordeste.** In: WORKSHOP, 1998. [S. 1.]: EMBRAPA Semi-Árido, 1998.

ISLAN, R.; AYANABA, A. Effects of seed inoculation and pre-infecting cowpea (*Vigna unguiculata*) with *Glomus mosseae* on growth and seed yield of the plants under field conditions. **Plant and Soil**, Hague, v. 61, n. 3, p. 341-350, 1981.

JACKMAN, P. J. H. Bacterial Taxonomy based on Eletrophoretic whole-cell Protein Patterns. In: GOODFELLOW, M.; MINNIKIN, D. (Ed.). **Chemical methods in bacterial systematics**. London: Academic, 1985. p.119-129.

GWATA, E. T.; WOFFORD, D. S.; BOOTE, K. J.; BLOUNT, A. R.; PFAHLER, P. L. Inheritance of promiscuous nodulation in soybean. **Crop Science**, v.45, Mar./Apr. 2005.

GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K.; MATHAN, N.; REDDY, P. M.; REINHOLD-HUREK, B.; LADHA, J. Endophytic colonization of rice by diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.2634-2645, 2001.

HILL, T. C. J.; WALSH, K. A.; HARRIS, J. A.; MOFFETT, B. F. Using ecological diversity measures with bacterial communities. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.43, n.1, p.1-11, Feb. 2003.

HUGHES, J. B.; HELLMANN, J. J.; RICKETS, T. H. Counting the Unncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. **American Society for Microbiology**, v.67, n.10, p.4399-4406, 2001.

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

JACKMAN, P. J. H. Bacterial taxonomy base don eletrophoretic whole-cell protein patterns. In: GOODFELLOW, M.; MINNIKIN, D. (Ed.) **Chemical Methods in Bacterial Systematics**. London: Academic, 1985. p. 119-129.

J. C.; MICHELSEN, P.; O' BRIEN, K. A.; GUPTA, V. V. S. R.; DOUBE, B. M. Evaluation of soil biological properties as potential bioindicators of soil health. **Australia Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v.35, n.7, p.1015-1028, 1995.

- JESUS, E. C. et al. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.8, p.769-776, ago. 2004.
- JUNIOR, M. L.; SOUZA, J. N. G.; SANTOS, A. B. **Processos biológicos e densidade de microrganismos em solo de várzea tropical cultivado com forrageiras para implantação do arroz no sistema plantio direto**. Santo Antônio de Goiás, GO: 2004. (Comunicado Técnico, 89).
- KAMPFER, P. et al. Differentiation of *Brevibacterium* species by eletrophoretic proteins-patterns. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.17, n.4, p.533-534, Feb. 1995.
- KENNEDY, A. C.; PAPENDICK, R. I. Microbial characteristics of soil quality. **Journal of Soil and Water Conservation**, Ankeny, n.3, p.243-248, May/June 1995.
- KENNEDY, I. V.; CHOUDHURY, A. T. M. A.; KECSKÉS, M. L. on-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited? **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.36, n.8, p.1229-1244, Aug. 2004.
- LACERDA, A. M. et al. Efeito de Estirpes de rizóbio sobre a Nodulação e produtividade do Feijão-Caupi **Revista CERES** Viçosa, v.51, n.293, p.67-82, 2004
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.27, p.680-685, 1970.
- LAJUDIE, P. de. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v.48, n.2, p.369-382, Apr. 1998.
- LEWIN, A. et al. Multiple host-specificity loci of the broad host-range *Rhizobium* sp. NGR234 selected using the widely compatible legume *Vigna unguiculata*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.8, n.6, p.447-459, 1987.
- 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.

MAGALHÃES, F. M. M.; DÖBEREINER, J. Ocorrência de *Azospirillum amazonense* em alguns ecossistemas da Amazônia. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.15, n.4, p.246-252, 1984.

MAGALHÃES, F. M. et al. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. **Academia Brasileira de Ciência**, Rio de Janeiro, v.55, n.4, p.417-430, 1983.

MAGALHÃES, F.M.M. O estado atual do conhecimento sobre fixação biológica de nitrogênio na Amazônia. In: SIMPÓSIO DO TRÓPICO ÚMIDO, 1., 1984, Belém. **Anais...** Belém: MA/EMBRAPA/CPATU, 1986. p.499-512.

MAGNANI, G. S. **Diversidade de bactérias endofíticas em cana de açúcar**. 2005. 93p. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal do Paraná. Curitiba.

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

MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMAJANEK, N. G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, n.5/6, p.1005-1110, May/June 1997.

MATSUYAMA, T.; BHASIN, A.; HARSHEY, R. M. Mutational analysis of flagellum-independent surface spreading of *Serratia marcescens* 274 on a low-agar medium. **Journal of Bacteriology**, v.177, n.4, p.987-991, 1995.

