

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA**  
**MESTRADO EM AGROECOLOGIA**

**KATIA PEREIRA COELHO**

**DIVERSIDADE E EFICIÊNCIA DE BACTERIAS FIXADORAS DE  
NITROGÊNIO NODULIFERAS DE GLIRICÍDIA, LEUCENA E SOMBREIRO  
NO MARANHÃO**

**SÃO LUÍS**

**2010**

**KATIA PEREIRA COELHO**

**Engenheira Agrônoma**

**DIVERSIDADE E EFICIÊNCIA DE BACTERIAS FIXADORAS DE  
NITROGÊNIO NODULIFERAS DE GLIRICÍDIA, LEUCENA E SOMBREIRO  
NO MARANHÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroecologia da Universidade Estadual do Maranhão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Agroecologia.

Orientador: Prof. Dr. Guillaume Xavier Rousseau

SÃO LUÍS

2010

Coelho, Katia Pereira.

Diversidade e eficiência de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de gliciridia, leucena e sombreiro no Maranhão / Kátia Pereira Coelho.– São Luís, 2011.

67 f

Dissertação (Mestrado) – Curso de Agroecologia, Universidade Estadual do Maranhão, 2011.

Orientador: Prof. Guillaume Xavier Rosseau

1.Rizóbio. 2.Comunidade nativa. 3.Leguminosas arbóreas. I.Título

CDU: 633.875-146.15(812.1)

**KATIA PEREIRA COELHO**

**DIVERSIDADE E EFICIÊNCIA DE BACTERIAS FIXADORAS DE  
NITROGÊNIO NODULIFERAS DE GLIRICÍDIA, LEUCENA E SOMBREIRO  
NO MARANHÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroecologia da Universidade Estadual do Maranhão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Agroecologia.

Aprovada em: 25/02/2011.

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Guillaume Xavier Rousseau** (orientador)

Ph.D. Plant and Soil Biology

Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)

---

**Prof. Dr. José Geraldo Donizetti dos Santos** (1° examinador)

Doutor em Ciência do Solo

Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)

---

**Prof. Dr. Emanuel Gomes de Moura** (2° examinador)

Doutor em Agronomia

Universidade Estadual do Maranhão (UEMA)

A Deus, por guiar e conduzir toda a minha vida;

Ao meu avô Manoel Venceslau (*in memoriam*), verdadeiro pai na minha vida, símbolo de amor e humildade;

Às minhas duas mães Janete Vanda e Maria Augusta, pelo amor, companhia, presença e força constante;

À minha irmã, e alma, gêmea Cassia e aos meus irmãos Cassius e Kallynadjá, pelo incentivo e apoio;

Ao meu padrasto Wanderley, pela presença e apoio;

Aos meus tios e tias, em especial Domingos Gilson, pela companhia e incentivo constantes;

Ao meu sobrinho e afilhado Luigi Marcelo, por alegrar a minha vida.

**Dedico com todo amor e carinho.**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela minha vida, superação e por esta vitória;

À minha família, pelo apoio e incentivo em todos os momentos;

Ao Prof. Dr. Guillaume Xavier Rousseau e ao Prof. Dr. José Geraldo D. Santos, pela orientação;

Às minhas companheiras de laboratório e amigas Tércia, Évila, Danúbia e Edilaine, por me auxiliarem em todos os momentos;

Aos Professores Doutores Emanuel Moura e Alana Aguiar, por terem me ajudado e apoiado em todos os momentos que precisei;

Ao Leandro, Meirijane e demais pessoas que auxiliaram no trabalho;

A todos os meus colegas do mestrado em especial, a Cristina, o Marlon, o Adriano e a Michela, pelos momentos de alegria;

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Antonia Alice, pelo auxílio e compreensão;

À Fapema, pela concessão da bolsa de estudos;

Ao Prof. Dr. Altamiro Ferraz Jr., pelo auxílio com passagens e ajuda de custo para realização do estágio na Embrapa Agrobiologia;

Ao Dr. Gustavo Ribeiro Xavier e ao pessoal do LEMI da Embrapa Agrobiologia, em especial o Jakson, o Samuel e a Viviane, pela ajuda nas análises genotípicas e demais análises realizadas na EMBRAPA;

Ao Padre Antônio e ao Dr. Inaldo, por terem me guiado e fornecido forças para continuar lutando;

Ao Neto, Renato, Naldo, à Marinilde, e aos demais funcionários do NUTER e Mestrado;

A todos, que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“A nossa maior glória não reside no fato de nunca cairmos, mas sim em levantarmo-nos sempre depois de cada queda”.

Confúcio.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I - FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO E SUA APLICAÇÃO EM AGROSSISTEMAS E NA RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS NO TRÓPICO ÚMIDO.....</b>	<b>8</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Potencial de utilização das leguminosas arbóreas para a agricultura e recuperação de áreas degradadas.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2 Potencial de nodulação e fixação biológica de nitrogênio pela simbiose rizóbio-leguminosa.....</b>	<b>12</b>
<b>2.3 Fatores ambientais que afetam a capacidade competitiva de estirpes de rizóbios e a Fixação Biológica de Nitrogênio.....</b>	<b>15</b>
<b>2.4 Seleção de estirpes nativas de rizóbios para o uso em leguminosas arbóreas.....</b>	<b>17</b>
<b>2.5 Caracterização fenotípica e genotípica de rizóbios.....</b>	<b>18</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>21</b>
<b>CAPÍTULO II - DIVERSIDADE E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE RIZÓBIOS DE GLIRICIDIA, LEUCENA E SOMBREIRO ORIUNDOS DE SOLO DO MARANHÃO</b>	<b>30</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>31</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>32</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>33</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>40</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>55</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>61</b>

**FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO E SUA APLICAÇÃO EM AGROSSISTEMAS  
E NA RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS NO TRÓPICO ÚMIDO**

---

**CAPÍTULO I**

## INTRODUÇÃO

O trópico úmido é uma região caracterizada por condições climáticas favoráveis à atividade biológica, como umidade suficiente, temperaturas ideais e alta energia solar. Entretanto, a baixa fertilidade e fragilidade, presente em cerca de 80% dos solos da região, constitui um entrave para o desenvolvimento de sistemas agrícolas produtivos. Segundo Moura (2006), a ação da intensa precipitação pluvial, aliada a elevada insolação equatorial, sob o material de origem sedimentar e de frágil estrutura presente nesses solos gera problemas como: compactação do solo, lixiviação de nutrientes e acelerada decomposição da matéria orgânica, o que pode resultar em degradação dessas áreas.

No trópico úmido maranhense os problemas agrícolas são fortemente presentes, tanto na agropecuária, onde a degradação de pastagens é um dos principais problemas (Dias-Filho, 2007), quanto na agricultura familiar, onde a maioria dos pequenos agricultores pratica a agricultura itinerante ou agricultura de corte e queima. Este modelo consiste em um sistema comum de uso da terra que alterna períodos de pousio com curtos períodos de cultivo intensivo (Brady, 1996). Embora persistam controvérsias, essa forma de cultivo vai contra os princípios da sustentabilidade, podendo levar a perda de nutrientes, degradação dos solos, dos mananciais hídricos (Holsher, 1997; Kaminura & Rinny, 1998), perdas de biodiversidade, agravamento do efeito estufa, (Roder et al., 1995; Matson et al., 1997; Altieri, 1999) e elevado índice de desmatamento (Yared, 1990).

As tentativas de introdução, de práticas “modernas” no Estado, concebidas para outras realidades de solo e clima, resultaram apenas no surgimento de extensas áreas degradadas onde até a recuperação da vegetação natural foi prejudicada pela erosão da biodiversidade e pela compactação do solo (Moura et al., 2009). Segundo Drinkwater & Snapp (2007), o acúmulo de nutrientes por meio de processos microbiologicamente mediados consiste numa alternativa adequada para elevar a sustentabilidade de agroecossistemas.

Os sistemas agroflorestais são alternativas viáveis para a substituição do modelo de agricultura itinerante no trópico úmido maranhense. O principal sistema agroflorestal testado no estado é o cultivo em aléias ou “alley cropping” (Leite et al., 2008; Moura et al., 2008; Aguiar et al., 2009; Aguiar et al., 2010; Moura et al., 2010). Segundo Ferraz Jr. (2006), este é um sistema simples que combina em uma mesma área espécies arbóreas, preferencialmente leguminosas, com culturas anuais ou perenes. A utilização de leguminosas arbóreas nesse sistema deve ser destacada por sua grande acumulação de nutrientes, baixa relação C/N dos resíduos (Ferraz Jr., 2006), e sua capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN), em simbiose com rizóbios. Essas mesmas

características possibilitam a utilização dessas leguminosas para a recuperação das áreas degradadas (RAD) existentes no Estado.

O uso de leguminosas melhora a qualidade do solo por meio do aumento dos níveis de matéria orgânica e N, sendo uma alternativa eficiente para o manejo de áreas com baixo poder de resiliência (Siqueira, 1994; Franco et al., 1992). Entretanto, os benefícios das leguminosas para a agricultura ou recuperação de áreas degradadas se verificam somente na presença ou adição, via inoculante, de microbiossimbiontes compatíveis e eficazes na fixação do nitrogênio. Diante do exposto, verifica-se uma grande necessidade de estudos sobre a composição e potencial simbiótico, das comunidades nativas de rizóbios existentes no Maranhão para a FBN com leguminosas arbóreas. Entre as leguminosas arbóreas de maior interesse no estado estão o sombreiro (*Clitoria fairchildiana*), a leucena (*Leucaena leucocephala*) e a glirícidia (*Gliricidia sepium*), devido ao seu potencial de uso no sistema de cultivo em aléias e na RAD. O sombreiro é uma leguminosa nativa da região e, juntamente com a leucena, tem sido muito utilizado em sistemas de aléias no estado. A glirícidia foi recentemente introduzida na área e seu potencial para o “alley cropping” ainda está em avaliação.

A diversidade das comunidades nativas de rizóbios deve ser acessada tanto fenotípica quanto genotipicamente, realizando testes de tolerância dos membros dessas comunidades a fatores ambientais. Esta caracterização é necessária para a obtenção de um perfil geral da comunidade e seleção de estirpes de rizóbios eficientes e adaptadas as condições locais para as leguminosas de interesse. Testes envolvendo a inoculação dessas leguminosas arbóreas com estirpes comerciais de rizóbios recomendados, nas condições do estado, também são necessários na busca da otimização da fixação biológica de nitrogênio. Essa otimização é necessária para elevar a taxa de crescimento inicial das leguminosas arbóreas em solos de baixa fertilidade natural, diminuindo o intervalo entre o plantio das árvores e a produção de biomassa em sistemas agroflorestais, e aumentando a taxa de sobrevivência e desenvolvimento de mudas em áreas de projeto de RAD.

## **2. REFERÊNCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Potencial de utilização das leguminosas arbóreas para a agricultura e recuperação de áreas degradadas**

A degradação de áreas nos trópicos tem como principais responsáveis atividades ligadas ao desmatamento, pastagens mal conduzidas, adoção de sistemas agrícolas inadequados e extrativismo (Porrota et al., 1997; Oldeman & Lynden, 1998). A recuperação de áreas degradadas tem como objetivo restaurar funções essenciais para restabelecer o equilíbrio e a sustentabilidade antes existente no sistema natural (Dias & Griffith, 1988). Este processo consiste num conjunto de etapas que visam restabelecer o potencial de produção, criando assim um equilíbrio ambiental e uma paisagem mais diversificada, a fim de reverter os processos de degradação.

A recuperação de florestas tropicais é lenta e incerta devido a diversos fatores que dificultam o restabelecimento inicial das espécies vegetais, tais como: agressividade e dominância de gramíneas, queimadas, baixa fertilidade dos solos, condições climáticas desfavoráveis e a falta de bancos de sementes de leguminosas arbóreas nativas (Porrota et al., 1997). Porém, a implantação e o restabelecimento de espécies leguminosas arbóreas em áreas degradadas favorecem e aceleram o processo de sucessão vegetal (Brown & Lugo, 1994; Silva et al., 1995).

Estima-se que a família leguminosea tem em torno de 20.000 espécies e 700 gêneros, cerca de 23% dessas espécies já foram estudadas quanta a capacidade de nodular e 88% dos gêneros nodulam (Lewis et al., 2003; Faria & Campelo, 2000). Essa família tem grande importância econômica no Brasil devido a sua alta ocorrência, diversidade e adaptação aos diferentes biomas brasileiros, além de ter fácil propagação e grande potencial para a FBN, o que lhe confere um importante papel ecológico.

Conforme discutido em Ferraz Jr. (2006), as leguminosas arbóreas têm grande potencial para recuperação de áreas degradadas. Dentre os benefícios proporcionados, destaca-se a maior resiliência aos sistemas, pois apresentam sistema radicular profundo, o qual lhes confere melhor ciclagem de nutrientes, crescimento rápido, maior tolerância a acidez e as mudanças de temperaturas e simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos. A simbiose com rizóbios estimula a aquisição de nutriente pelas plantas, contribuindo para seu estabelecimento inicial e crescimento, com consequente deposição de matéria orgânica no solo facilitando assim a recuperação deste.

A capacidade de nodular e fixar nitrogênio das leguminosas bem como sua diversidade genética são fatores de grande importância para sistemas agrícolas e recuperação de áreas degradadas. Entretanto, para uma leguminosa se beneficiar da fixação de nitrogênio em dado local, devem-se levar em consideração as comunidades nativas de rizóbios, pois a eficiência dessa simbiose depende de características da planta, da bactéria, do clima e do solo. Neste sentido, estudos que envolvam caracterização e identificação de espécies indígenas de rizóbios são altamente relevantes para a recomendação da melhor taxa a ser usada como inoculante para cada leguminosa em determinada região. Os isolados de leguminosas arbóreas nativas estão classificados dentro dos seguintes gêneros: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* (Zahran, 2001), *Burkholderia*, *Azorhizobium* e *Methylobacterium* (Vandame et al., 2002; Menna et al., 2006).

## **2.2 Potencial de nodulação e fixação biológica de nitrogênio pela simbiose rizóbio-leguminosa**

A fixação do nitrogênio é um importante processo biológico que move N da atmosfera para os ecossistemas terrestres (Garten Jr et al., 2008), representando uma alternativa econômica e sustentável de fornecimento de nitrogênio por meio do cultivo de leguminosas (Gonzalez et al., 2008) e outras espécies fixadoras. A FBN atua como um grande suporte para se conseguir altas produções no campo, aliada a um equilíbrio com o meio ambiente e a racionalização dos custos (Quesada et al., (2003). A racionalização dos custos reduz as despesas com fertilizantes nitrogenados químicos, já o equilíbrio ambiental é conseguido por meio da eliminação do impacto negativo destes produtos sobre o ambiente (Stralio et al., 2002), aliada a outras ações. Certamente o principal exemplo da aplicação prática da FBN na produção agrícola é a soja, onde, segundo Araújo & Carvalho (2006), a principal vantagem é a substituição total da adubação nitrogenada, por meio da inoculação das sementes com bactérias específicas e eficientes, como *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii*. O uso desses rizóbios, para a soja, proporciona uma economia anual da ordem de três bilhões de dólares para o Brasil. A utilização econômica da FBN também é observada em outras culturas leguminosas e representa uma parte importante das muitas práticas agroflorestais e de recuperação de áreas degradadas (Danso et al., 1992; Kang et al., 1990). Como vantagem adicional há elevado aproveitamento do N fixado, ao contrário das fontes químicas, para as quais as perdas podem superar 50%.

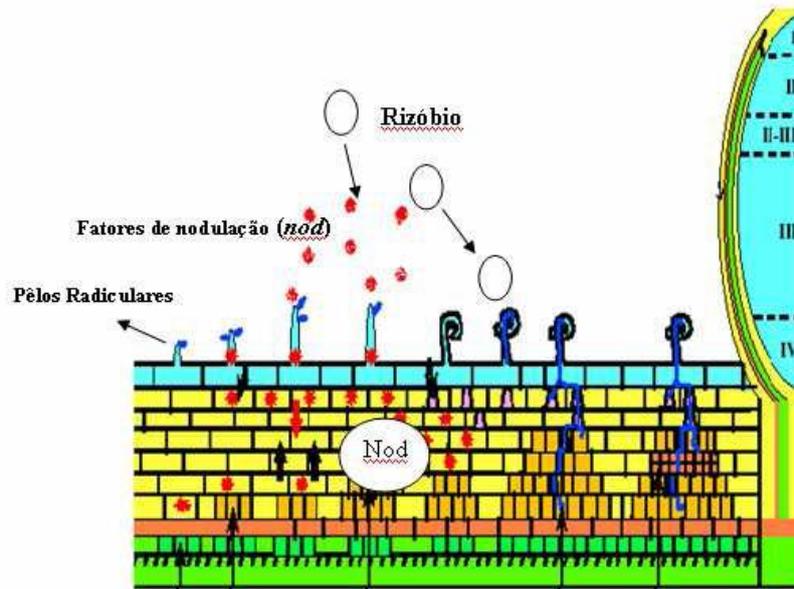
A fixação biológica do N envolve uma sucessão de processos que começam com a adaptação de determinada bactéria a sua leguminosa hospedeira e culminam na fixação do N<sub>2</sub> atmosférico

(Fagan et al., 2007). O processo de infecção e colonização de plantas pelas bactérias é um evento dinâmico, o qual envolve o reconhecimento de sinais moleculares, seguido do movimento da bactéria em direção a planta hospedeira. Posteriormente ocorre a adesão à superfície vegetal e penetração e multiplicação no interior da planta (Reis & Olivares, 2006).