MELLONI, R. et al. Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxita, em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.28, n.1, p.85-93, 2004.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Biodiversidade brasileira**. Brasília, 2002.

MOREIRA, F. M. S. et al. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative polyacrilamide gel electrophoresis of their total proteins. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 16, n. 1, p. 135-146, Apr. 1992.

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

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002. 625p.

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

MOREIRA, F. M. S.; TIEDJE, J.; MARSH, T. L. *Burkholderia* spp. Are among fast growing symbiotic diazotrophs isolated from diverse land use systems in Amazônia and from Brazilian leguminosae forest species. In: REUNIÓN LATINOAMERICANA DE RHIZOBIOLÓGÍA, 21., CONGRESO NACIONAL DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO, 6., 2002, Cocoyoc. **Memorias...** Cocoyoc, México, 2002. v. 01., p. 45-46.

MOULIN, L. et al. Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. **Nature**, v.411, n.21, p.948-950, June 2001.

NEVES, M. C. P. et al. **Levantamento de estirpes de rizóbio capazes de nodular caupi (vigna unguiculata) em solos do nordeste do Brasil. III. Agreste**. Seropédica: Embrapa - Agrobiologia, 1998. 7p.

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

NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; LIMA, A. S. Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.28, n.2, p.269-279, 2004.

NUNES, L. N. et al. **Composição química de grãos verdes de genótipos de feijão caupi**. Terezina: EMBRAPA Meio Norte, 2006.

OLIVEIRA, A. N. et al. Atividade enzimática de isolados de rizóbia nativos da Amazônia central crescendo em diferentes níveis de acidez. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.1, p.204-210, jan./ mar. 2006.

OLIVEIRA, I. P.; CARVALHO, A. M. A de. A cultura do caupi nas condições de clima e solo dos trópicos úmidos e semi-áridos do Brasil. In: ARAÚJO, J. P. de; WATT, E. A. (Org.). **O caupi no Brasil**. Brasília: IITA/EMBRAPA, 1988. p.65-95.

OLIVEIRA, L. A.; MOREIRA, F. W.; MOREIRA, F. M. S. Ocorrência de microrganismos benéficos em ecossistemas amazônicos. In: _____. **Vinte anos de contribuição do INPA à pesquisa agrônômica no trópico úmido**. [S. l.]: INPA, 1996. p.179-192.

PANKHURT, C. E. et al. Evaluation of soil biological properties as potential bioindicators of soil health. **Australia Journal of Experimental Agriculture**, Melbourne, v.35, n.7, p.1015-1028, 1995.

PEIX, A. et al. Growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a strain of *Burkholderia cepacia* under growth chamber conditions. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.33, p.1927-1935, 2001.

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

PIMENTEL, C.; HERBERT, G. Potencial fotossintético e condutância estomática em espécies de feijão caupi sob deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, n.1, p.7-11, 1999.

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

QUEIROZ, B. P. V.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; MELO, I. S. Visualização in vitro da colonização de raízes. **Summa Phytopathol.**, Botucatu, v.32, n.1, Jan./Mar. 2006.

RICKLEFS, R. E. **A economia da natureza**. Rio de Janeiro, Guanabara koogan. 1993

RIGGS, P. J. et al. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.28, p.829-836, 2001.

SANTOS, C. A. F.; ARAÚJO, F. P.; MENEZES, E. A. Comportamento produtivo de caupi em regims irrigado e de sequeiro em Petrolina e Juazeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.11, p.2229-2234, nov. 2000.

SANTOS, C. E.R. S. et al. Efetividade de rizóbios isolados de solos da região Nordeste do Brasil na fixação do N₂ em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). **Acta Science Agronomy**, Maringá, v.27, n.2, p.301-307, Apr./June 2006.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Introducing dour, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **American Society for Microbiology**, v.71, n.3, p.1501-1506, 2005.

SOARES, A.L.L. et al. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). I – Caupi ⁽¹⁾ **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.30, p.795-802, 2006.

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

TATE III, R. L.; KLEIN, D. A. (Ed.). **Soil reclamation processes: microbiological analyses and applications**. New York: M. Decker, 1985. 349p.

TEIXEIRA, S. M.; MAY, P. H.; SANTANA, A. C. de. Produção e importância econômica do caupi no Brasil. In: ARAÚJO, J. P. P. de.; WATT, E. E.(Org). **O caupi no Brasil**. Brasília: IITA/EMBRAPA, 1988. p.99-136.

TEIXEIRA, M.A.; MELO,I.S.; VIEIRA, R.F. **Ocorrência de bactérias diazotróficas endofíticas na mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)**. Jaguariúna, SP, 2005. p.1-20. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 34).

TRIPATHI, A. K.; VERMA, S. C.; RON, E. Z. Molecular characterization of salt-tolerant bacterial community in the rice rhizosphere. **Research in Microbiology**, Paris, v.153, n.9, p.579-584, Nov. 2002.

VANDAMME, P. et al. Intra and interspecific relationships of veterinary campilobacters revealed by numerical analysis of electrophoretic protein profiles and DND: DNA hybridizations. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.13, n.3, p.295-303, Aug. 1990.

VIEIRA, R. F. **Comparações de feijões dos gêneros *Vigna* e *Phaseolus* com feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.)** 1989. 213 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

VINUESA, P.; SILVA, C.; DIETRICH, W.; MARTÍNEZ - ROMERO, E.
Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 34 (2005). 29-54

WEISBURG, W. G. et al. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, v.173, p.697-703, Jan. 1991.

WILLEMS, A. et al. AFLP fingerprint analysis of *Bradyrhizobium* strains isolated from *Faidherbia albida* and *Aeschynomene* species. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart v.23, n.1, p.137-147, Apr. 2000.

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

WOOMER, A. N.; SINGLETON, P. W.; BOHLOOL, B. B. Ecological indicators of native rhizobia in tropical soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, n.7, p.1112-1116, July 1988.

ZILLI J.E. et al. **Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solo do Cerrado em caupi.** Roraima: Embrapa Roraima, 2005.

ZILLI J.E. et al. 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.

ANEXOS

ANEXO A	Página
Tabela 1A Quadro de análise de variância avaliando valores de MSPA em caupi inoculado com bactérias diazotróficas provenientes do SUT capoeira (Variável sem transformação).....	79
Tabela 2A Quadro de análise de variância avaliando valores de MSN em caupi inoculado com bactérias diazotróficas provenientes do SUT capoeira (Variável sem transformação).....	79
Tabela 3A Quadro de análise de variância avaliando valores de MSN em caupi inoculado com bactérias diazotróficas provenientes do SUT capoeira (Variável com transformação: Raiz quadrada de $y + 1$).....	79
Tabela 4A Quadro de análise de variância avaliando valores de NN em caupi inoculado com bactérias diazotróficas provenientes do SUT capoeira (Variável sem transformação).....	80
Tabela 5A Quadro de análise de variância avaliando valores de NN em caupi inoculado com bactérias diazotróficas provenientes do SUT capoeira (Variável com transformação: Raiz quadrada de $y + 1$).....	80
Tabela 6A Quadro de análise de variância avaliando valores de EFR em caupi inoculado com bactérias diazotróficas provenientes do SUT capoeira (Variável sem transformação).....	80
Tabela 7A Quadro de análise de variância avaliando valores de MSPA em caupi inoculado com bactérias diazotróficas provenientes do SUT pastagem (Variável sem transformação).....	81

Tabela 8A Quadro de análise de variância avaliando valores de NN em caupi inoculado com bactérias diazotróficas provenientes do SUT pastagem (Variável sem transformação).....	81
Tabela 9A Quadro de análise de variância avaliando valores de NN em caupi inoculado com bactérias diazotróficas provenientes do SUT pastagem (Variável com transformação: Raiz quadrada de y +1)...	81
Tabela 10A Quadro de análise de variância avaliando valores de MSN em caupi inoculado com bactérias diazotróficas provenientes do SUT pastagem (Variável sem transformação).....	82
Tabela 11A Quadro de análise de variância avaliando valores de MSN em caupi inoculado com bactérias diazotróficas provenientes do SUT pastagem (Variável com transformação: Raiz quadrada de y +1).....	82
Tabela 12A Quadro de análise de variância avaliando valores de EFR em caupi inoculado com bactérias diazotróficas provenientes do SUT pastagem (Variável sem transformação).....	82

ANEXO B	Página
1B Composição dos meios de cultura.....	83
2B Protocolo para proteína total SDS-PAGE.....	84
3B Dendrogramas culturais.....	89
4B Valores médios das testemunhas com e sem N.....	92

ANEXO A

Tabela 1A Quadro de análise de variância avaliando valores de MSPA em caupi inoculado com bactérias diazotróficas provenientes do SUT capoeira (Variável sem transformação).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr >Fc
Isolados	125	5,499	0,043	8,923	0,000
Erro	252	1,242	0,004		
Total	377	6,741			

CV =53,70%

Tabela 2A Quadro de análise de variância avaliando valores de MSN em caupi inoculado com bactérias diazotróficas provenientes do SUT capoeira (Variável sem transformação).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr >Fc
Isolados	125	21,270	0,170	1,003	0,4853
Erro	252	42,752	0,169		
Total	377	64,023			

CV =1286,63%

Tabela 3A Quadro de análise de variância avaliando valores de MSN em caupi inoculado com bactérias diazotróficas provenientes do SUT capoeira (Variável com transformação: Raiz quadrada de $y + 1$).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr >Fc
Isolados	125	1,357	0,010	1,017	0,4497
Erro	252	2,690	0,010		
Total	377	4,047			