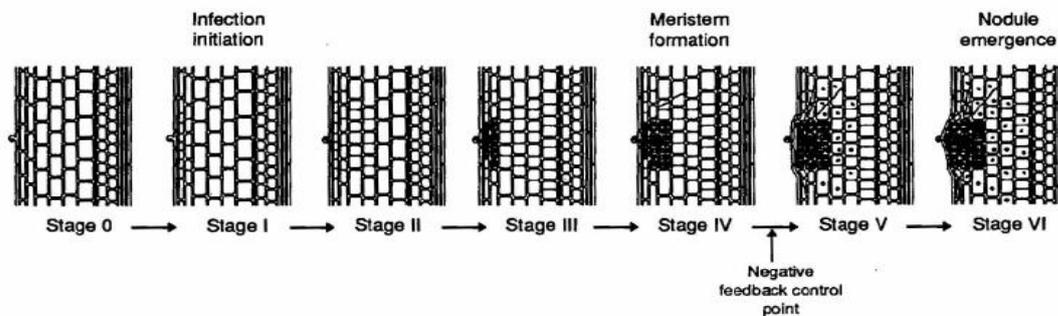
Segundo Timmers et al., (1990), as bactérias nodulíferas migram em direção as raízes em função de uma resposta quimiostática decorrente da atração por flavonóides e betaínas secretadas pelas raízes, que funcionam como sinalizadores para as bactérias, além disso, as células dos pêlos radiculares liberam fatores de nodulação (Nod). Esse processo pode ser observado por meio da esquematização feita por esses autores e adaptada por Fagan et al. (2007) (Figura 1).

A penetração pode ocorrer através de aberturas naturais, como estômatos, hidatódios, nectários e lenticelas, ou através de injúrias e feridas (Reis & Olivares, 2006). Com a penetração da bactéria na planta (infecção), ocorrem divisões celulares mitóticas que culminam com a formação dos nódulos radiculares. Os nódulos são estruturas específicas onde ocorre a quebra da tripla ligação do  $N_2$ , através de um complexo enzimático denominado nitrogenase. Por meio desse processo, bactérias do gênero *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* (geralmente conhecidas por rizóbios) convertem o  $N_2$  atmosférico em amônia, que é incorporada em diversas formas de N orgânico para a utilização pelas plantas da família das leguminosas (Araújo & Carvalho, 2006). Atualmente, bactérias pertencentes aos gêneros *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium*, além da bactéria *Metylobacterium nodulans*, única descrita nesse gênero, por Weir (2008), foram incluídas no grupo dos rizóbios.

A formação do nódulo radicular pode ser melhor entendida por meio da observação do esquema proposto por Gerahty et al. (1992), que descreve cronologicamente a formação dos nódulos em raízes de soja (Figura 2). De acordo com o esquema, no estágio 0 a raiz não está infectada, no estágio I ocorre o início da infecção, no II iniciam as divisões celulares nas células corticais externas, no III verifica-se uma divisão evidente no córtex interno e em células do córtex externo, no IV ocorre a formação de um meristema nodular, no V ocorre o aumento do meristema nodular e no estágio VI finalmente tem-se a emergência do nódulo.



**Figura 1.** Esquema do processo de simbiose de bactérias do gênero *Rhizobium* com leguminosas, adaptado de Timmers et al., (1999).



**Figura 2.** Estágios de infecção e formação de nódulos em raízes de soja. Fonte: Gerahty et al. (1992).

O processo de fixação biológica do nitrogênio demanda um alto gasto energético para a redução do  $N_2$  a  $NH_3$  (Huergo, 2006). Isso ocorre porque o nitrogênio atmosférico é uma molécula composta por dois átomos de nitrogênio, ligados por uma tripla ligação muito forte, sendo necessárias grandes quantidades de energia para quebrar essa ligação e tornar a molécula quimicamente não reativa (Hubbell & Kidder, 2003). Segundo Aranjuelo et al. (2009), raízes noduladas podem requerer até 60% dos fotoassimilados produzidos em fotoperíodo acima de 12 horas. As plantas fornecem um ambiente que leva a manutenção do metabolismo bacteriano através da redução dos níveis internos de  $O_2$  livre e fornecimento de uma fonte de energia, geralmente na forma de succinato e malato. Sacarose, formada pela fotossíntese nas folhas, é translocada para o

sistema radicular onde é convertida em malato e succinato, enquanto que a amônia é assimilada para o interior do tecido infectado do nódulo para formar amidas ou ureídos que são translocados para a copa. Desta forma os parceiros simbióticos formam uma relação muito íntima e de complementaridade nutricional (Hardarson & Atkins, 2003).

### **2.3 Fatores ambientais que afetam a capacidade competitiva de estirpes de rizóbios e a Fixação Biológica de Nitrogênio**

A FBN é afetada por inúmeros fatores capazes de prejudicar o hospedeiro, o rizóbio ou ambos. A influência negativa de fatores ambientais sobre a estreita inter-relação planta-bactéria é capaz de reduzir a FBN e, conseqüentemente, o rendimento das plantas, acarretando em perda parcial ou total dos investimentos feitos em insumos e trabalho (Chagas Jr., 2007). A população de rizóbios pode ser diminuída por fatores como o pH ácido e alumínio tóxico (Wood, 1995; Igual et al., 1997; Hungria & Vargas, 2000; Chagas Jr., 2007; Chagas Jr et al., 2009; Garau et al., 2009), temperatura, disponibilidade hídrica (Hashem et al 1998; Zahran, 1999; Garten Jr et al, 2008; Ruiz-Díez et al., 2009), e salinidade (Hashem et al., 1998; Freitas et al., 2007; Ruiz-Díez et al., 2009).

Os rizóbios são capazes de nodular em pH entre 4,9 e 8,1 (Melo, 2009). Em geral, o crescimento da bactéria é favorecido em pH neutro ou levemente alcalino. Segundo Moreira & Siqueira (2002), a maior exsudação de carbono pelas raízes, favorecida pelo pH neutro, interfere na sobrevivência e competição do rizóbio no solo, à medida que compostos de carbono são substratos para os microrganismos que vivem na rizosfera. Em contrapartida, a acidez do meio é capaz de afetar o crescimento de isolados de rizóbios, como descrito por Hara & Oliveira (2005). O crescimento dos isolados é afetado em solos ácidos devido a maior solubilidade de  $Al^{+3}$  e  $Mn^{+2}$ , nestes solos. O  $Al^{+3}$  age reduzindo a atividade de células de bactérias e aumentando o tempo de geração, ocasionando diminuição na população, devido à elevada taxa de mortalidade em relação a multiplicação celular (Hungria & Vargas, 2000; Watkin et al., 2003).

Apesar dessa hipótese, Chagas Jr (2007), relata que os estudos relativos à acidez e toxicidade de alumínio são limitados pela dificuldade em determinar se os efeitos nocivos afetam a multiplicação do microssimbionte, o desenvolvimento da planta ou alguma etapa específica no estabelecimento e funcionamento da simbiose. Essa limitação deve ser superada por meio da realização de pesquisas para determinar o exato ponto onde a simbiose é prejudicada por esses fatores. Esse mesmo autor estabelece que a quantificação da tolerância à acidez e alumínio em laboratório pode ser o primeiro passo na seleção de isolados de rizóbios para aquelas regiões onde esse tipo de limitação é comum.

Entre os sistemas ambientais mais problemáticos para os rizóbios encontram-se aqueles que apresentam extremos de temperatura (Zahran, 1999). Segundo Hashem et al (1998) elevadas temperaturas e concentração de sais na zona radicular são geralmente prejudiciais para a maioria das plantas e microrganismos. O efeito da temperatura varia com a espécie hospedeira, entre cultivares da mesma espécie e entre isolados de rizóbios (Bowen & Kennedy 1959; Pate 1961; Lie 1971). Ela afeta a simbiose rizóbio-leguminosa, por inibir o crescimento ou sobrevivência do rizóbio na rizosfera (Parker et al., 1977; Day et al., 1978).

Solos salinos, em geral, contêm valores muito baixos de nitrogênio, não adequados para o cultivo da maioria das plantas (Freitas et al 2007), o que é agravado pelo fato da maioria das leguminosas e seus microssimbiontes serem sensíveis à salinidade (Singleton et al., 1986). O insucesso de inoculações sobre condições salinas pode ser causado pela diminuição da sobrevivência e proliferação das bactérias introduzidas na rizosfera (Singleton et al., 1986). A salinidade interfere negativamente no desenvolvimento da leguminosa hospedeira, por provocar uma redução do potencial hídrico do solo, resultando em menor capacidade de absorção de água pelas plantas (Nóbrega et al., 2004), o que, aliado aos efeitos tóxicos dos sais, interfere tanto na germinação quanto no desenvolvimento das plantas (Rebouças et al., 1989). Já o efeito prejudicial dos sais sobre as bactérias é relacionado particularmente aos efeitos da concentração do íon  $\text{Na}^+$  específico e, em menor escala, ao efeito osmótico (Elsheikh, 1998).

A redução das limitações ambientais aqui citados sobre a fixação biológica do nitrogênio pode ser conseguida por meio do uso de leguminosas hospedeiras e rizóbios tolerantes a esses fatores. Segundo Chagas Jr. (2007), dentre os microrganismos, as bactérias formam o grupo com maior diversidade fisiológica, o que propicia maior adaptabilidade. O autor comenta ainda que devido à plasticidade fisiológica destes microrganismos, é possível selecionar estirpes indígenas ou obter mutantes tolerantes à acidez, o que pode ser aplicado também a outros fatores ambientais. Ainda segundo o mesmo autor, testes de laboratório são significativos processos de seleção de estirpes tolerantes e eliminação de estirpes sensíveis a fatores ambientais negativos, como pH inadequado e elevada concentração de Al.

Em geral, rizóbios de crescimento rápido são mais tolerantes a condições ambientais adversas que rizóbios de crescimento lento. Isto pode estar relacionado com a maior produção de polissacarídeos extracelulares por essas bactérias. Essa característica vem sendo descrita por vários autores como um mecanismo envolvido no processo de adaptação e sobrevivência dos rizóbios em distintas condições edafoclimáticas (Freitas et al., 2007).

## 2.4 Seleção de estirpes nativas de rizóbios para o uso em leguminosas arbóreas

A biodiversidade do solo é responsável pela estabilidade e resiliência do ecossistema, por estar relacionada, direta ou indiretamente, a processos de formação do solo, ciclagem e armazenamento de nutrientes, dentre outros (Santos et al., 2007). De acordo com Odum (1988), a melhor compreensão da diversidade da microbiota do solo pode propiciar desenvolvimento de estratégias que permitam a otimização dos processos biológicos, entre esses processos merece destaque a FBN.

Uma leguminosa introduzida formará nódulos e se beneficiará da FBN, em dado local, se populações nativas de rizóbios compatíveis estiverem presentes no solo. A eficiência do processo depende, porém, de fatores da planta, da bactéria, do clima e do solo (Souza et al., 2007). Estudos indicam que o número de nódulos e sua taxa de fixação de nitrogênio são determinados pela efetividade e número de rizóbios presente no solo, como descrito em Amijee & Giller (1998) e Aynabeba et al. (2001).

As bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de leguminosas (BFNNL) têm, durante as últimas décadas, recebido muita atenção e o número de descobertas de espécies capazes de formar simbiose com leguminosas tem aumentado a elevadas taxas (Lindstro et al., 2010). Essas descobertas de novas estirpes se devem, principalmente, à falta de estudos. No Maranhão, não existem estudos acerca de comunidades nativas de bactérias nodulíferas de leguminosas.

Rizóbios indígenas são aqueles naturalmente encontrados em solos de uma determinada localidade (Lindstro et al., 2010). Em muitos solos, essas comunidades apresentam grande diversidade tanto em nível de espécie, quanto dentro de uma mesma espécie. Segundo Bala & Giller (2001), um solo pode conter várias espécies e vários isolados de uma mesma espécie de BFNNL. Populações desses organismos podem ser aumentadas onde leguminosas compatíveis são cultivadas (Zengeni et al., 2006).

Grandes comunidades indígenas de rizóbios, compatíveis com leguminosas cultivadas, em geral, induzem respostas baixas dos hospedeiros (Lindstro et al., 2010), devido, principalmente, a existência de bactérias simbiotes ineficientes ou com baixa eficiência para a FBN, nessas comunidades. Além disso, algumas estirpes capazes de aumentar significativamente a FBN, em condições controladas, podem ser ineficientes sob condições de campo. Isso decorre do fato do sucesso da inoculação ser limitada por diversos fatores, incluindo a presença de bactérias indígenas competitivas, as quais representam uma barreira contra a nodulação pelas estirpes selecionadas (Thies et al., 1991). A falta de competitividade é uma das maiores causas de falhas quando novos isolados, provenientes de regiões ecologicamente distintas, são introduzidos em solos com grande número de rizóbios indígenas (Triplett & Sadowsky 1992). Estes dados enfatizam a necessidade de

obtenção de estirpes efetivas e competitivas em relação às comunidades nativas e, se possível, tolerantes a fatores ambientais limitantes na área onde serão utilizadas.

Devido à alta variabilidade das bactérias fixadoras de nitrogênio, em diferentes regiões, estas constituem a fonte primária na busca de novas estirpes eficientes, competitivas e resistentes a condições abióticas estressantes. Lindstro et al (2010), reportam que a adaptação de populações indígenas de rizóbios a ambientes locais, consiste em uma grande vantagem para a seleção de novas estirpes inoculantes. Segundo Liu et al. (2007), leguminosas nativas são fontes potenciais de diversas populações indígenas destas bactérias. Entretanto, as populações nativas são constituídas por estirpes com eficiência variável, das quais somente algumas podem ser incluídas em testes de eficiência agrônômica (Lima et al., 2005).

Para a obtenção de estirpes capazes de nodular e eficientes na FBN, para cada espécie arbórea, várias etapas são necessárias: verificação da capacidade de nodulação da espécie; coleta dos nódulos, isolamento das bactérias; purificação das colônias; seleção das estirpes mais eficientes em vasos com substrato esterilizado e em vasos com solo não esterilizado (Faria & Franco, 2002).

Faria (2000) relata a utilização de quatro bases de recomendação de estirpes de rizóbios para leguminosas florestais. A base I consiste na seleção, feita em condições estéreis, e testes com bactérias purificadas a fim de verificar se estas são rizóbios e possuem capacidade de nodular a planta testada. Para a base de recomendação II as estirpes selecionadas na etapa anterior são testadas em vasos de Leonard em casa de vegetação, utilizando substrato esterilizado em autoclave. A base de recomendação III é feita em vasos com solo não estéril, avaliando a competitividade das bactérias testadas com as estirpes nativas. A etapa IV consiste no teste das estirpes selecionadas na etapa III sob condições de campo. As estirpes que apresentam melhores resultados, em termos de eficiência de ganho de massa seca, em relação a testemunhas nitrogenadas e absolutas, são identificadas, caracterizadas e armazenadas para seu posterior uso (Faria & Uchôas, 2007).

## **2.5 Caracterização fenotípica e genotípica de rizóbios**

Atualmente, diversas metodologias estão disponíveis para acessar a diversidade microbiana. Lambais et al. (2005) separam essas metodologias em dois grupos: as dependentes e as independentes de cultivo dos microrganismos. Metodologias dependentes de cultivo, como o isolamento em meio de cultura, consistem em métodos rápidos e econômicos que fornecem informações sobre grupos de microrganismos viáveis e cultiváveis em uma amostra de solo. As metodologias independentes de cultivo apresentam a vantagem de acessar a diversidade de microrganismos cultiváveis e não cultiváveis. Estas metodologias baseiam-se na amplificação de

fragmentos específicos de rDNA (DNA ribossômico) por meio de PCR (Polymerase Chain Reaction), utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos, e posterior aplicação do produto de amplificação em géis de eletroforese para separação dos fragmentos.