CV =10,22%

Tabela 4A Quadro de análise de variância avaliando valores de NN em caupi inoculado com bactérias diazotróficas provenientes do SUT capoeira (Variável sem transformação).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr >Fc
Isolados	125	142008,571	1136,068	5,329	0,000
Erro	252	53724,000	231,190		
Total	377	195732,571			

CV =83,10%

Tabela 5A Quadro de análise de variância avaliando valores de NN em caupi inoculado com bactérias diazotróficas provenientes do SUT capoeira (Variável com transformação: Raiz quadrada de y +1).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr >Fc
Isolados	125	2168,028	17,344	8,072	0,000
Erro	252	541,467	2,148		
Total	377	2709,496			

CV =43,41%

Tabela 6A Quadro de análise de variância avaliando valores de EFR em caupi inoculado com bactérias diazotróficas provenientes do SUT capoeira (Variável sem transformação).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr >Fc
Isolados	125	160845,817	1286,766	7,160	0,000
Erro	252	45289,556	179,720		
Total	377	206135,374			

CV =59,90%

Tabela 7A Quadro de análise de variância avaliando valores de MSPA em caupi inoculado com bactérias diazotróficas provenientes do SUT pastagem (Variável sem transformação).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr >Fc
Isolados	161	4,976	0,030	5,879	0,000
Erro	327	1,719	0,005		
Total	488	6,695			

CV =54,51%

Tabela 8A Quadro de análise de variância avaliando valores de NN em caupi inoculado com bactérias diazotróficas provenientes do SUT pastagem (Variável sem transformação).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr >Fc
Isolados	161	104240,380	647,455	6,617	0,000
Erro	327	31998,002	97,853		
Total	488	136238,382			

CV =108,09%

Tabela 9A Quadro de análise de variância avaliando valores de NN em caupi inoculado com bactérias diazotróficas provenientes do SUT pastagem (Variável com transformação: Raiz quadrada de y +1).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr >Fc
Isolados	161	1912,872	11,881	9,948	0,000
Erro	327	390,538	1,194		
Total	488	2303,411			

CV =46,85%

Tabela 10A Quadro de análise de variância avaliando valores de MSN em caupi inoculado com bactérias diazotróficas provenientes do SUT pastagem (Variável sem transformação).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr >Fc
Isolados	161	25132,035	156,099	206,908	0,000
Erro	327	246,702	0,754		
Total	488	25378,737			

CV =107,97%

Tabela 11A Quadro de análise de variância avaliando valores de MSN em caupi inoculado com bactérias diazotróficas provenientes do SUT pastagem (Variável com transformação: Raiz quadrada de y +1).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr >Fc
Isolados	161	298,859	1,856	635,787	0,000
Erro	327	0,954	0,002		
Total	488	299,814			

CV =4,95%

Tabela 12A Quadro de análise de variância avaliando valores de EFR em caupi inoculado com bactérias diazotróficas provenientes do SUT pastagem (Variável sem transformação).

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr >Fc
Isolados	161	149224,512	926,860	4,563	0,000
Erro	327	66427,771	203,143		
Total	488	215652,283			

CV =62,30%

ANEXO B

1B Meios de cultura.

Meio de cultura 79 – YMA (*Fred & Waksman, 1928*).

10 Gr. Manitol ou Sacarose
1 ml sol. K_2HPO_4 (10%)
4 ml sol. KH_2PO_4 (10%)
2 ml sol. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (10%)
1 ml sol. NaCl (10%)
100 ml Extrato de Levedura ou 0,4 gr de Extrato de Levedura em Pó
5 ml sol. 0,5% em 0,2 N de KOH de Azul de Bromotimol
Completar para 1000 ml com Água Destilada
Ph 6,8 – 7,0
Meio Sólido: 15 Gr de Agar
Meio Semi-sólido: 1,75 gr de Agar

Obs.: 1 - Se for utilizado meio com pH 5,0, substituir o azul de bromotimol por Verde de Bromocresol na mesma concentração e colocar 20 gr de Agar.
2 - Manitol é adequado para todos os gêneros. Sacarose é mais indicada para *Rhizobium*.

Meio de cultura TY

Componentes	Quantidade
Tryptitona	5 g
Extrato de Levedura	0.75 g
CaCl ₂ Solução *	5 ml
KH_2PO_4	0.454 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ou $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	2.388 g (P/ 12H ₂ O) ou 1,79 g (p/ 7H ₂ O)
Agar	20 g

Completar para 1 Lt de água destilada.
Ajustar pH 6,8 – 7,8
CaCl₂ Solução autoclavar separada
* CaCl₂·2H₂O 20 g/ 100 ml de H₂O Destilada

2B Protocolo para Análise de Proteína Total por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) de bactérias Gram-negativas (protocolo utilizado do Laboratório de Microbiologia da Universidade de Ghent, Bélgica para estirpes de bactérias que nodulam leguminosas por Moreira et al. (1993). Modificado deste protocolo pela utilização de meio TY líquido em vez de sólido para crescimento das estirpes na etapa 2.2.2b).

EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

- 1) Multiplique a bactéria em meio adequado para o cultivo da espécie sólido, a 28°C, para verificação de pureza.
- 2)
 - a) Repique colônias isoladas para meio TY sólido (pode ser ágar inclinado) duas vezes sucessivas.
 - b) Inocule colônias isoladas em meio TY líquido (50 mL), a 28°C (bactérias de crescimento rápido por 48h e as de crescimento lento por 72 h.), sob agitação constante (120 rpm).
- 3) Centrifugue a 10000 rpm por 10 min., a 4° C.
- 4) Descarte o sobrenadante.
- 5) Lave as células por meio de ressuspensão do “pellet” em 30 mL de tampão NaPBS e faça uma nova centrifugação.
- 6) Descarte sobrenadante e repita a lavagem por mais duas vezes.
- 7) Pese, para cada isolado, as células em tubos Eppendorf limpo. O peso úmido das células deve ser de 70 mg.
- 8) Adicione 0,9 mL do tampão de tratamento da amostra (STB sem SDS) e misture com misturador tipo Vórtex.
- 9) Adicione 0,1 mL de uma solução SDS 20% (dodecil sulfato de sódio) e misture com misturador do tipo Vórtex.
- 10) Aqueça a mistura a 95°C por 10-15 min, esfrie e centrifugue em uma centrífuga Eppendorf (10000 rpm por 8 min)
- 11) Verta o sobrenadante (extrato de proteína) em dois tubos Eppendorf limpos. A parte menor, para uso diário, é armazenada a -20°C e a parte maior, para armazenamento mais longo, a - 80°C por até três anos.

Obs.: Entre os passos 9 e 10, a suspensão bacteriana resfriada pode ser tratada por ultrassom (sonda com ponta tipo agulha - 127 mm, 4mm diâmetro), durante 5 segundos, posição “low”, máximo de 50 W.

PREPARAÇÃO GEL DE SDS-PAGE NAS PLACAS (modificado de Laemmli, 1970).

- A) Preparação do gel de separação de 12%.
- 1) Misture o seguinte em um frasco limpo.

H ₂ O (bidestilada)	13.4 mL
1.5M Tris-HCl, pH 8,8 (tampão do gel de separação)	10.mL
Bis-Acrilamida (solução de monômeros) (30% T; 2,67%C)	16 mL

2) Esquente a mistura acima a aproximadamente 19°C, por aproximadamente 3 min.

3) Adicione o seguinte na mistura:

SDS 10%	0,4 mL
TEMED	20 µL
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ 10% (APS)	0,14 mL

(pH da solução de APS recém-preparada (fresca 1 hora, no máximo) deve estar entre 5-6).

4) Misturar bem (agitando o frasco, erlenmeyer, que contém a solução do gel), e verta 28ml da solução imediatamente entre as placas de vidro. O nível de gel de separação deve ser, aproximadamente, 12,6 cm da base.

5) Colocar o conjunto submerso em banho-maria a 19° C.

6) Cubra com 2ml de isobutanol saturado com água para manter uma condição de anaerobiose e obter uma superfície plana.

7) Deixe polimerizar no banho-maria por 1h a 20° C. Após 1 hora. descarte o isobutanol, lave a superfície do gel com bastante água bidestilada e cubra com 1,6 mL de tampão do gel de separação (diluído 1:4) contendo 0,1% de SDS.

8) Proceder à polimerização por 24 h (ou só durante a noite) em temperatura ambiente (a 20°C).

B - Preparação do gel de empilhamento (concentração) de 5% (pelo menos 1 hora antes de “carregar” o gel).

1) Descarte o líquido sobrenadante e lave com água bidestilada, remova o excesso do líquido virando as placas de cabeça para baixo para escoar.

2) Misture o seguinte em frasco:

H ₂ O (bidestilada)	5,7mL
0,5 M Tris HCl (pH 6.8) (tampão do gel empilhamento)	2,5mL
Bis-Acrilamida (30%T, 2.67%C) solução de monômeros	1,7 mL

3). Esquente a mistura até aproximadamente 19°C por aproximadamente 3 min. em banho maria

4) Adicione o seguinte na mistura:

SDS10%	0.1mL
TEMED	10 µL
(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ 10% (APS)	0,05ml

(pH da solução de APS preparada fresca deveria estar entre 5-6).

Misturar bem com um bastão de vidro.

5) Antes de colocar a solução do gel de empilhamento na superfície do gel de separação, lave a superfície com alguns mL da solução do gel de empilhamento.

6) Aplique a solução do gel de empilhamento (concentração) em cima do gel de separação polimerizado à temperatura ambiente.