A caracterização de isolados de bactérias nodulíferas de leguminosas corresponde ao primeiro passo no acesso à diversidade de uma comunidade indígena e na busca por estirpes eficientes, que poderão servir futuramente para a produção de inoculantes. Essa caracterização pode ser feita por meio de diversos mecanismos. Entre os métodos mais comumente utilizados está a caracterização fenotípica, baseada no isolamento de colônias em meio de cultura, principalmente devido ao seu menor custo e simplicidade de aplicação. O estudo da diversidade das bactérias baseado em características culturais, envolve a avaliação de parâmetros como: tempo que as bactérias levam para formar colônias individuais em meio de cultura, diâmetro destas colônias, forma, cor, produção de ácido e álcali, produção de muco (Santos et al., 2007), métodos de coloração, alteração do pH do meio de cultura, produção de pigmentos, tolerância a baixo pH e produção de compostos indólicos (Andrade et al., 2002; Reis Jr., 2004).

A caracterização fenotípica, baseada na morfologia das colônias, possui a vantagem de ser rápida, além de permitir uma análise prévia da diversidade e obtenção de microrganismos isolados, que poderão ser armazenados e usados posteriormente (Santos et al., 2007). Entretanto, essa caracterização, por ser dependente de cultura *in vitro* de rizóbios, apresenta alguns inconvenientes, como: dificuldades em desalojar microrganismos associados a biofilmes e partículas do solo, seletividade do meio, condições ótimas para crescimento e interações negativas entre as colônias de microrganismos (Kirk et al., 2004). Além disso, esse método não é tão discriminatório quanto o uso de ferramentas moleculares.

Apesar da caracterização fenotípica apresentar capacidade de revelar certa diferenciação entre isolados de rizóbios, consideráveis avanços foram conseguidos nos últimos anos, pelo emprego de técnicas de biologia molecular nos estudos de taxonomia e diversidade de rizóbios (Fernandes et al 2003). A caracterização genotípica de rizóbios só foi possível graças ao desenvolvimento de métodos rápidos e fáceis, capazes de exibir caracterização microbiana, incluindo análise ao nível de gênero, espécie e até mesmo de isolados (Schneider & De Bruijn, 1996). Entre essas técnicas, se destaca a PCR, que permite a amplificação de sequências definidas da molécula de DNA, associada ao método do RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), em geral com ampliações de regiões de genes cromossômicos conservados, mas com variabilidade suficiente para detectar diferenças entre gêneros e espécies, como o 16S rRNA, o 23S rRNA e o espaço intergênico (IGS: Intergenic Space) entre estas duas regiões (Fernandes et al 2003).

Uma técnica de grande aplicabilidade na caracterização genotípica de rizóbios é a RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso), que consiste numa técnica molecular rápida, barata e informativa (Williams et al., 1990), pois dispensa o conhecimento prévio da seqüência de DNA alvo e amplifica as seqüências de DNA a partir de um par de iniciadores de seqüência arbitrária (Xavier et al., 2005). Além disso, estudos têm revelado que esse método pode ser uma ferramenta apropriada em estudos da distribuição geográfica de populações de rizóbios (Leite et al., 2009; Shamseldin et al., 2009) e para estudos de diversidade genética e sua relação com características morfológicas, agronômicas e bioquímicas (Koenig & Gepts, 1989; Singh et al., 1991). A aplicação das ferramentas da biologia molecular também tem auxiliado a elucidar mecanismos relacionados ao entendimento da coevolução das leguminosas e bactérias nodulíferas e como esses mecanismos ativaram processos genéticos em ambos os simbioses.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, A. C. F.; AMORIM, A. P.; COELHO, K. P.; MOURA, E. G. Environmental and agricultural benefits of a management system designed for sandy loam soils of the humid tropics. **R. Bras. Ci. Solo**. 33: 1473-1480, 2009.
- AGUIAR, A. C. F.; BICUDO, S. J.; COSTA SOBRINHO, J. R. S.; MARTINS, A. L. S.; COELHO, K. P.; MOURA, E. G. Nutrient recycling and physical indicators of an alley cropping system in a sandy loam soil in the pre-Amazon region of Brazil. **Nutr Cycl Agroecosyst**. 86: 189-198, 2010.
- ALTIERI, M.A. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. **Agriculture Ecosystems and Environment**, Amsterdam, 74: 19-31, 1999.
- AMIJEE, F.; GILLER, K. E. Environmental constraints to nodulation and nitrogen fixation of *Phaseolus vulgaris* L. in Tanzania, I. A survey of soil fertility, root nodulation and Multilocational responses to rhizobium inoculation. **African Crop Science**, 6: 159-169. 1998.
- ANDRADE, D. S.; MURPHY, P. J.; GILLER, K. E. The diversity of *Phaseolus*-nodulating rhizobial populations is altered by liming in acid soil planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, New York, 68: 4025-4034, 2002.
- ARAÚJO, A. S. F. de. CARVALHO, E. M. de S. Fixação biológica de nitrogênio em leguminosas. **Comunicado Técnico**, 11: 1-4, 2006.
- ARANJUELO, I.; IRIGOYEN, J. J. NOGUÉS, S.; SÁNCHEZ-DÍAZ, M. Elevated CO<sub>2</sub> and water-availability effect on gas exchange and nodule development in N<sub>2</sub>-fixing alfalfa plants. **Environmental and Experimental Botany**, 65: 18–26, 2009.
- AYNABEBA, A.; FASSIL, A.; ASFAW, H.; ENDASHAW, B. Studies of Rhizobium inoculation and fertilizer treatment on growth and production of faba bean (*Vicia faba*) in some yield depleted and yield sustained regions of Semien Showa. **SINET: Ethiopian Journal of Science**, 24: 197-211. 2001.
- BALA, A.; GILLER, K. E. Symbiotic specificity of tropical tree rhizobia for host legumes. **New Phytol**. 149: 495-507. 2001.
- BRADY, N.C. Alternatives to slash-and-burn: a global imperative. **Agriculture Ecosystem Environment**, 58: 3-11, 1996.
- BROWN, S.; LUGO, A. E. Rehabilitation of tropical lands: A Key sustaining development. **Restoration Ecology**, 2: 97-111, 1994.
- BOWEN, G. D.; KENNEDY, M. M. Effect of high soil temperature on Rhizobium spp. **Queensl J Agric Res** 16: 177–197. 1959.

- CHAGAS JR, A. F. **Características agronômicas e ecológicas de rizóbios isolados de solos ácidos e de baixa fertilidade da Amazônia**. Amazonas, 2007. 172 f. Tese (Doutorado) - Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia do Convênio UFAM-INPA, Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, 2007.
- CHAGAS JR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N. Tolerância à acidez e alumínio tóxico por isolados de rizóbios de solos no Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**.39: 467 – 470, 2009.
- DANSO SKA, BOWEN GD, SANGINGA N. 1992. Biological Nitrogen Fixation in trees in agroforestry systems. **Plant and Soil**, 141: 177–196, 1992.
- DAY JM, ROUGHLEY RJ, EAGLESHAM ARJ, DYE M, WHITE SP. Effect of high soil temperatures on nodulation of cowpea, *Vigna unguiculata*. **Ann Appl Biol** 88: 476–481, 1978.
- DIAS, L. E.; GRIFFITH, J. J. Conceituação e caracterização de áreas degradadas. In: DIAS, L.E.; MELLO, J. W. V. de (Ed.) **Recuperação de áreas degradadas**. Viçosa: UFV, Departamento de solos; Sociedade Brasileira de Recuperação de Áreas Degradadas, 1988, p. 1-7.
- DRINKWATER, L. E. & SNAPP, S. S. Nutrients in agroecosystems: rethinking the management paradigm. **Adv. Agron.** 92: 163-186, 2007.
- ELSHEIKH, E. A. E. Effects of salt on rhizobia and bradyrhizobia: a review. **Annals of Applied Biology**, Lannham, 132: 507-524, 1998.
- FAGAN, E. B.; MEDEIROS, S. L. P.; MANFRON, P. A.; CASAROLI, D.; SIMON, J.; NETO, D. D.; LIER, Q. DE J.; SANTOS, O.S.; MÜLLER, L. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja – revisão. **Revista da FZVA**. Uruguaiana, 14: 89-106. 2007.
- FARIA, S. M. de. **Obtenção de estirpes de rizóbio na fixação de nitrogênio para espécies florestais** (aproximação 2000). Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. 10 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 116).
- FARIA, S. M. de; CAMPELLO, E. F. C. **Algumas espécies de leguminosas fixadoras de nitrogênio recomendadas para revegetação de áreas degradadas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. 8 p. (Embrapa Agrobiologia. Recomendação Técnica, 7).
- FARIA, S. M de.; FRANCO, A. A. **Identificação de bactérias eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies leguminosas arbóreas**. Seropédica, Embrapa Agrobiologia, 2002. 16 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 158).
- FARIA, S. M. de.; UCHÔAS, **Indicação de Estirpes de Rizóbio Eficientes na Fixação Biológica de Nitrogênio para Espécies de uso Múltiplo** (Atualização ano base 2006). Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 16 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 228).
- FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA, M. Caracterização genética de rizóbios

nativos dos tabuleiros costeiros eficientes em culturas do guandu e caupi. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, 38: 911-920, 2003.

FERRAZ Jr, A. S. L. O cultivo em aléias como alternativa para a produção de alimentos na agricultura familiar do Trópico úmido. In: **Agroambientes de Transição-Entre o trópico úmido e o semi-árido do Brasil. Atributos; alterações; uso na produção familiar.**/ organizado por Emanuel Gomes de Moura. 2 ed. São Luís: UEMA, 2006.

FRANCO, A. A.; CAMPELLO, E. F.; SILVA, E. M. R. da, FARIA, S. M. de. Revegetação de solos degradados. Seropédica, CNPDS 11p., 1992 (EMBRAPA-CNPDS-**Comunicado Técnico** N° 09).

FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, A. L.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; LYRA, M. C. C. P. Caracterização de rizóbios isolados de jacatupé cultivado em solo salino do Estado de Pernambuco, Brasil. **Bragantia**, Campinas, 66: 497-504, 2007.

GARAU, G.; YATES, R. J.; DEIANA, P.; HOWIESON, J. G. Novel strains of nodulating Burkholderia have a role in nitrogen fixation with papilionoid herbaceous legumes adapted to acid, infertile soils. **Soil Biology & Biochemistry**. 41: 125–134, 2009.

GARTEN JR, C.T.; CLASSEN, A.T.; NORBY, R.J.; BRICE, D. J.; WELTZIN, J. F. & SOUZA, L. Role of N<sub>2</sub>-fixation in Constructed Old-field Communities Under Different Regimes of [CO<sub>2</sub>], Temperature, and Water Availability. **Ecosystems**, 11: 125–137, 2008.

GERAHTY, N.; et al. Anatomical analysis of nodule development in soybean reveals an additional autoregulatory control point. **Plant Science**, 58: 1-7, 1992.

GONZÁLEZ, T.O.; CAMPANHARO, J. C. & LEMOS, E. G. de M. Genetic characterization and nitrogen fixation capacity of *Rhizobium* strains on common bean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 43: 1177-1184, 2008.

HASHEM, F. M.; SWELIM, D. M.; KUYKENDALL, L. D.; MOHAMED, A. I. ABDEL-WAHAB, S.M HEGAZI, N.I. Identification and characterization of salt- and thermo-tolerant Leucaena-nodulating *Rhizobium* strains. **Biol Fertil Soils**. 27:335–341,1998.

HARA, F.A.S.; OLIVEIRA, L.A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 40: 667-672, 2005.

HARDARSON, G. & ATKINS, C. Optimizing biological N<sub>2</sub> fixation by legumes in farming systems. **Plant and Soil**, 252: 41–54, 2003.

HOLSHER, D. Shifting cultivation in easter Amazonia: A case study on the water and nutrient balance. **Plant Research and Development**, Tubingen, 46: 68-87, 1997.

- HUBBELL, D.H. & KIDDER, G. **Biological Nitrogen Fixation**. University of Florida. Ifas Extension, SL, 2003. 164 p.
- HUERGO, L. F. REGULAÇÃO DO METABOLISMO DE NITROGÊNIO EM *Azospirillum brasilense*. Curitiba, 187 p. 2006. (Tese).
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Environmental factors affecting grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, 65:151-164, 2000.
- IGUAL, J. M.; RODRIGUEZ-BARRUECO, C.; CERVANTES, E. The effects of aluminum on nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Casuarina cunninghamiana* Miq. **Plant and Soil**, 190: 41-46, 1997.
- KAMIMURA, K; RINNY, M. Spatial and temporal characteristics of shifting cultivation patches in Kotopanjang dam watershed. **Journal Agriculture Research Quartely**, 32: 47-53, 1998.
- KANG, B.T; REYNOLDS, L.; ATTA-KRAH, A.N. Alley farming. **Advances in Agronomy**, New York, 43: 315-359, 1990.
- KIRK, J. L.; BEAUDETTE, L. A.; HART, M.; MOUTOGLIS, P.; KLIRONOMOS, J. N.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Methods of studying soil microbial diversity. **J. Microbiol. Methods**, 58: 169-188, 2004.
- KOENING, R.; GEPTS, P. Allozyme diversity in wild *Phaseolus vulgaris*: further evidence for two major centers of genetic diversity. **Theoretical and Applied Genetics**, 78: 809-817, 1989.
- LAMBAIS, M. R.; CURY, J. de C.; MALUCHE-BARETTA, C. R.; BÜLL, R. de C.; Diversidade Microbiana nos solos: Definindo Novos Paradigmas. In: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, **Tópicos em Ciência do solo**. Vol IV (2005) – Viçosa, MG, 2005.
- LEITE, A. L.L.; FERRAZ JR, A. S. L.; MOURA, E. G. AGUIAR, A. C.F. Comportamento de dois genótipos de milho cultivados em sistema de aléias preestabelecido com diferentes leguminosas arbóreas. **Bragantia**, Campinas, 67: 875-882, 2008.
- LEITE, J.; SEIDO, S. L.; PASSOS, S. R.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V. Biodiversity of rhizobia associated with cowpea cultivars in soils of the lower half of the São Francisco river valley. **R. Bras. Ci. Solo**, 33:1215-1226, 2009.
- LEWIS, G.; SCHRIRE, B. D. MACKINDER, B. A.; LOCK, J. M. (Ed.) **Legumes in the world**, Royal Botanic Gardens, 2003.

- LIE, T. A. Symbiotic nitrogen fixation under stress conditions. In: LIE, T. A. (ed) **Biological Nitrogen Fixation in Natural and Agricultural Habitats**. Martinis Nijhoff, Hagne. p 117–127, 1971.
- LIMA, A.; PEREIRA, J. P. A. R.; MOREIRA, F. M. S. Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. de solos da Amazônia. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, 40: 1095-1104, 2005.
- LINDSTRO, K.; MURWIRA, M.; WILLEMS, A.; ALTIER, N. The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. **Research in Microbiology**, 161: 453-463. 2010.
- LIU, X. Y.; WANG, E.T.; LI, Y.; CHEN, W. Diverse bacteria isolated from root nodules of trifolium, crotalaria, mimosa grown in the subtropical regions of China. **Arch Microbiol**. 188:1–14, 2007.
- MATSON, P.A; PARTON, W.J.; POWER, A.G.; SWIFT, M.J.G. Agricultural intensification and ecosystem properties, **Science**, Washington, 277: 504-509, 1997.
- MELO, S.R. **Desempenho da Fixação Biológica de Nitrogênio em cultivares de feijão-caupi em Roraima**. Boa Vista, 2009. 63 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2009.
- MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F.G.; BANGEL, E.V.; HESS, P.N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny base on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, 29: 315-332, 2006.
- MOREIRA, F. M. SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2002. 625 p.
- MOURA, E. G. Agroambientais de transição avaliados numa perspectiva da agricultura familiar. In: **Agroambientes de Transição- Entre o trópico úmido e o semi-árido do Brasil. Atributos; alterações; uso na produção familiar.**/ organizado por Emanuel Gomes de moura. 2 ed. São Luís, 2006.
- MOURA, E. G.; ALBUQUERQUE, J. M.; AGUIAR, A. C. F. Growth and productivity of corn as affected by mulching and tillage in alley cropping systems. **Sci. Agric**. 65: 204-208, 2008.
- MOURA, E. G., COELHO, K. P., FREITAS, I. C., AGUIAR, A. C. F. 2009c. Chemical and physical fertility indicators of a weakly-structured Ultisol after liming and mulching. **Scientia Agrícola**, 66: 800 - 805, 2009.