7) Insira o pente entre as placas para formar de 15 ou 20 aberturas (poços).

8) Deixe polimerizar à temperatura ambiente por, aproximadamente, 30 min.

9) Remova o pente e preencha as aberturas (poços) com o tampão de empilhamento (1:4) contendo 0,1% de SDS, após e enxaguar 2x com água bidestilada. Espere 30 min.

10). Aplique as amostras de proteína extraída, após encher as aberturas (poços) com tampão de corrida preparado fresco, após lavá-los duas vezes com a mesma solução.

ELETROFORESE DE PROTEÍNA SOLUBILIZADA COM SDS

1) Marque as aberturas com números desejados e aplique extrato de proteína em cada uma das aberturas (poços) usando uma micropipeta. O volume a ser aplicado é em microlitros e depende da concentração do extrato de proteína.

2) O volume final em cada poço é ajustado a 15 μ L (com tampão de tratamento de amostra contendo 0.001% azul de Bromofenol) (linha de corrida) No caso de um extrato de proteína muito diluído, não deve ser aplicado um maior volume. Preencha os poços com tampão de corrida.

Prenda o reservatório superior em cima das placas e remova a parte de baixo (prenda bem os parafusos).

Faça a imersão das placas de gel na cuba cheia com tampão de corrida Tris Glicina (não mais velho que 7 dias). Ligue o banho térmico a 15°C e verifique se as mangueiras não estão dobradas.

Coloque vagarosamente tampão de corrida (tris – glicina SDS) fresco no reservatório superior e verifique se não há vazamento.

Ligue a corrente a 5,5 MA para cada placa (correspondendo a aproximadamente 18 volts) e deixe correr a corrente constante até que a linha de corrida alcance um nível de aproximadamente 9,5 cm do topo de gel de separação (comprimento total de gel de separação: aproximadamente 12,6 cm; comprimento total de gel de separação + empilhando gel / (fundo de aberturas): aproximadamente 14 cm).

Desligue a corrente e tire as placas da cuba.

Remova os grampos que seguram o gel, retire os espaçadores, insira uma espátula de plástico plana e empurre para soltar as placas de vidro. Nunca use um objeto de metal, o qual lascará as placas de vidro. Retire o gel de empilhando, deixe permanecer gel de separação, faça a marca de início da aplicação das amostras e coloque o gel na solução de coloração.

Após 12 horas, retire o gel da solução de coloração e coloque na solução de descoloração (revelação), troque a solução caso precise, quando as bandas eletroforéticas estiverem nítidas, passe o resto do gel transparente para a solução de fixação e armazene sob refrigeração.

Quanto for secar o gel, se ele estiver com o tamanho adequado, coloque-o na solução secante por aproximadamente 1 hora. Em um bastidor, coloque uma folha de papel celofane umedecido em água destilada, coloque o gel e coloque outra folha de celofane, formando um sanduíche. Feche o bastidor, estique o papel e deixe secar. Caso o gel não esteja no tamanho adequado, deixe-o em água destilada por meia hora antes de colocar na solução secante.

Tampões e soluções de revelação.

Tampão de lavagem das células (NaPBS)	
Na ₂ HPO ₄ . 12H ₂ O 0,2M	40,5ml
NaH ₂ PO ₄ . 2H ₂ O 0,2M	9,5ml
NaCl	8,0 g
H ₂ O bidestilada	completar para 1000mL
pH 7,3	Estocar a 4°C

Tampão de tratamento da amostra (TTA)		Observação:
Mercaptoetanol	5mL	(0,75 g Tris + 50 mL de água destilada + 3,45 mL 1,72 N HCl ajuste o pH para 6,8). Depois de adicionar o mercaptoetanol + 10 mL de glicerol e ajuste para 100 mL
Glicerol	10mL	
Tris-HCL	0,75 g	
H ₂ O bidestilada	completar para 100mL	
pH 6,8	Estocar a -18° C	

A - Tampão do gel de separação		B - Tampão gel de Empilhamento	
Tris (1,5M)	18,15 g	Tris base (0,5M)	6,0 g
H ₂ O	completar para 100 mL	H ₂ O	completar para 100 mL
pH 8,8	Estocar a 4°C	pH	6,8 Estocar a 4°C

Observação:

A- Pesar o Tris e adicionar 50mL de água bidestilada + 24,2 mL de HCl 1,72. N. Elevar o pH para 8,8e completar o volume restante com água bidestilada.

B- Pesar o Tris e adicionar 50mL de água bidestilada + 29 mL de HCl 1,72. N. Elevar o pH para 6,8 e completar o volume restante com água bidestilada.

Solução estoque de SDS (10%)		Solução estoque de APS (10%)	
10g SDS	100mL H ₂ O destilada	0,1g APS	1mL H ₂ O destilada

Gel de separação (para 1 gel)		Gel de concentração (para 1 gel)	
H ₂ O bidestilada	9,6 mL	H ₂ O bidestilada	6 mL
Bis acrilamida	12,5 mL	Bis acrilamida	1,34 mL
Tris-HCl 1,5M pH:8,8	7,5 mL	Tris-HCl 1,5M pH:8,8	2,5 mL
SDS (10%)	300µL	SDS (10%)	100µL
APS (10%)	15µL	APS (10%)	50µL
TEMED	10µL	TEMED	5µL

Tampão de corrida (Tampão Tris-Glicina)

Tris	12,0 g
Glicina	57,5 g
SDS	4 g
H ₂ O bidestilada	completar para 4000 mL
pH 8,59 à 19°C. (Preparar minutos antes de começar a eletroforese)	

Solução de monômeros	Observação
Acrilamida 29,2g	Imediatamente após dissolver os compostos em água (processos endotérmico) o volume é ajustado e a solução deverá sempre permanecer gelada.
Bis-acrilamida 0,8g	
H ₂ O bidestilada completar para 100 mL. Filtrar e armazenar a 4°C.	

Solução estoque de SDS (20%)

20 g de SDS e completar o volume para 100mL com água destilada.
Estocar a temperatura ambiente (Não colocar na geladeira)

Volumes de STB e SDS para o preparo do extrato de célula (1/20 diluição)

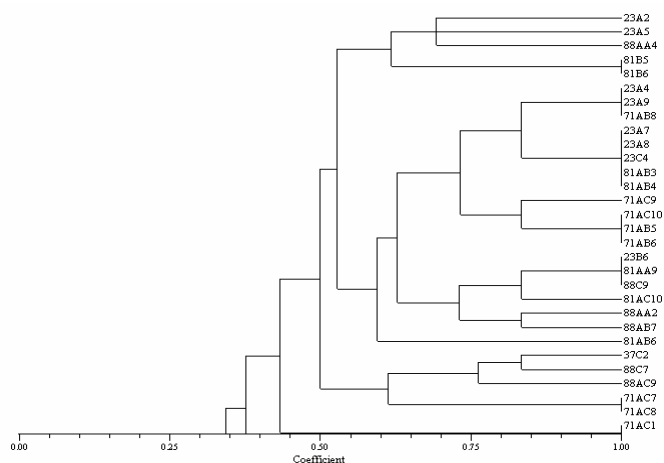
Peso de células úmidas em mg	STB (sem SDS) em mL	SDS 20% em mL
70	0,9	0,1

Revelação de proteínas totais

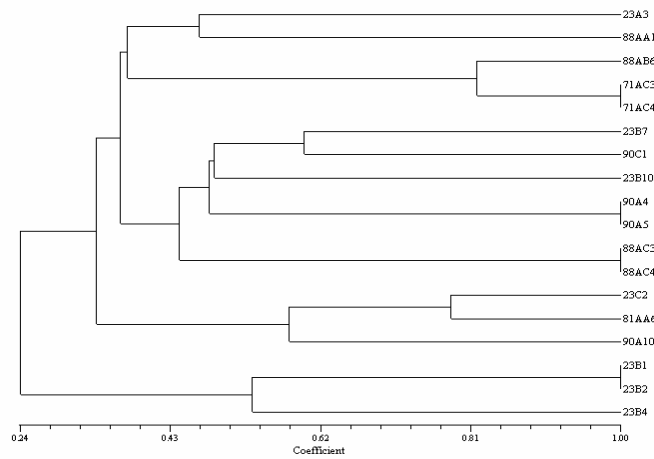
*Solução de coloração		*Solução fixadora	
Metanol	400mL	Metanol	450mL
Ác. acético	70mL	Ác. acético	100mL
Coomassie Blue R250	0,5 g	H ₂ O destilada	1000mL
H ₂ O destilada	1000mL		

*Solução descolorante		*Solução secante	
Metanol	400mL	Metanol	650mL
Ác. acético	70mL	Glicerol	5mL
H ₂ O destilada	1000mL	H ₂ O destilada	1000mL