- MOURA, E.G.; SERPA, S. S.; SANTOS, J. G. D.; COSTA SOBRINHO, J. R. S.; AGUIAR, A. C. F. Nutrient use efficiency in alley cropping systems in the Amazon periphery. **Plant and Soil**, 335: 363-371, 2010.
- NÓBREGA, R. S. A.; MOTTA, J. S.; LACERDA, A. M. MOREIRA, F. M. S. Tolerância de bactérias diazotróficas simbióticas à salinidade in vitro. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, 28: 899-905, 2004.
- OLDEMAN, L. R.; LYNDEN, G. W. J. Revisiting the GLSOD methodology. In: LAL, R.; BLUM, W.H.; VALENTINE, C. & STEWART, B.A., eds. **Methods of assessment of soil degradation**. New York, CRC Press, 1998. P.423-440.
- ODUM, E. P. **Ecologia**. Rio de Janeiro, Guanabara. 1988. 434p.
- PAKER CA, TRINICK MJ, CHATEL DL. Rhizobia as soil and rhizosphere inhabitants. In: Hardy RWF, Gibson AH (eds) A treatise on dinitrogen fixation. IV. **Agronomy and ecology**. Wiley, New York, 311-352. 1977.
- PATE, J. S. Temperature characteristics of bacterial variation in legume symbiosis. **Nature**. 192: 637-639, 1961.
- PORROTA, J. A.; TURNBULL, J. W.; JONES, N. Catalyzing native Forest regeneration on degraded tropical lands. **For. Ecol. Manag.**, 99: 1-7, 1997.
- QUESADA, D. M.; FRADE, C.; RESENDE, A. *et al.* A fixação biológica de nitrogênio como suporte para a produção de energia renovável. In: **ENCONTRO DE ENERGIA NO MEIO RURAL**, n. 3, 2003. Campinas. Disponível em: <[http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=MSC0000000022000000100031&lng=en&nrm=iso](http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=MSC0000000022000000100031&lng=en&nrm=iso)> . Acesso em: 03 Jan. 2009.
- REBOUÇAS, M. A. A.; FAÇANHA, J. G. V.; FERREIRA, L. G. R.; PRISCO, J. T. Crescimento e conteúdos de N, P, K e Na em 3 cultivares de algodão sob condições de estresse salino. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, 1: 79-85, 1989.
- REIS, V. M.; OLIVARES, F. L. Vias de penetração e infecção de plantas por bactérias. **Embrapa Agrobiologia. Documentos**, n. 216, 34 p., 2006.
- REIS JUNIOR, F. B.; SILVA, M. F.; TEIXEIRA, K. R. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, 28: 103-113, 2004.

- RODER, W.; PHENGCHANH, S.; KEOBOULAPHA, B. Relationships between soil fallow period, weeds and rice yield in slash-and-burn systems of Laos. **Plant and Soil**, Amsterdam, 176: 27-36,1995.
- RUIZ-DÍEZ, B.; FARJADO, S.; PUERTAS-MEJIA, M. A.; FELIPE, M. R.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M. Stress tolerance, genetic analysis and symbiotic properties of root-nodulating bacteria isolated from Mediterranean leguminous shrubs in Central Spain. **Arch Microbiol**, 191:35–46, 2009.
- SANTOS, C. E. de .R. e. S; STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C. P.; RUNJANEK, N. G.; BORGES, W. L.; BEZERRA, R. V.; FREITAS, A. D. S. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Rev. Bras. Ciênc. Agrár.** Recife, 4: 249-256, 2007.
- SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F. J. Rep-PCR mediated genomic fingerprinting of rhizobia and computer-assisted phylogenetic patterns analysis. **World J Microbiol Biotechnol.** 12:163–174, 1996.
- SHAMSELDIN, A.; EL-SAADANI, M.; SADOWSKY, M.J. & AN, C.S. Rapid identification and discrimination among Egyptian genotypes of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and *Sinorhizobium meliloti* nodulating faba bean (*Vicia faba* L.) by analysis of *nodC*, ARDRA, and rDNA sequence analysis. **Soil Biol. Biochem**, 41:45-53, 2009.
- SILVA, M.C, JR.; SACRANO, F. R.; SOUZA, C.F. Regeneration of an Atlantic Forest formation in the understory of a *Eucalyptus grandis* plantation in Southeast em Brazil. **Journal of Tropical Ecology**, 11: 147- 152. 1995.
- SINGH, S.P.; GUTIÉRREZ, J.A.; MOLINA, A.; URREA, C.; GEPTS, P. Genetic diversity in cultivated common bean: 2- Marker-based analysis of morphologic and agronomic traits. **Crop Science**, 31: 23-29, 1991.
- SINGLETON, P.W.; EL-SWAIFY, S.A.; BOHLOOL, B.B. Effect of salinity on *Rhizobium* growth and survival. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore,44: 884-890, 1986.
- SIQUEIRA, J. O. **Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental.** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão, Centro Nacional de Pesquisa de Soja. – Brasília. EMBRAPA-SPI, 1994. 142p – (EMBRAPA-CNPAF. Documentos, 45).

- SOUZA, L. A. G.; NETO, E. B.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P. Desenvolvimento e nodulação natural de leguminosas arbóreas em solos de Pernambuco. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, 42: 207-217, 2007.
- STRALIOTTO, R.; TEIXEIRA, M.G.; MERCANTE, F.M. Fixação biológica de nitrogênio. In: AIDAR, H.; KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L.F. (Ed.). Produção do feijoeiro-comum em várzeas tropicais. Santo Antônio de Goiás, **Embrapa Arroz e Feijão**, p.121-153, 2002.
- THIES, J. E.; SINGLETON, P. W.; BOHLOOL, B. B. Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced Rhizobia on field-grown legumes. **Appl Environ Microbiol.** 57:19–28. 1991.
- TIMMERS, A.C.J. et al. Refined analysis of early symbiotic steps of the Rhizobium- Medicago interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements. **Development**, 126: 3617-3628, 1999.
- TRIPLETT, E.; SADOWSKY, M. Genetic of competition for nodulation of legumes. **Ann Rev Microbiol.** 46:399–428, 1992.
- VANDAME, P.; GORIS, J.; CHEN, W.-M.; VOS, P.; WILLENS, A. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate of roots of tropical legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, 25: 507-512, 2002.
- WATKIN, E. L. J.; O'HARA, G. W.; GLENN, A. R. Physiological responses to acid stress of an acid-soil sensitive strain of *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. **Soil Biology and Biochemistry**, 35: 621-624, 2003.
- WEIR, B.S. The current taxonomy of rhizobia [Last updated: 16th November, 2008]. Disponível em: <<http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html>>. Acessado em: 20 abr. de 2009.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.A. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 18: 6531-6535, 1990.
- WOOD, M. A mechanism of aluminum toxicity to soil bacteria and possible ecological implications. **Plant and Soil**, 171:63-69, 1995.
- WORKALEMAHU, A. The Effect of Indigenous Root-Nodulating Bacteria on Nodulation and Growth of Faba Bean (*Vicia Faba*) in the Low-Input Agricultural Systems of Tigray Highlands, Northern Ethiopia. **Mekelle University**. 1: 30-43, 2009.

YARED, J.A.G. **A atividade florestal na Amazônia: Diagnóstico e perspectivas.** Palestra apresentada no Seminário “Futuro econômico da Amazônia: Agricultura”. Brasília: 23-25 de maio de 1990. 24p.

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; RUMJANEK, N. G.; FREIRE FILHO, F. R. Variabilidade genética em acessos de caupi. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, 40: 353-359, 2005.

ZAHARAN, H.H. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63: 968-989. 1999.

ZAHARAN, H.H. Rhizobia from Wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. **Journal of Biotechnology**, 91: 143-153, 2001.

ZENGENI, R., MPEPEREKI, S., GILLER, K. E. Manure and soil properties affect survival and persistence of soyabean nodulating rhizobia in small-holder soils of Zimbabwe. **Appl. Soil Ecol.** 32: 232-242. 2006.

**DIVERSIDADE E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE RIZÓBIOS DE GLIRICIDIA,  
LEUCENA E SOMBREIRO ORIUNDOS DE SOLO DO MARANHÃO**

---

**CAPÍTULO II**

## RESUMO

A utilização de leguminosas arbóreas é recomendada para o uso em sistemas agroflorestais e recuperação de áreas degradadas, por sua capacidade de fixação biológica de nitrogênio em simbiose com rizóbios. Este trabalho verificou a ocorrência, diversidade e eficiência de uma comunidade nativa de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de leguminosas (BFNNL), para a *Gliricidia sepium*, *Leucaena leucocephala* e *Clitoria fairchildiana*, em solo da região Centro-Norte do Maranhão. Foi avaliada ainda a resposta da inoculação dessas leguminosas com estirpes comerciais de rizóbios, na presença e ausência de competição com a comunidade nativa. Foram instalados dois experimentos, em casa de vegetação, com delineamento inteiramente casualizado. O primeiro, com substrato estéril, foi composto de 4 tratamentos com 6 repetições: 1- inoculação com inoculantes ; 2-inoculação com suspensão de solo; 3-testemunha nitrogenada; 4-testemunha sem N e sem inoculação. O segundo, em solo não estéril, foi composto por 4 tratamentos com 5 repetições: 1- inoculação A (BR 825-leucena, BR 8003-sombreiro e BR 8801-gliricídia); 2-inoculação B (BR 827-leucena, BR 8007-sombreiro e 8003-gliricídia) e testemunhas. Verificou-se que: a) em solos no Centro-Norte do Maranhão ocorrem bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas, com elevada diversidade fenotípica, capazes de estabelecer simbiose e beneficiar, moderadamente, o crescimento da gliricidia e da leucena, mas ineficientes em beneficiar a nodulação e crescimento do sombreiro; b) o baixo desempenho das estirpes recomendadas para o sombreiro e leucena, em condições de competição com os rizóbios nativos, sugere a busca por estirpes de rizóbios mais eficientes para estas espécies, na região estudada; c) os isolados da comunidade nativa demonstraram boa tolerância a extremos de temperatura e salinidade; d) a maioria dos isolados apresentaram tolerância a pH alcalino (12), mas não a pH ácido (4); e) dentre os isolados indígenas estudados há grande divergência genética, comparados às estirpes padrões, abrindo a possibilidade da existência de genótipos de BFNNL ainda não descritos na região. Os resultados obtidos demonstram a necessidade de estudos relativos a populações indígenas de rizóbios, no Maranhão. A procura por estirpes de rizóbios eficientes e adaptadas as condições climáticas do Estado é imprescindível para a maximização da FBN com as leguminosas leucena, gliricidia e sombreiro.

Palavras-chave: rizóbio; comunidade nativa; leguminosas arbóreas.

**SUMMARY: DIVERSITY AND SYMBIOTIC EFFICIENCY OF RIZOBIA NODULATING *Gliricidia sepium*, *Leucaena leucocephala* and *Clitoria Fairchildiana* IN A MARANHÃO SOIL, BRAZIL**

Legume trees are recommended in agroforestry systems and degraded land restoration for their ability to fix nitrogen in symbiosis with rhizobia. This study evaluated the occurrence, diversity and efficiency of a native rhizobia community for the legumes *Gliricidia sepium*, *Leucaena leucocephala* and *Clitoria fairchildiana* in a soil from center-north Maranhão (Brazil). To evaluate efficiency, the response of these legume trees to commercial inoculants was evaluated with and without the native community. Two greenhouse experiments were settled in a complete random design. The experiment 1 with sterile substrate had 4 treatments and 6 repetitions: 1- inoculation with commercial inoculants; 2- inoculation with soil suspension; 3- control with mineral nitrogen; 4- control without nitrogen and nor inoculation. The experiment 2 with non-sterile soil had 4 treatments and 5 repetitions: 1- inoculation with inoculants BR 825, BR 8003 and BR 8801 for *L. leucocephala*, *C. fairchildiana* and *Gliricidia sepium*, respectively; 2- inoculation with inoculants BR 827, BR 8007 e BR 8003 for the same legumes; 3- control with mineral nitrogen; 4- control without nitrogen and nor inoculation. Main results were: a) the native community had rhizobia efficient to nodulate and enhance *G. sepium* and *L. leucocephala* growth; but, low ability and efficiency to nodulate *C. fairchildiana*; b) low competitiveness of commercial inoculants for *C. fairchildiana* nodulation suggests that efficient inoculants have to be further searched in the native community; c) isolates from native communities studied tolerates better extreme temperature and salinity; d) most of isolates tolerated high pH (12) but not low pH (4); e) local community showed great genetic diversity compared with commercial inoculants, suggesting the occurrence of new rhizobia genotypes in the region. These results reinforce the need to further study indigenous communities of rhizobia in Maranhão. The search for strains efficient and adapted to the state climate is essential to maximize the BNF with legumes *L.leucocephala*, *G. sepium* and *C. fairchildiana*.

Keywords: rhizobia, native community; leguminous trees.

## INTRODUÇÃO

No Estado do Maranhão predominam, inclusive entre os pequenos agricultores, agrossistemas pouco produtivos e potencialmente degradadores do solo e meio ambiente. Neste contexto destaca-se a agricultura itinerante (corte e queima) por sua capacidade de produzir reflexos negativos econômica e ambientalmente, a exemplo da: diminuição da produtividade agrícola, perda de nutrientes, redução da biodiversidade local e emissão de gases do efeito estufa (Roder et al., 1995; Matson et al., 1997; Altieri, 1999), resultando, em muitos casos, no surgimento de grandes extensões de áreas degradadas.

Segundo Drinkwater & Snapp (2007), a adoção intencional de práticas que aumentem o acúmulo de nutrientes no solo, por meio de processos microbiologicamente mediados, consiste numa alternativa mais adequada para garantir a sustentabilidade de agroecossistemas.

O nitrogênio é um elemento essencial para a manutenção de qualquer agroecossistema, sendo considerado, juntamente com a água, o fator mais limitante para o desenvolvimento da produção agrícola (Parry et al., 2005; Glass, 2003). A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é um importante processo que incorpora N da atmosfera nos ecossistemas terrestres (Garten Jr et al., 2008) e representa uma alternativa mundialmente econômica e sustentável de fornecimento deste nutriente, via cultivo de leguminosas (Gonzalez et al., 2008). De acordo com Xavier et al. (2006) em ambientes tropicais, a importância da FBN está relacionada com a baixa disponibilidade de nitrogênio nos solos, agravada pela lixiviação desse macronutriente. A utilização de leguminosas arbóreas é comum em sistemas agroflorestais e na recuperação de áreas degradadas devido a sua alta capacidade de produção de biomassa e FBN (Moura et al., 2010; Aguiar et al., 2010; Leite et al., 2008; Costa et al., 2004).

A eficiência da FBN para a agricultura e recuperação de áreas degradadas depende, sobretudo, da existência local ou fornecimento de estirpes eficientes de bactérias fixadoras de N para as espécies hospedeiras envolvidas no processo. Isso porque a inoculação com rizóbios oriundos de regiões ecologicamente diferentes nem sempre é capaz de incrementar a FBN, devido à falta de competitividade destas em relação aos rizóbios indígenas ou tolerância limitada as novas condições ambientais (Chagas Jr., 2007; Lindstro et al., 2010). Logo, a prospecção em loco da nodulação natural de espécies arbóreas, associada a um programa de seleção de novas estirpes, com posterior aplicação de testes de eficiência agrônômica com estirpes potenciais e recomendadas, são estratégias necessárias para a definição das melhores combinações hospedeiro-simbionte a serem utilizadas (Souza et al., 2007).

A caracterização fenotípica, genotípica e o entendimento do comportamento dos diversos membros das comunidades indígenas de rizóbios, em relação aos fatores ambientais, também auxiliam na busca por combinações simbióticas eficientes. Entre as leguminosas arbóreas de maior interesse, no Maranhão, destacam-se a leucena (*Leucaena leucocephala*), a gliricídia (*Gliricidia sepium*) e sombreiro (*Clitoria fairchildiana*), este último nativo da região, por sua grande aplicabilidade no sistema de cultivo em aléias e potencial uso na recuperação de áreas degradadas.

Em virtude do exposto, este trabalho teve como objetivos verificar a ocorrência, diversidade e eficiência simbiótica de uma comunidade nativa de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de leguminosas (BFNNL), para a *G. sepium*, *L. leucocephala* e *C. fairchildiana*, em solo da região Centro-Norte do Maranhão. Esse estudo também verificou a resposta da inoculação dessas leguminosas com estirpes recomendadas de rizóbios (BR 825 e BR 827, para leucena; BR 8003 e BR 8007, para sombreiro; BR 8801 e BR 8803 para gliricídia), em competição com a comunidade indígena estudada.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Área experimental e estirpes de rizóbios recomendadas**

Os experimentos foram realizados no Núcleo Tecnológico de Engenharia Rural da Universidade Estadual do Maranhão, em casa de vegetação. Foi utilizado um PLINTOSSOLO ARGILÚVICO Distrófico típico proveniente de uma área de produção familiar (área de roça - sistema de corte e queima), localizada no Município de Miranda do Norte - MA, a 36° 36' de latitude sul e 45° 24' de longitude oeste, no assentamento Tico-tico – INCRA (Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária). A amostragem da área foi realizada no início do período chuvoso (Janeiro de 2009), em zigue-zague, foram obtidas quatro amostras compostas de solo, cada uma resultante da retirada e homogeneização de seis amostras simples, retiradas na profundidade de 0-20 cm. Essas amostras foram utilizadas para análise química e para o experimento em vasos de Leonard. Para o experimento com substrato não estéril foram retirados cerca de 250 kg de solo da mesma área em igual profundidade, em locais próximos dos pontos amostrados.

A análise química do solo foi realizada conforme metodologia do IAC (2001), o resultado encontra-se na tabela 1. Foram realizados dois experimentos, um em substrato estéril e outro em solo (não estéril) para comparar a ação de estirpes de rizóbios previamente testadas e recomendadas pela EMBRAPA Agrobiologia e da comunidade nativa de rizóbios sob o crescimento de três

espécies arbóreas, a glirícidia (*Gliricidia sepium*), a leucena (*Leucaena leucocephala*) e o sombreiro (*Clitoria fairchildiana*).

As estirpes utilizadas nos ensaios em substrato estéril e não estéril foram a BR 825 e BR 827 para a leucena; BR 8003 e BR 8007 para o sombreiro; BR 8801 e BR 8803 para a glirícidia. As estirpes foram fornecidas como culturas liofilizadas em ampolas. Após o recebimento estas foram recuperadas em meio 79 (YMA) (Fred & Waksman, 1928), líquido, posteriormente essa suspensão foi transferida com auxílio de alça de platina para placas de Petri contendo meio YMA. Essas placas foram mantidas em incubadora tipo BOD a 28°C durante oito dias para crescimento das colônias. Os inóculos foram preparados por meio da transferência de colônias das placas para Erlenmeyers contendo 50 ml de meio YMA semi-sólido, estes foram mantidos a 28°C, sob agitação constante, durante seis dias, quando se verificou o crescimento das colônias. As inoculações foram realizadas no momento do plantio adicionando-se um ml do inóculo para cada semente.

**Tabela1.** Análise química do solo proveniente da área de estudo.

M.O	pH	P	K	Ca	Mg	H+Al	Na	Al	C
g/dm <sup>3</sup>	CaCl <sub>2</sub>	mg/dm <sup>3</sup>	.....mmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> .....						%
32	4,8	2,2	3,7	47,5	14	44	6,1	5	1,85

### Ensaio em vaso de Leonard

O ensaio em substrato estéril foi realizado em vasos de Leonard (Vincent 1970). A parte superior dos vasos continha areia e vermiculita na proporção de 1:1 (v:v), enquanto a parte inferior continha solução nutritiva de Hoagland sem nitrogênio, exceto o tratamento controle nitrogenado, o qual recebeu solução completa (Hoagland & Arnon, 1950). Em ambas as situações, a solução nutritiva continha apenas 50% da concentração original. Os vasos foram esterilizados em autoclave por 1,5 horas à pressão de 1,5 atm e 127°C, enquanto a solução nutritiva foi esterilizada por 20 minutos sob a mesma pressão e temperatura.

As plantas iscas utilizadas foram a glirícidia, a leucena e o sombreiro, suas sementes foram pré-selecionadas por uniformidade de tamanho e sanidade. Antes da germinação, as sementes foram desinfestadas superficialmente com solução de hipoclorito a 1% de cloro, por quatro minutos. Além da desinfestação, as sementes de leucena passaram por quebra de dormência, por imersão em água a

80°C e embebição por 3 horas. Foram semeadas quatro sementes por vaso e 15 dias após o plantio foi realizado o desbaste, permanecendo duas plantas por vaso.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com seis repetições. Os tratamentos para cada espécie vegetal foram: 1- inoculação conjunta das estirpes recomendadas (BR 825 + BR 827 para a leucena; BR 8003 + BR 8007 para o sombreiro e BR 8801 + BR 8803 para a gliricidia); 2- inoculação com suspensão de solo (diluição  $10^{-1}$ , em solução salina de NaCl a 0,55%); 3- controle com nitrogênio; 4- controle absoluto (sem inoculação e sem nitrogênio). Os inóculos com as estirpes recomendadas foram preparados separadamente para cada estirpe e misturados, em igual proporção, no momento da inoculação. As plantas permaneceram em casa de vegetação por 90 dias após a implantação.

### **Ensaio em vasos com solo**

O solo da área estudada foi colocado em vasos plásticos com capacidade para 3 dm<sup>3</sup> e recebeu calcário dolomítico com o objetivo de elevar a saturação por bases a 60% (Raij, 1981). Sementes de gliricidia, leucena e sombreiro passaram pelo mesmo processo de desinfestação e quebra de dormência anteriormente descritos e foram semeadas. Após o desbaste manteve-se apenas duas plantas por vaso. O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, com cinco repetições. Os tratamentos estudados para cada hospedeiro foram: 1-inoculação com estirpe A; 2-inoculação com estirpe B, 3-testemunha nitrogenada e 4-solo sem adubação nitrogenada e sem inoculação (testemunha absoluta). A “estirpe A” refere-se a BR 825 para a leucena, 8801 para a gliricidia e 8003 para o sombreiro e a “estirpe B” refere-se a BR 827 para a leucena, 8803 para a gliricidia e 8007 para o sombreiro.

A produção dos inoculantes e o procedimento de inoculação foram realizados conforme anteriormente descrito. A adubação foi realizada por meio da aplicação de solução nutritiva de Hoagland completa para testemunha nitrogenada (N total = 105 mg de N-NO<sub>3</sub> por vaso) e solução nutritiva de Hoagland sem nitrogênio para os demais tratamentos. No primeiro mês aplicou-se cerca de 50 ml de solução nutritiva por vaso, a cada sete dias, posteriormente adotou-se o intervalo de 15 dias. Também aplicou-se adubação complementar de potássio e fósforo, via solução de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, totalizando 100 mg de fósforo e 126 mg de potássio por dm<sup>3</sup> de solo. As plantas foram conduzidas em casa de vegetação por 120 dias após a implantação do ensaio.

### **Parâmetros de nodulação e crescimento das leguminosas avaliados**

Tanto para o experimento em substrato estéril quanto para em solo natural, foram avaliados o peso seco da parte aérea (PSPA) das plantas, após secagem em estufa de circulação forçada de ar a temperatura de 60 °C por 72 horas, número de nódulos e peso seco dos nódulos. Além disso, foi calculada a eficiência relativa, que consiste na eficiência de acúmulo de massa seca dos tratamentos inoculados em relação a testemunha nitrogenada, e a eficiência absoluta, eficiência de acúmulo de massa seca dos tratamentos inoculados em relação a testemunha absoluta, da comunidade nativa de BFNNL para o crescimento dos hospedeiros. A eficiência relativa foi calculada segundo a expressão:

$$Efr=(MSPAinoculado / MSPAcom N)x100$$

Sendo: *Efr*= eficiência relativa; *MSPAinoculado*= massa seca da parte área do tratamento inoculado; *MSPAcom N*= massa seca da parte aérea da testemunha nitrogenada (média das repetições).

A eficiência absoluta foi calculada segundo a expressão:

$$Efa=(MSPAinoculado / MSPAsem N) x 100$$

Sendo: *Efa*= eficiência absoluta; *MSPAinoculado*= massa seca da parte área do tratamento inoculado; *MSPAsem N*= massa seca da parte aérea da testemunha absoluta (média das repetições).

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância com comparação de médias pelo teste LSD a 5%.

### **Captura, isolamento e caracterização fenotípica dos rizóbios da comunidade indígena**

Após a coleta do experimento com solo, as raízes das plantas do tratamento testemunha absoluta (sem inoculação e sem adubação nitrogenada) foram lavadas e seus nódulos retirados, foram amostrados, ao acaso, quarenta e cinco nódulos de cada leguminosa. Os nódulos foram distribuídos em três frascos de polietileno contendo sílica gel, constituindo-se três repetições para cada leguminosa, e conservados em geladeira para subsequente isolamento dos rizóbios. Para o isolamento, três nódulos de cada repetição foram utilizados, um pequeno, um médio e um grande, com o objetivo de acessar a comunidade nativa da forma mais abrangente possível. Os nódulos foram primeiramente desinfestados, sendo imersos em álcool 70% por um minuto, depois em

hipoclorito de sódio 1% por 3 minutos e lavados quatro vezes em água destilada esterilizada. Em seguida foram colocados em tubos de extração, contendo água estéril, durante trinta minutos, para reidratação. Após a desinfestação e reidratação, os nódulos foram macerados e a suspensão resultante foi riscada em placas de Petri contendo meio YMA, sob condições assépticas. As placas foram incubadas a 28°C e sucessivas repicagens foram feitas para a obtenção de colônias puras.

As características dos rizóbios observadas foram: 1- tempo em dias para o aparecimento das colônias isoladas, sendo estas classificadas em muito rápida (1 dia), rápida (2 ou 3 dias), intermediária (4 a 5 dias), lenta (5 a 10 dias) e muito lenta (acima de 10 dias); 2- diâmetro da colônia; 3- cor da colônia; 4 - forma da colônia, 5-produção de goma (baixa, média ou alta); 6- consistência (viscosa, gomosa, coriácea); 7- densidade (opaca ou translúcida); 8- elevação (convexa ou plana) e 9- alteração do pH (ácida, neutra ou alcalina).

Uma matriz binária foi construída a partir das características dos rizóbios e os isolados foram agrupados por meio do método UPGMA (**U**nweighted **P**air **G**roup **M**ethod with **A**rithmetic **M**ean) baseado no índice de Jaccard (J), usando o programa NTSYSpc versão 2.1 (Rohlf, 1992) para geração de um dendrograma de similaridade fenotípica. O UPGMA é denominado método da distância média e utiliza a média das distâncias entre todos os pares de genótipos para formação de cada grupo (Bertan et al., 2006).

### **Tolerância a fatores abióticos**

Para os testes de tolerância ao pH, salinidade e temperatura, os isolados foram primeiramente cultivados em placas de Petri contendo meio YMA (Fred & Waksman, 1928) a pH 6,5 e incubados a 28°C por cinco dias.

Teste de tolerância a extremos de acidez e alcalinidade: os isolados foram transferidos para o meio YMA com pH regulado para 4,0, com ácido acético (absoluto) e 12, com hidróxido de potássio (1M), acrescido de 5 ml/l de azul de bromotimol (0,5 g/l) e incubados a 28°C.

Teste de salinidade: os isolados foram transferidos para placas contendo meio YMA modificado a pH 6,5, acrescido de 1%, 2% e 3% de NaCl.

Teste de resistência a temperatura: os isolados foram transferidos para placas contendo meio YMA, logo após a riscagem as placas foram mantidas a temperatura de 45°C em incubadora.

Todos os testes foram realizados em triplicata, o crescimento das colônias foi observado aos 3, 6, 9 e 12 dias, para cada teste. Uma matriz binária foi construída a partir das características de tolerância dos isolados ao pH, salinidade e temperatura e estes foram agrupados por meio do método UPGMA baseado no índice de Jaccard (J), usando o programa NTSYSpc versão 2.1 (Rohlf, 1992) para geração de um dendograma de similaridade com base no perfil de tolerância a fatores abióticos.

### **Extração de DNA, amplificação do gene 16s do DNAr e Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA).**

Para acessar a diversidade genotípica, foram utilizados 24 isolados de rizóbios representativos dos 53 obtidos, sendo 11 provenientes de nódulos de glirícidia e 13 de leucena. Devido a baixa nodulação, diversidade de isolados e eficiência da comunidade nativa de rizóbios para o crescimento do sombreiro, os poucos isolados provenientes dos nódulos dessa leguminosa foram excluídos da avaliação genotípica. A avaliação da diversidade fenotípica serviu como parâmetro para a escolha dos isolados mais diversos e representativos dos grupos, sendo que apenas um representante de cada grupo com elevada similaridade fenotípica foi escolhido para a avaliação genotípica.

Os isolados em colônias puras foram transferidos para placas contendo meio de cultura YMA e incubados a 28°C até apresentarem crescimento, cerca de 5 dias devido os isolados serem quase todos de crescimento rápido e muito rápido. Após o crescimento das colônias, uma pequena quantidade de massa celular foi transferida, com auxílio de alça de platina, para microtubos contendo 600 µL de tampão TES (0,05 mol L<sup>-1</sup> NaCl, 0,01 mol L<sup>-1</sup> de Tris HCl SDS 1 %, pH 8), após esse procedimento a extração do DNA seguiu conforme protocolo proposto por Xavier et al. (2004). O DNA extraído foi purificado, conforme metodologia proposta por Ferreira & Grattapaglia (1998). Subsequentemente, a extração e qualidade do DNA obtido foi confirmada por meio da visualização após eletroforese em gel de agarose 0,8% horizontal em tampão TBE 0,5% a 80 V constante, corado com brometo de etídeo, utilizando marcador de peso molecular 1 Kb.

A reação de PCR (polymerase chain reaction) foi dimensionada para um volume final de 50 µL, contendo 1X de tampão de reação, 1,5 µmol L<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub>, 2,5 U de Taq DNA polymerase, 200 µmol L<sup>-1</sup> de dNTP, 0,2 µmol L<sup>-1</sup> de cada primer e 2 µL de DNA extraído dos isolados, diluído 1:50. Os primers utilizados foram o 27F 5'AGAGTTTGATC(A/C)TGGCTCAG3' e o oligonucleotídeo

reverso universal 1492R 5'TACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT3' (Weissburg et al., 1991). A amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 93°C por 1 min, 57°C por 1 min, 72°C por 2 min e uma extensão final a 72°C por 10 min. O resultado foi analisado em gel de agarose 1% horizontal em tampão 0,5% a 85 V, corado com brometo de etídeo, usando o marcador de peso molecular  $\phi$ X174 nos poços iniciais e finais do gel (Invitrogen cat. No. 10488-037).

As análises de restrição foram realizadas com as endonucleases DdeI, MspI e HinfI, usando 6  $\mu$ L de DNA amplificado, de acordo com as recomendações do fabricante. A digestão do DNA ocorreu após a mistura do DNA com o mix incubando-o a 37°C por 4 horas e, o resultado foi analisado em gel de agarose 3% horizontal em tampão TBE 0,5% por 3 horas a 75V constante, usando o marcador de peso molecular  $\phi$ X174 nos poços iniciais e finais do gel (Invitrogen cat. No. 10488-037). Os fragmentos de DNA digeridos foram analisados usando o programa Gel Compar 2.0, foram aplicados o coeficiente de Jaccard e o método UPGMA de agrupamento para a construção de um dendograma de similaridade genotípica.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Experimento em vaso de Leonard**

Na área estudada ocorre uma comunidade de BFNNL capaz de colonizar abundantemente e beneficiar o crescimento das leguminosas arbóreas estudadas, exceto o sombreiro (Tabela 2). Nenhum vestígio de nodulação foi verificado nas testemunhas não inoculadas, evidenciando a adequada condição de condução do experimento.

A glirícidia apresentou boa nodulação com as bactérias nativas, tendo este tratamento inclusive superado, numericamente, as estirpes recomendadas (Tabela 2). Isto refletiu em um desenvolvimento vegetativo semelhante ao obtido com as estirpes recomendadas, porém inferior ao tratamento com N mineral. Este fato sugere a existência de uma comunidade nativa de bactérias compatível com esta leguminosa e eficiente em proporcionar seu desenvolvimento vegetal, como observado pela eficiência no acúmulo de biomassa, equivalente ao inoculante recomendado e cerca de 500% superior à testemunha absoluta. Apesar de ser uma espécie exótica, a glirícidia se adaptou bem aos rizóbios locais, o que otimiza sua utilização em sistemas agrícolas e na recuperação de áreas degradadas no Centro-Norte do Maranhão.

Com relação à leucena verificou-se que, apesar do menor desempenho tanto em número quanto em peso de nódulos da comunidade nativa em relação ao inoculante recomendado, o acúmulo de massa seca e a eficiência relativa e absoluta foram semelhantes nos dois tratamentos. Isso indica a boa resposta da comunidade nativa de BFNNL da área em relação ao desenvolvimento dessa leguminosa, em condições estéreis, o que é enfatizado pela Efr em torno de 70% da testemunha nitrogenada e Efa muito elevada em relação a testemunha absoluta. Entretanto, assim como ocorreu com a gliricídia, a comunidade nativa demonstrou desempenho inferior para o acúmulo de massa seca quando comparada a testemunha nitrogenada (Tabela 2). A elevada promiscuidade da leucena (Florentino et al., 2009), provavelmente influenciou na boa resposta de seu desenvolvimento em simbiose com bactérias indígenas.