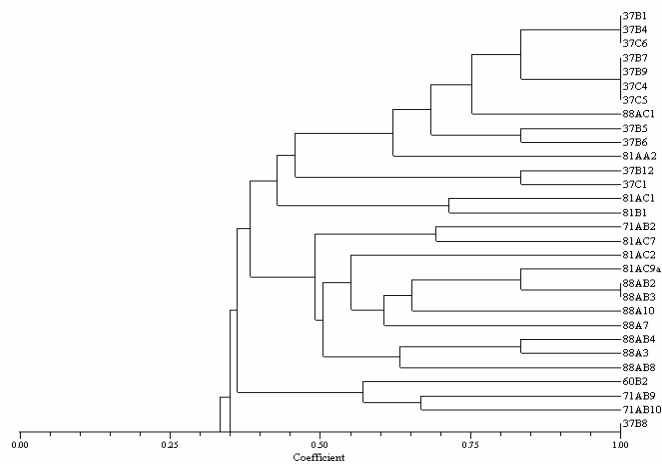
3B Dendrogramas culturais



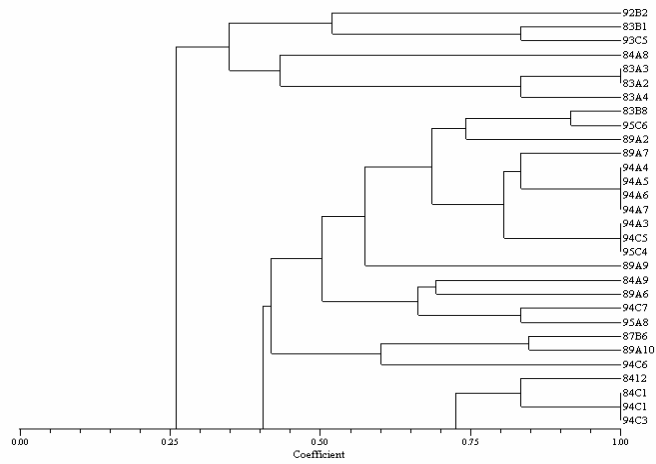
A) Dendrograma com grupos culturais, construído com isolados do sistema de uso da terra floresta secundária em estágio avançado de regeneração, os quais apresentam a modificação do pH do meio de cultivo caracterizada como ácida.



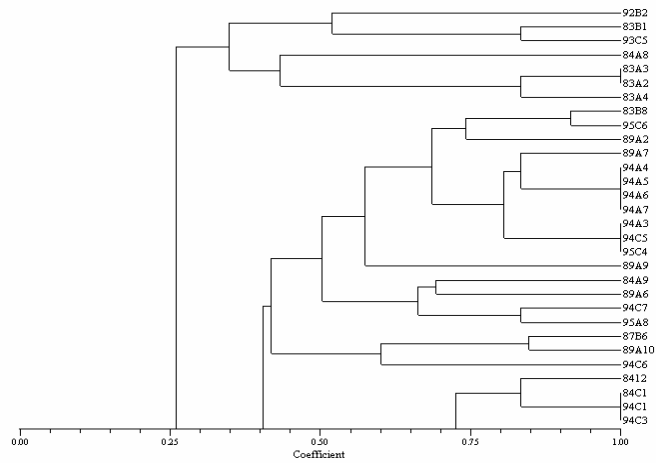
B) Dendrograma com grupos culturais, construído com isolados do sistema de uso da terra floresta secundária em estágio avançado de regeneração, os quais apresentam a modificação do pH do meio de cultivo caracterizada como básica.



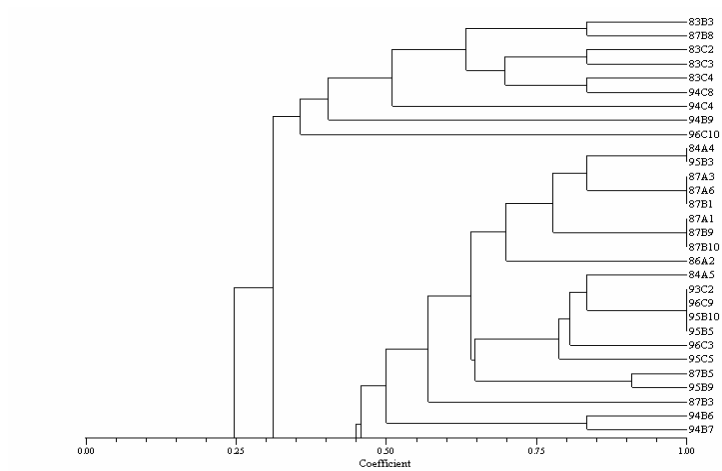
C) Dendrograma com grupos culturais, construído com isolados do sistema de uso da terra floresta secundária em estágio avançado de regeneração, os quais apresentam a modificação do pH do meio de cultivo caracterizada como neutra.



D) Dendrograma com grupos culturais, construído com isolados do sistema de uso da terra pastagem, os quais apresentam a modificação do pH do meio de cultivo caracterizada como ácida.



E) Dendrograma com grupos culturais, construído com isolados do sistema de uso da terra pastagem, os quais apresentam a modificação do pH do meio de cultivo caracterizada como básica.



F) Dendrograma com grupos culturais, construído com isolados do sistema de uso da terra pastagem, os quais apresentam a modificação do pH do meio de cultivo caracterizada como neutra.

4B Valores médios de MSPA das testemunhas com e sem N

Testemunhas	Repetição		
	I	II	III
	g planta^{-1}		
T S/N	0,04	0,07	0,09
T C/N	0,498	0,585	0,705