No que diz respeito ao sombreiro, verificou-se uma reduzida nodulação quando associado à bactérias nativas, com reflexo negativo para o crescimento da planta, porém se beneficiou plenamente das estirpes recomendadas e da adubação nitrogenada. Estes resultados indicam a existência de uma comunidade indígena de rizóbios ineficiente ou incompatível com o sombreiro. Segundo Souza et al. (2007), uma leguminosa formará nódulos e se beneficiará da fixação biológica de nitrogênio, em dado local, se populações nativas de rizóbios compatíveis estiverem presentes no solo. Verificou-se um comportamento altamente seletivo dessa espécie vegetal com a comunidade nativa de rizóbios. Isto sugere a necessidade de inoculação com estirpes selecionadas ou adubação nitrogenada complementar para o adequado crescimento do sombreiro, nas condições estudadas.

**Tabela 2.** Peso Seco da Parte Aérea (PSPA), Peso dos Nódulos (PN), Número de Nódulos (NN), Eficiência Relativa (Efr) e Eficiência absoluta (Efa) obtidos no experimento em vasos de Leonard, utilizando a leucena, sombreiro e gliricídia como plantas iscas.

PLANTA ISCA	TRATAMENTO	PSPA (g)	PN (g)	NN	Efr (%)	Efa (%)
GLIRICÍDIA	INOCULADO	8,38 ab	0,81 a	469,27 b	81,32 b	682,54 ab
	INOCULADO SOLO 10 <sup>-1</sup>	7,45 b	0,78 a	676,00 a	72,58 b	606,54 b
	TEST NITROGENADA	10,25 a	0,00 b	0,00 c	100,00 a	853,07 a
	TEST ABSOLUTA	1,20 c	0,00b	0,00 c	11,57 c	100,00 c
LEUCENA	INOCULADO	4,30 ab	0,66 a	333,23 a	76,65 b	1716,60 b
	INOCULADO SOLO 10 <sup>-1</sup>	4,08 b	0,26 b	24,27 b	72,85 b	1632,00 b
	TEST NITROGENADA	5,62 a	0,00 c	0,00 c	100,00 a	2249,13 a
	TEST ABSOLUTA	0,25 c	0,00 c	0,00 c	4,66 c	100,00 c
SOMBREIRO	INOCULADO	4,06 a	0,46 a	184,33 a	89,75 a	471,63 a
	INOCULADO SOLO 10 <sup>-1</sup>	1,46 b	0,007 b	1,33 b	32,33 b	170,15 b
	TEST NITROGENADA	4,52 a	0,00 b	0,00 b	100,00 a	524,42 a
	TEST ABSOLUTA	0,86 b	0,00 b	0,00 b	19,03 b	100,00 b

Médias seguidas pela mesma letra, para cada hospedeiro, não diferem entre si pelo teste LSD a 5%.

### Experimento em vaso com solo

A inoculação das estirpes recomendadas em vaso com solo não resultou em benefício para o crescimento das plantas, em relação à testemunha absoluta (Tabela 3). Isto indica a baixa capacidade competitiva das estirpes recomendadas frente a comunidade nativa, o que segundo Triplett & Sadowsky (1992), é uma das principais causas de falhas de inoculação quando novos isolados, provenientes de áreas ecologicamente diferentes, são introduzidas em solos com grande número de estirpes indígenas. Isto pode ser notado mais pronunciadamente no caso do sombreiro, no qual as estirpes recomendadas apresentaram desempenho de acúmulo de massa seca e eficiência

muito inferiores aos obtidos pela testemunha nitrogenada, assemelhando-se a comunidade nativa, o que não ocorreu em condições estéreis.

Com relação ao número de nódulos da leucena, verificou-se que, apesar da maior nodulação apresentada pela estirpe BR 827, esta não foi suficiente para determinar um melhor desempenho em termos de ganho de massa seca deste tratamento. Esse fato pode estar relacionado com a existência de muitos nódulos inativos, pois não houve diferença significativa para o peso de nódulos de leucena, tendo o mesmo ocorrido com a BR 8803 e a glirícidia (Tabela 3).

A baixa nodulação (Tabelas 2 e 3) e baixo número de isolados obtidos (Figura 3), utilizando o sombreiro como planta isca, expressa uma baixa promiscuidade dessa leguminosa em relação aos rizóbios nativos da região Centro-Norte do Maranhão. Resultados contrastantes foram obtidos por Souza et al (2007), que observou nodulação natural abundante, eficiente fixação de  $N_2$  e compatibilidade com as populações de rizóbios nativas do solo, neste caso, na Zona da Mata de Pernambuco. O mesmo estudo demonstrou ainda que o sombreiro concentrou o maior potencial para fixação de  $N_2$  e maior eficiência de nodulação com populações nativas de rizóbios, em comparação com outras espécies testadas pelo autor.

A diferença de nodulação apresentada pela mesma leguminosa, em diferentes áreas, está relacionada a fatores ligados a composição da comunidade nativa de rizóbios, ao hospedeiro e ao ambiente. Como exemplo, é um fator relevante para o sucesso da ocupação dos nódulos pelas bactérias, a seletividade simbiótica dos genótipos vegetais, cuja especificidade pode ter sido o fator principal nas modificações das populações de *Rhizobium* no solo (Paffetti et al., 1998). As sementes de sombreiro utilizadas no experimento não foram provenientes da área estudada, logo, isso pode ter contribuído para a baixa nodulação dessa espécie, resultante de uma possível incompatibilidade hospedeiro-simbionte.

Estes resultados indicam ainda a necessidade de mais estudos sobre comunidades nativas de rizóbios, a fim de obter isolados, para espécies de leguminosas de interesse, competitivos e adaptados as condições locais, e elevar a FBN. Segundo Figueiredo et al. (2001), em regiões onde ocorre uma grande diversidade de espécies nativas de bactérias fixadoras de nitrogênio, com baixo grau de eficiência, é necessária a obtenção de estirpes de rizóbios de alta qualidade, capazes de sobreviver e competir pela fixação eficiente do nitrogênio atmosférico com o hospedeiro alvo. A obtenção dessas estirpes pode ser uma alternativa à aplicação de fertilizantes nitrogenados, que, neste caso, está demonstrando ser a opção mais eficiente para a maximização do desenvolvimento vegetativo, principalmente do sombreiro.

O baixo desempenho da testemunha nitrogenada para o crescimento da glirícidia é indicativo da maior demanda de nitrogênio pela espécie, nas condições estudadas. Isto é confirmado pela eficiência relativa obtida na testemunha absoluta e nos tratamentos inoculados, muito superiores à observada na testemunha nitrogenada (Tabela 3).

**Tabela 3.** Peso Seco da Parte Aérea (PSPA), Peso dos Nódulos (PN), Número de Nódulos (NN), Eficiência Relativa (Efr) e Eficiência absoluta (Efa) obtidas no experimento com substrato não estéril (vasos contendo solo).

PLANTA ISCA	TRATAMENTO	PSPA (g)	PN (g)	NN	Efr (%)	Efa (%)
GLIRICIDIA	INOCULADO BR 8801	8,58 a	0,35 b	13,12 b	130,01 a	96,39 a
	INOCULADO BR 8803	8,11 a	0,48 a	25,00 a	122,99 a	91,18 a
	COMUNIDADE NATIVA	8,89 a	0,21 b	15,40 b	134,88 a	100,00 a
	TEST NITROGENADA	6,59 b	0,33 ab	19,00 ab	100,00 b	74,14 b
LEUCENA	INOCULADO BR 825	2,83 ab	0,48 <sup>ns</sup>	136,84 b	80,94 ab	115,21 ab
	INOCULADO BR 827	2,31 b	0,43 <sup>ns</sup>	393,06 a	65,96 b	93,88 b
	COMUNIDADE NATIVA	2,45 b	0,46 <sup>ns</sup>	105,72 b	70,25b	100,00 b
	TEST NITROGENADA	3,49 a	0,46 <sup>ns</sup>	176,50 b	100,00 a	142,34 a
SOMBREIRO	INOCULADO BR 8003	4,15 b	0,13 <sup>ns</sup>	83,32 a	66,61 b	104,84 b
	INOCULADO BR 8007	3,97 b	0,09 <sup>ns</sup>	42,62 b	63,69 b	100,25 b
	COMUNIDADE NATIVA	3,96 b	0,07 <sup>ns</sup>	37,50 b	63,53 b	100,00 b
	TEST NITROGENADA	6,24 a	0,03 <sup>ns</sup>	9,84 c	100,00 a	157,39 a

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste LSD a 5%.

### Caracterização morfocultural e diversidade fenotípica

Foram obtidos ao todo 53 isolados de bactérias nodulíferas das leguminosas estudadas, sendo 18 provenientes dos nódulos de glirícidia, 30 de leucena e apenas cinco de sombreiro. Entretanto, apenas 31 isolados se apresentaram morfoculturalmente distintos sendo 17 de leucena, 11 de glirícidia e três de sombreiro, apenas estes foram utilizados na construção do dendograma de

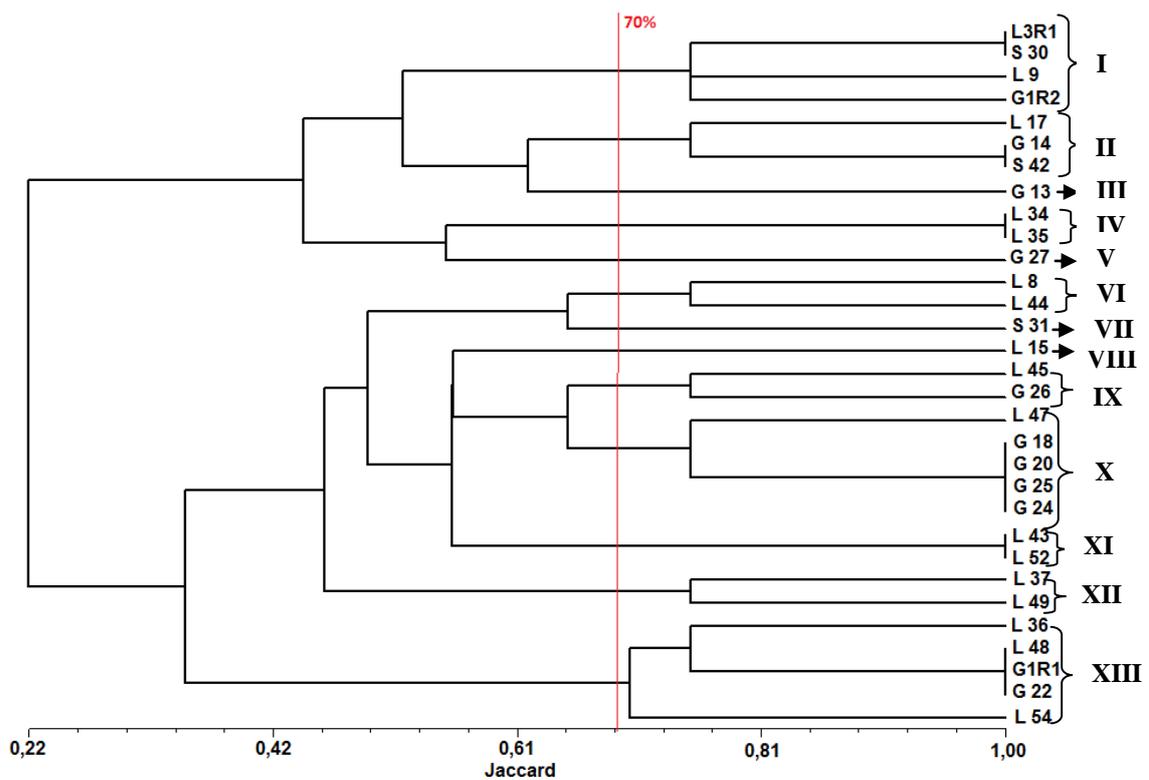
diversidade fenotípica. Os isolados obtidos e seus respectivos grupos estão representados na Tabela 4. O agrupamento dos rizóbios, de acordo com suas características morfo culturais resultou em treze grupos distintos. Os grupos I, X e XIII, foram os que reuniram o maior número de isolados, englobando isolados provenientes das três leguminosas utilizadas como planta-isca. Além disso, alguns isolados apresentaram 100% de similaridade, mesmo sendo oriundos de leguminosas diferentes, como é o caso dos isolados L3R1 e S30; G14 e S42; L48, G1R1, e G22, o que sugere a possível colonização das diferentes leguminosas testadas por uma mesma estirpe (Figura 1).

Os resultados demonstram que a comunidade nativa de rizóbios da área estudada apresenta uma grande população de bactérias de crescimento rápido e muito rápido (Tabela 4). Esta característica pode estar relacionada ao ambiente altamente seletivo ao qual essa comunidade de rizóbios está submetida, resistindo a períodos de grande precipitação e posterior estiagem de cerca de seis meses. Sprent (1994) sugeriu que bactérias de crescimento rápido são mais comuns em regiões áridas, porque a habilidade para fixar nitrogênio não é a maior prioridade para estes microrganismos, mas sim a sua sobrevivência no solo. Segundo Martins et al. (2007), isto indica que pode ser esperado um alto grau de rizóbios de crescimento rápido nodulando leguminosas tropicais nativas, como foi observado neste trabalho. O rápido crescimento das bactérias indígenas constitui um dos fatores responsáveis pela sua maior competitividade frente às estirpes recomendadas, visto estas apresentarem crescimento lento.

A alta taxa de isolados de crescimento rápido na comunidade nativa estudada também explica a ausência de isolados capazes de alcalinizar o meio e elevada presença de isolados acidificantes (Tabela 4). Tan & Broughton (1981), estabeleceram que certas combinações de aminoácidos e açúcares, como glutamina e galactose, promovem uma acidificação do meio após o crescimento de microrganismos de crescimento rápido, já os microrganismos de crescimento lento alteram o pH do meio para alcalino.

O baixo número de isolados obtidos pelo uso do sombreiro como planta-isca, três isolados, enfatiza sua baixa promiscuidade em relação aos rizóbios nativos. A leucena demonstrou grande diversidade de isolados nos nódulos, sendo estes distribuídos em dez dos treze grupos obtidos (Figura 1). Segundo Florentino et al (2009), *L. leucocephala* é considerada uma espécie promiscua, capaz de formar simbiose com qualquer BFNNL acidificante do meio, características estas comuns nos isolados indígenas obtidos. Essas espécies foram relatadas por Moreira (1991), como sendo pertencentes aos gêneros *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*.

Com relação a gliricidia, verificou-se que o grupo formado pelos isolados G18, G20, G24 e G25 e o grupo dos isolados G1R1 e G22 apresentaram 100% de similaridade (Figura 1), provavelmente se tratando de apenas dois isolados diferentes, resultando assim em apenas sete isolados distintos quanto as características fenotípico-culturais. Logo, apesar de ser uma espécie recentemente introduzida na área de estudo, verificou-se a existência de rizóbios nativos compatíveis com esta leguminosa. De acordo com Souza et al (2007), atualmente sabe-se que espécies introduzidas se desenvolvem bem mesmo, longe de seus centros de origem, especialmente quando populações nativas de rizóbios compatíveis estão presentes no solo.



**Figura 1.** Dendrograma de similaridade com base em características fenotípicas dos isolados de bactérias que nodulam leucena, gliricidia e sombreiro, oriundos de solo proveniente do Centro-Norte Maranhense. \* L = isolados provenientes de leucena, S = isolados provenientes de sombreiro e G = isolados provenientes de gliricidia.

**Tabela 4.** Grupos morfoculturais de rizóbios baseados nas características fenotípicas das colônias tempo de crescimento (1), diâmetro (2), cor (3), forma (4), produção de goma (5), densidade (6), consistência (7), coalescência (8), elevação (9), reação quanto a mudança de pH (10). N° IS = n° de isolados.

GRUPO	PLANTA ISCA	CARACTERÍSTICAS										
		ACI <sup>(1)*</sup>	D <sup>(2)</sup>	COR <sup>(3)</sup>	FORMA <sup>(4)</sup>	GOMA <sup>(5)</sup>	DEN <sup>(6)</sup>	CONS <sup>(7)</sup>	COAL <sup>(8)</sup>	ELEV <sup>(9)</sup>	REAÇÃO pH <sup>(10)</sup>	N° IS
I	leucena	MR	< 1	Branca	circular	pouca	translúcida	viscosa	pouca	Plana	neutra	4
	sombreiro	I	>2		puntiforme							
II	leucena	MR	>2	branca amarela	Circular	pouca	opaca	viscosa	pouca	Plana	neutra	3
	sombreiro											
III	gliricidia	MR	>2	Branca	Circular	pouca	opaca	viscosa	média	Plana	neutra	1
IV	leucena	MR	>2	Amarela	Circular	média	translúcida	viscosa	média	Plana	neutra	2
V	gliricidia	MR	>2	Amarela	Circular	pouca	translúcida	viscosa	pouca	Plana	ácida	1
VI	leucena	R	1 a 2 >2	Amarela	Circular	pouca	translúcida	viscosa	pouca	Convexa	neutra	2
VII	sombreiro	MR	1 a 2	Amarela	Puntiforme	pouca	translúcida	viscosa	média	Convexa	neutra	1
VIII	leucena	R	>2	Amarela	Circular	pouca	opaca	viscosa	pouca	Convexa	ácida	1
IX	leucena	R	1 a 2 >2	Branca	Circular	pouca	opaca	viscosa	pouca	Convexa	ácida	2
	gliricidia						translúcida					
X	leucena	R	1 a 2	Amarela	Circular	pouca	opaca	viscosa	pouca	Convexa	ácida	5
XI	gliricidia	MR	1 a 2	Amarela	Circular	pouca	translúcida	viscosa	pouca	Convexa	ácida	2
	leucena						opaca					
XII	leucena	MR	>2	Amarela	Circular	baixa	opaca	viscosa	média	Plana	ácida	2
	gliricidia						gomosa					
XIII	leucena	MR	1 a 2	branca	circular	alta	translúcida	viscosa	média	Convexa	ácida	5
	gliricidia	R	>2	amarela	puntiforme							

\*MR – muito rápido (1 dia); R – rápido (2 a 3 dias); I intermediário (4 a 5 dias); L – lento (5 a 10 dias); ML – muito lento (> 10 dias).

### **Tolerância a fatores abióticos**

Os isolados testados quanto a sua resistência a fatores abióticos, extremos de pH, salinidade e temperatura, foram agrupados em três grandes grupos com baixa similaridade, entre 28% e 60 % e sete grupos com similaridade superior a 70%. Obtiveram-se agrupamentos com muitos isolados, o que demonstra a existência de uma menor diversidade dos isolados quanto a tolerância aos fatores abióticos testados. Apenas o isolado 30, proveniente do sombreiro, não foi inserido em nenhum dos grupos formados, o que está relacionado, principalmente, ao fato desse ser o único isolado que não cresceu a pH 12.

Apenas os grupos IV e VII apresentaram isolados provenientes de mais de uma das leguminosas, isto se deu principalmente à grande diferenciação das características apresentadas pelos isolados provenientes de leucena e gliricidia (Figura 2). Essa diferença esteve relacionada, principalmente, a tolerância à salinidade e a temperatura. Cerca de 88%, 82% e 23% dos isolados de leucena cresceram a concentração de 1%, 2% e 3% de NaCl, respectivamente, enquanto apenas dois isolados de gliricidia (cerca de 18%) apresentaram resistência a salinidade. Com relação à temperatura, mais de 88% dos isolados de leucena foram tolerantes a temperatura de 45°C, enquanto que apenas 36% dos isolados de gliricidia resistiram a esse fator. A grande divergência, quanto a tolerância ao pH e salinidade, entre isolados de leucena e gliricidia (Tabela 5), contrasta com a alta similaridade fenotípica observada entre isolados provenientes dessas duas leguminosas (Figuras 1 e 2). Isso pode ser explicado pela tolerância de rizóbios a salinidade, acidez e alcalinidade ser descrita como mais específica em nível de isolados (estirpe) que em nível de espécies (Amarger et al. 1997).

A elevada tolerância da maioria dos isolados de leucena e de vários isolados provenientes de gliricidia a altas temperaturas pode ser explicada pela adaptação da comunidade nativa às condições extremas de temperatura, devido ao ambiente onde essa comunidade evoluiu, uma região tropical cujas temperaturas são elevadas durante praticamente todo o ano. Segundo Graham (1992), a temperatura ótima de crescimento para a maioria dos rizóbios situa-se compreendida entre 27 e 31 °C, sendo muitos incapazes de crescer a temperaturas superiores a 37 °C. Com relação aos isolados que não apresentaram crescimento a 45°C verifica-se que, em geral, a baixa capacidade de sobrevivência de rizóbios em altas temperaturas pode ser relacionada com a redução de sua capacidade de infecção.

Tem sido relatado que rizóbios mais tolerantes ao estresse de temperatura apresentam menor eficiência simbiótica (Rodrigues et al., 2006). Entretanto, não deve ser descartado o possível

potencial de desenvolvimento desses isolados em temperaturas não tão extremas, visto que 45°C é tido como uma temperatura praticamente limítrofe para o desenvolvimento da maioria dos rizóbios. A boa tolerância dos isolados nativos, principalmente, aqueles provenientes da leucena, à elevada temperatura, tem importância especial para a seleção de possíveis estirpes de alta eficiência para as leguminosas testadas na região, visto que solos tropicais podem atingir temperaturas superiores a 40°C nas camadas superficiais, tornando-se um dos principais fatores limitantes ao processo da fixação simbiótica do nitrogênio nos trópicos (Vargas & Hungria 1997).

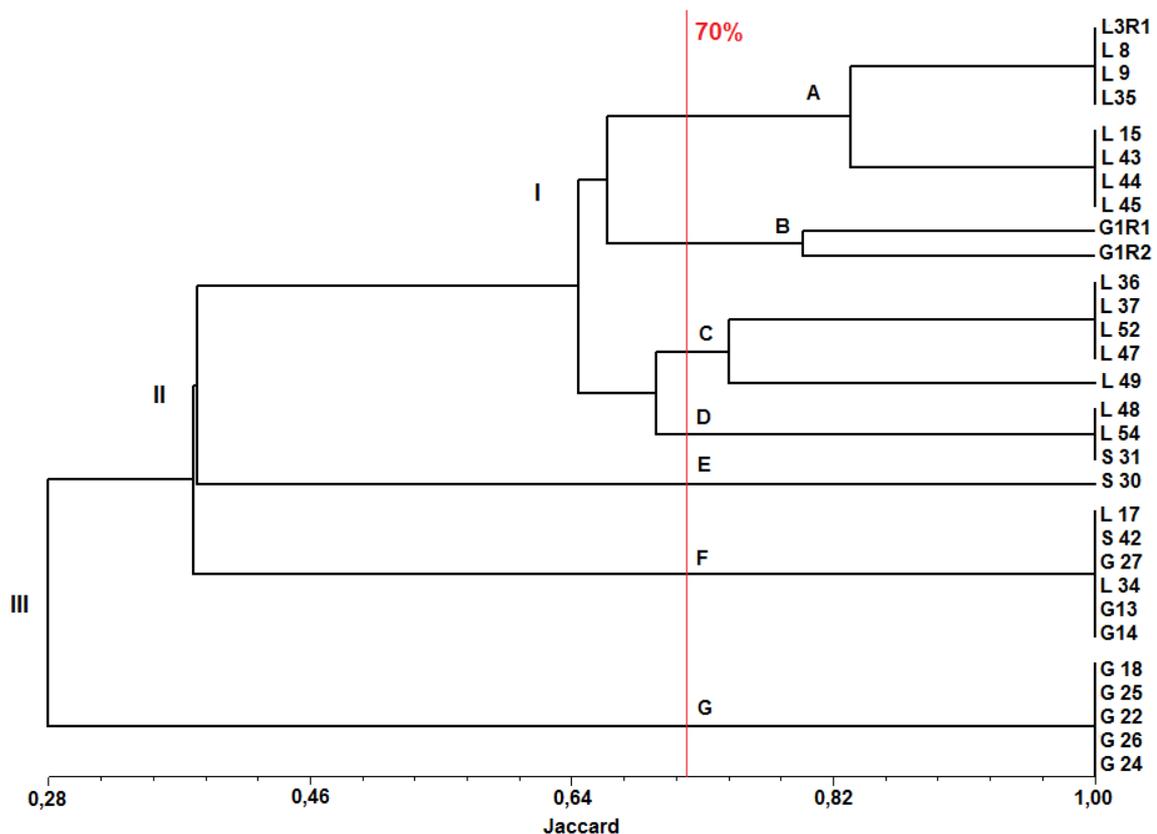
Em geral, a resposta ao efeito do NaCl é um bom indicador de resposta dos rizóbios a diferentes condições de salinidade (Abdelmoumen et al., 1999). Observou-se que cinco dos sete grupos obtidos apresentaram tolerância ao NaCl a 1% e quatro grupos ao NaCl a 2%, sendo que 3% foi uma concentração já limitante ao desenvolvimento das bactérias (Tabela 4). Apenas seis isolados (19%) foram tolerantes a este último nível de salinidade. Deve-se destacar aqui a superioridade dos isolados provenientes de leucena, com relação a esse parâmetro. Os grupos I e II (Figura 4) apresentaram resistência aos três níveis de concentração de NaCl, já os grupos VI e VII foram os que apresentaram menor grau de tolerância.

O isolamento e a seleção de rizóbios com características de tolerância ao estresse salino vêm revelando alto grau de diversidade nas populações destes microrganismos nos solos, principalmente, em regiões tropicais (Neves & Rumjanek, 1998). Os resultados obtidos podem ser considerados satisfatórios, em virtude dos isolados estudados não serem oriundos de solo com problema de salinidade. Por exemplo, Freitas et al (2007), trabalhando com estirpes provenientes de solo salino, encontraram sensibilidade dos isolados a partir da aplicação de 1,6% de NaCl<sup>+</sup>. O teste de tolerância a salinidade nos estudos da biodiversidade de rizóbios nativos é fundamental em virtude da maioria das plantas e dos rizóbios ser sensível a salinidade (Singleton et al., 1986).

Com relação ao desenvolvimento dos isolados em extremos de pH, verificou-se que o comportamento dos isolados provenientes de leucena e gliricidia foi semelhante para esse fator. Apenas 47% dos isolados de leucena e 55% dos de gliricidia apresentaram crescimento satisfatório a pH 4,0, enquanto que o crescimento a pH 12 foi de 100% nos isolados provenientes dessas duas leguminosas. Apenas um isolado (isolado S30, proveniente de nódulos de sombreiro, do grupo V) não apresentou crescimento a pH 12 sendo este caráter, em maior parte, responsável por sua exclusão dos demais agrupamentos no dendograma de similaridade (Figura 2). Isto pode ser explicado pela maior afinidade dos rizóbios a pH neutro e alcalino.

Com relação ao desenvolvimento em pH ácido (4,0), apenas dois grupos apresentaram isolados resistentes, o G1 e o G7 (Tabela 4), sendo este um fator altamente limitante para os isolados estudados. A tolerância de rizóbios ao pH baixo está associada à capacidade de manter seu pH interno estável e próximo à neutralidade, independentemente do pH externo, enquanto que as estirpes sensíveis reduzem seu pH interno quando cultivadas em meio ácido (Vargas et al., 2007). O baixo desenvolvimento dos rizóbios nativos em pH 4,0, apesar de serem oriundos de solo levemente ácido (Tabela 1) pode ser explicado pela atividade diferente dos íons  $H^+$  em meio de cultura comparando com o solo onde mudanças nos colóides podem neutralizar parcialmente a atividade desses íons (Ruiz-Díez et al., 2008).

O estudo do comportamento de comunidades nativas de rizóbios quanto a sua resistência a acidez é fundamental, à medida que os rizóbios podem ser mais sensíveis ao pH baixo que sua leguminosa hospedeira, afetando diretamente o estabelecimento da simbiose (Zahran, 1999). Além disso, a seleção de rizóbios tolerantes a acidez pode aumentar a tolerância da leguminosa hospedeira a essa adversidade.



**Figura 2.** – Dendrograma de similaridade de isolados de nódulos de leucena, gliricidia e sombreiro com base no perfil de tolerância a fatores abióticos.\*L = isolados provenientes de leucena, G = isolados provenientes de gliricidia, S = isolados provenientes de sombreiro.

**Tabela 5.** Caracterização dos grupos de isolados quanto a resistência a fatores abióticos.

GRUPOS	PLANTA ISCA	pH		NaCl (%)			Temperatura	N° Isolados
		4	12	1	2	3	45° C	
A	leucena	+	+	+	+	±	+	8
B	gliricidia	-	+	+	+	+	±	2
C	leucena	-	+	+	±	-	+	5
D	leucena	-	+	+	+	-	-	3
	sombreiro							
E	sombreiro	-	-	+	-	-	+	1
	leucena							
F	sombreiro	-	+	-	-	-	+	6
	gliricidia							
G	gliricidia	+	+	-	-	-	-	6

### Caraterização genotípica

A qualidade do DNA extraído foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose. O padrão de tamanho molecular utilizado foi o 1 kb DNA *ladder*. O aparecimento de uma única banda de alto peso molecular e boa integridade indica que o processo de extração do DNA foi bem sucedido e o mesmo não se encontra degradado (Figura 3). A reação de PCR também foi confirmada por eletroforese em gel de agarose, utilizando como padrão de tamanho molecular o  $\phi$ X174 (Invitrogen). A obtenção de bandas nítidas e a ausência de banda na testemunha indicam que a reação foi bem conduzida e a ausência de contaminação (Figura 4).

O dendograma de similaridade genética resultante da restrição do 16S rDNA dos 24 isolados provenientes dos nódulos de leucena, gliricidia e das estirpes padrões digeridos com as enzimas DdeI, HinfI e MspI (Figura 5), demonstra a geração de sete grandes grupos principais, com baixa similaridade, variando de menos de 20% (grupo D) a 60% (grupo A). O baixo nível de similaridade final dos grupos formados, inferior a 20%, expressa um grande nível de diversidade entre os isolados. Elevada diversidade genética entre isolados de rizóbios utilizando ARDRA foi observada anteriormente por outros autores (Leite et al., 2009; Ruiz-Díez et al., 2009), confirmando o bom desempenho dessa metodologia para acessar a diversidade genética de rizóbios.

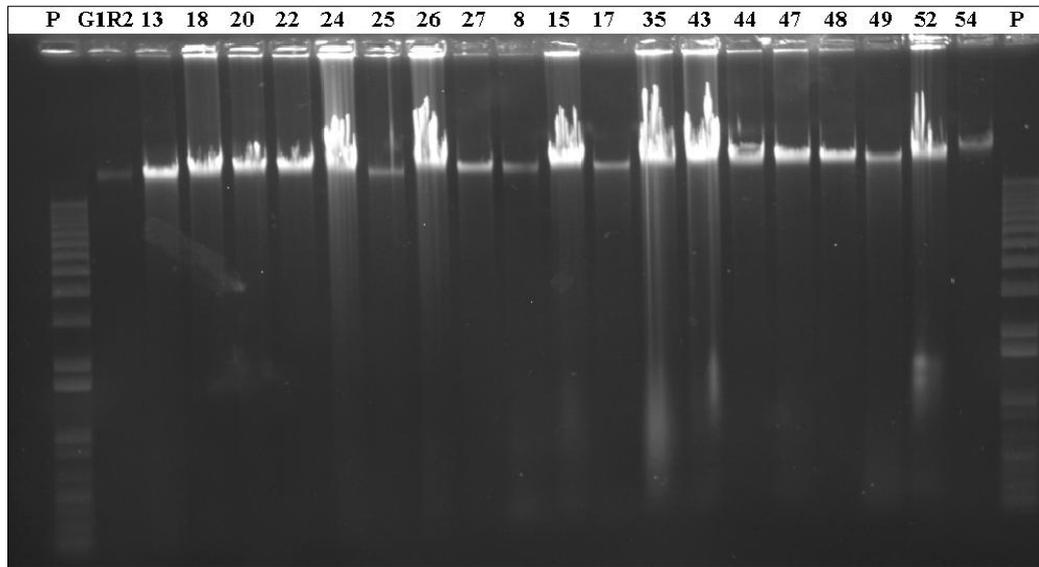
O grupo A englobou somente estirpes padrões pertencentes aos gêneros *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium*, com 60 % de similaridade entre os membros. O grupo B englobou dois isolados provenientes de leucena, o L8 e o L54, que apresentaram cerca de 72% de similaridade com estirpes padrões pertencentes ao gênero *Rhizobium*, demonstrando-se serem provavelmente pertencentes a esse gênero. O grupo C englobou, fora os isolados L8 e L54, apenas estirpes padrões. No grupo D foram incluídos os isolados L35, G1R1 e L48, e as demais estirpes padrões, com cerca de 36 % de similaridade. Verificou-se ainda que essas estirpes nativas foram agrupadas, com cerca de 50% de similaridade com a estirpe padrão *Metylobacterium nodulans*, o gênero mais recentemente incluído no grupo das bactérias fixadoras de nitrogênio e que apresenta somente um isolado de rizóbios descrito (Weir, 2008). Os grupos E, F e G englobaram todos os demais isolados nativos, com baixa similaridade, menor que 30%, em relação ao perfil eletroforetico de todas as estirpes padrões.

Dois grupos de isolados nativos, o grupo formado pelos isolados L43, L47 e L52, provenientes da leucena, e o grupo formado pelos isolados de glirícidia G18, G20, G22, G24, G25 e G26, apresentaram 100% de similaridade, dentro do grupo, possivelmente se tratando de isolados pertencentes a mesma espécie. Esse agrupamento de mais de 50% dos isolados de glirícidia testados mostra uma menor diversidade de isolados nativos nodulíferos dessa espécie em relação à leucena. Esse resultado era esperado, visto a glirícidia ser uma leguminosa antes inexistente na área, ao contrário da leucena, que é amplamente distribuída na região, além da alta promiscuidade da mesma, já relatada por Florentino et al. (2009).

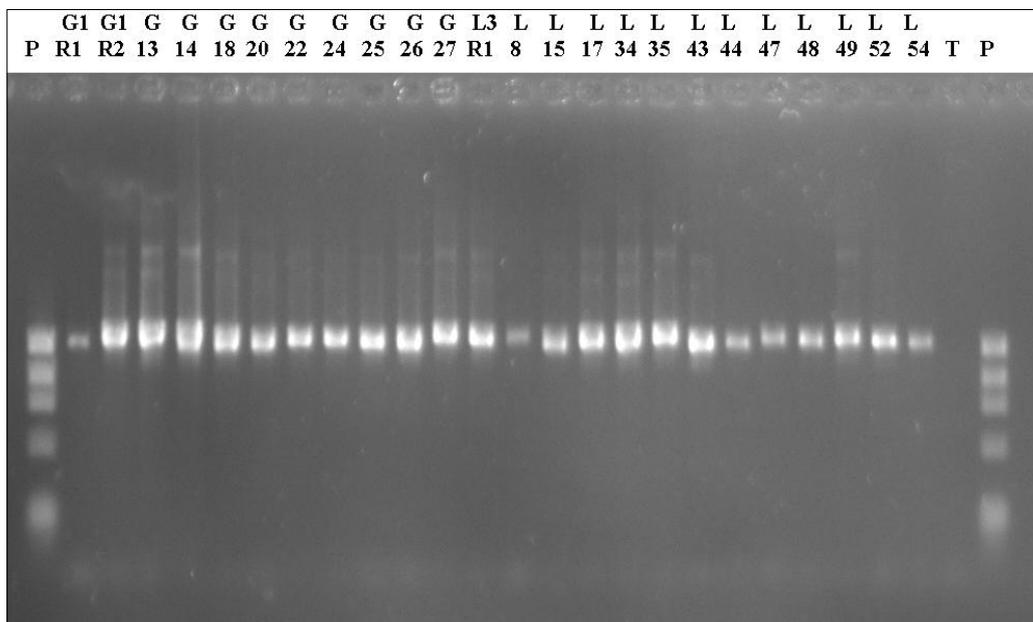
O subgrupo IV englobou isolados provenientes de leucena (L17, L34 e L49) e glirícidia (G13 e G14) com mais de 70% de similaridade, o que demonstra que as duas leguminosas podem ser colonizadas por bactérias nodulíferas indígenas muito semelhantes geneticamente. A colonização de diferentes leguminosas por um mesmo rizóbio é possível graças aos determinantes genéticos do conjunto de leguminosas hospedeiras e outras funções simbióticas serem em grande parte, quando não totalmente, codificadas por plasmídeos os quais permanecem funcionais quando transferidos entre estirpes isoladas, como observado para leguminosas como ervilha, trevo e feijoeiro (Lamb et al., 1982). Dois isolados, L3R1 e G1R2, apresentaram alta distância genética (menos de 20% de similaridade) sendo determinados por perfis únicos.

A tendência dos isolados provenientes de leguminosas diferentes se reunirem em grupos distintos, como observado nos subgrupos III e IV, sugere que a ARDRA possa ser uma ferramenta eficiente para acessar a diversidade de rizóbios específicos para cada leguminosa. Os dados obtidos sugerem a existência de uma grande diversidade de rizóbios na área estudada. A baixa similaridade

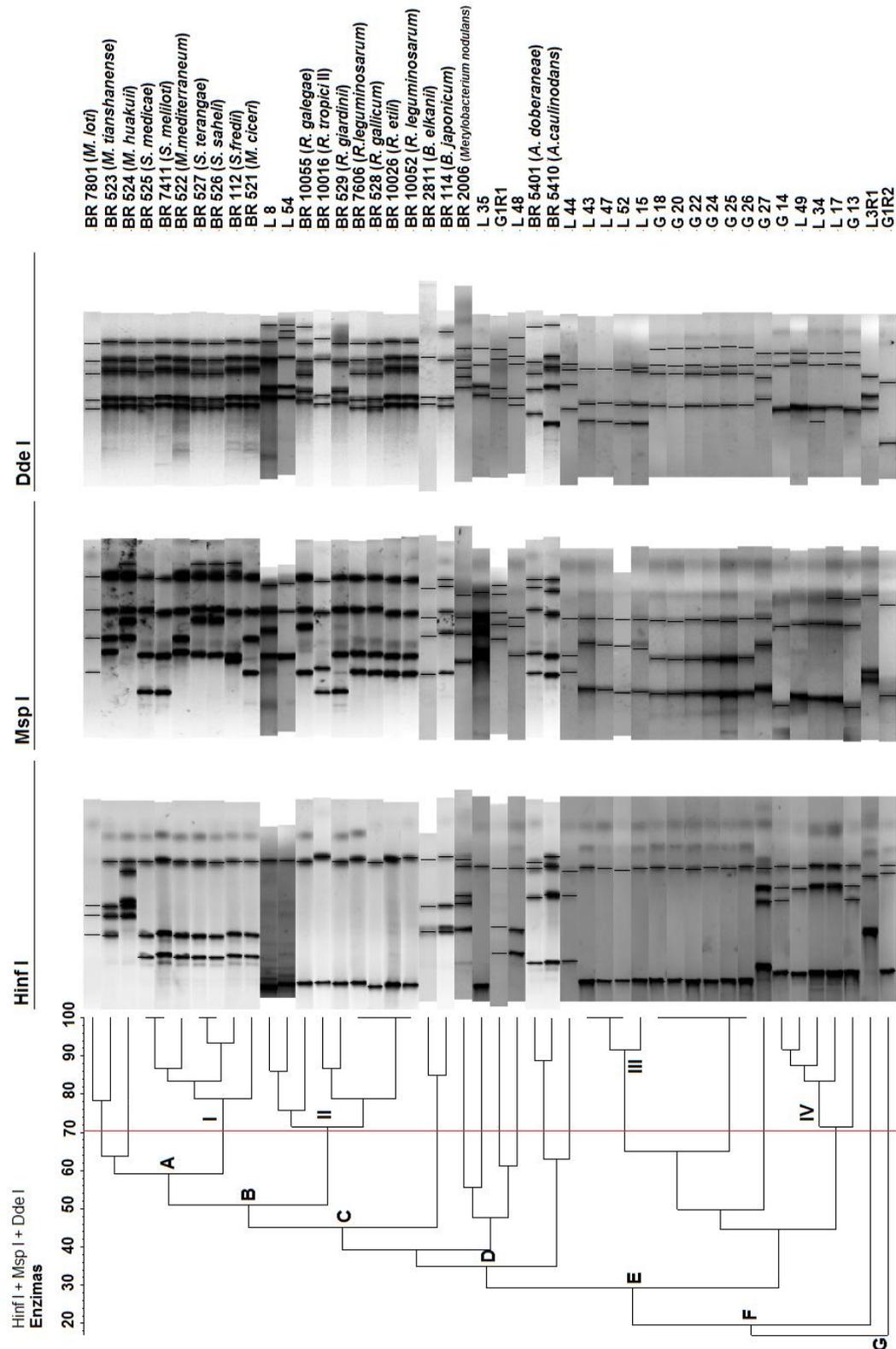
entre as estirpes padrões e os isolados nativos enfatiza esse resultado, e pode ser atribuída, principalmente, por esses padrões serem oriundos de áreas com condições ambientais e edafoclimáticas totalmente diferentes das existentes no Maranhão. Isto expressa a carência desse tipo de pesquisa na área de estudo e a necessidade de mais avaliações para acessar a biodiversidade local em busca de estirpes de rizóbios mais eficientes nessas condições para leguminosas de interesse. A grande diferença genética entre as estirpes padrões e os isolados indígenas também abre a possibilidade da existência de genótipos de BFNNL ainda não descritos na região.



**Figura 3.** Extração de DNA de isolados de leucena e gliricidia em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. \*P = marcador de peso molecular 1 kb.



**Figura 4.** Fragmentos de DNA dos isolados amplificados por PCR em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. \* P=marcador de peso molecular  $\phi$ X174; T=testemunha (sem DNA).



**Figura 5.** Dendrograma de similaridade entre BFNNL isoladas de nódulos de leucena e glicíndia cultivadas em solo proveniente da região Centro-Norte do Maranhão e estirpes padrões com base no perfil de restrição 16S rDNA utilizando as endonucleases Hinf I, Msp I e DdeI. As estirpes padrões pertencem aos gêneros *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Azospirillum*. \*L = isolados provenientes de leucena; G = isolados provenientes de glicíndia.

## CONCLUSÕES

- Em solos no Centro-Norte do Maranhão ocorrem bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas, com elevada diversidade fenotípica, capazes de estabelecer simbiose e beneficiar, moderadamente, o crescimento da glirícidia e da leucena, mas ineficientes em beneficiar a nodulação e crescimento do sombreiro.
- O desempenho das estirpes recomendadas BR 8003 e BR 8007, para o sombreiro BR 825 e BR 827 para a leucena, em condições de competição com os rizóbios nativos, sugere a necessidade de busca por estirpes de rizóbios mais eficientes para estas espécies na região estudada como alternativa à aplicação de fertilizantes nitrogenados.
- A comunidade nativa demonstrou tolerância moderada a salinidade, tolerância elevada a alta temperatura e alcalinidade e baixa resistência a acidez.
- Houve grande divergência genética entre os isolados locais de bactérias fixadoras de nitrogênio, comparados às estirpes padrões, abrindo a possibilidade da existência de genótipos de BFNNL ainda não descritos na região. Esse resultado confirma a carência de pesquisa na região e a necessidade de mais avaliações para acessar a biodiversidade local em busca de estirpes de rizóbios mais eficientes e adaptadas as condições locais.

**LITERATURA CITADA**

- ABDELMOUMEN H, FILALI-MALTOUF A, NAYRA M, BELABED A, MISSBAH EL IDRISSE MM. Effect of high salts concentrations on the growth of rhizobia and responses to added osmotic. *J Appl Microbiol* 86:889–898, 1999.
- AGUIAR, A. C. F., BICUDO, S. J.; COSTA SOBRINHO, J. R. S.; MARTINS, A. L.S.; COELHO, K. P.; MOURA, E.G. Nutrient recycling and physical indicators of an alley cropping system in sandy loam soil in the pre-Amazon region of Brazil. *Nutr Cycl Agroecosyst*, 86: 189-198. 2010.
- ALTIERI, M.A. The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agriculture Ecosystems and Environment*, Amsterdam, 74: 19-31, 1999.
- AMARGER N, MACHERET V, LAGUERRE G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int J Syst Bacteriol*. 47: 996–1006, 1997.
- BERTAN, I.; CARVALHO, F. I. F.; OLIVEIRA, A.C.; VIEIRA, E. A.; HARTWING, I.; ANTON, J.; SILVA, G.; SHIMIDT, D. A. M.; VALÉRIO, I. P.; BUSATO, C. C.; RIBEIRO, G. Comparação de métodos de agrupamento na representação da distância morfológica entre genótipos de trigo. *R. Bras. Agrociência*, 12: 279-286, 2006.
- CHAGAS JR, A. F. Características agronômicas e ecológicas de rizóbios isolados de solos ácidos e de baixa fertilidade da Amazônia. Amazonas, 2007. 172 f. Tese (Doutorado) - Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia do Convênio UFAM-INPA, Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, 2007.
- COSTA, F. S.; FRANCO, A. A.; DAMASCENO, R. N.; FARIA S. M. Aporte de nutrientes pela serapilheira em uma área degradada e revegetada com leguminosas arbóreas. *R. Bras. Ci. Solo*, 28: 919-927, 2004.
- DRINKWATER, L. E. & SNAPP, S. S. Nutrients in agroecosystems: rethinking the management paradigm. *Adv. Agron.* 92: 163-186, 2007.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. Brasília:EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.
- FIGUEIREDO, M.V.B., EGÍDIO, B.N. & BURITY, H.A. Water stress response on the enzymatic activity in cowpea nodules. *Braz. J. Microbiol*, 32: 195-200. 2001.

- FLORENTINO, L. A.; GUIMARÃES, A. P.; RUFINI, M.; SILVA, K.; MOREIRA, F. M. S. *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbionts of other species. *Sci. Agric.* 66: 667-676, 2009.
- FRED, E.B. & WAKSMAN, S.A. *Laboratory manual of general microbiology*. New York, McGraw-Hill Book Company, 1928. 143p.
- FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, A. L.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; LYRA, M. C. C. P. Caracterização de rizóbios isolados de jacatupé cultivado em solo salino do Estado de Pernambuco, Brasil. *Bragantia*, Campinas, 66: 497-504, 2007.
- GARTEN Jr, C. T.; CLASSEN, A. T.; NORBY, R. J.; BRICE, D. J.; WELTZIN, J. F.; SOUZA, L. Role of N<sub>2</sub>-fixation in Constructed Old-field Communities Under Different Regimes of [CO<sub>2</sub>], Temperature, and Water Availability. *Ecosystems* 11: 125–137. 2008.
- GLASS A.D.M. Nitrogen use efficiency of crop plants: physiological constraints upon nitrogen absorption. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 22: 453-470, 2003.
- GONZALEZ, T. O.; CAMPANHARO, J. C.; LEMOS, E. G. de M. Genetic characterization and nitrogen fixation capacity of *Rhizobium* strains on common bean. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 43: 1177-1184, 2008.
- GRAHAM, P.H. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Can. J. Microbiol.*, 38: 475-484, 1992.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soil. *Calif. Agr. Exp. STA. Cir*, 1950. 347p.
- LINDSTRO, K.; MURWIRA, M.; WILLEMS, A.; ALTIER, N. The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. *Research in Microbiology* 161: 453-463. 2010.
- LAMB, J.W.; HOMBRECHER, G.; JOHNSTON, A.W.B.; BERINGER, J.E. Plasmid determined nodulation and nitrogen fixation abilities in *Rhizobium phaseoli*. *Molecular and General Genetics*, New York, 186: 449-452, 1982.
- LEITE, A. L.L.; FERRAZ JR, A. S. L.; MOURA, E. G. AGUIAR, A. C.F. Comportamento de dois genótipos de milho cultivados em sistema de aléias preestabelecido com diferentes leguminosas arbóreas. *Bragantia*, Campinas, 67: 875-882, 2008.

- LEITE, J.; SEIDO, S. L.; PASSOS, S. R.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V. Biodiversity of rhizobia associated with cowpea cultivars in soils of the lower half of the São Francisco river valley. *R. Bras. Ci. Solo*, 33: 1215-1226, 2009.
- MATSON, P.A; PARTON, W.J.; POWER, A.G.; SWIFT, M.J.G. Agricultural intensification and ecosystem properties, *Science*, Washington, 277: 504-509, 1997.
- MOREIRA, F.M.S. Caracterização de estirpes de rizóbio isoladas de espécies florestais pertencentes a diversos grupos de divergência de Leguminosae introduzidas ou nativas da Amazônia e Mata Atlântica. 1991. 158p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí.
- MOURA, E.G.; SERPA, S. S.; SANTOS, J. G. D.; COSTA SOBRINHO, J. R. S.; AGUIAR, A. C. F. Nutrient use efficiency in alley cropping systems in the Amazon periphery. *Plant and Soil*, 335: 363-371, 2010.
- NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Ecologia das Bactérias Diazotróficas nos Solos Tropicais. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. *Ecologia Microbiana*. EMBRAPA: Jaguariúna, 1998. 140 p.
- PAFFETTI, D.; DAGUIN, F.; FANCELLI, S.; GNOCCHI, S.; LIPPI, F.; SCOTTI, C.; BAZZICALUPO, M. Influence of plant genotype on the selection of nodulating *Sinorhizobium meliloti* strains by *Medicago sativa*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73: 3–8, 1998.
- PARRY M.A.J., FLEXAS J., MEDRANO H. Prospects for crop production under drought: research priorities and future directions. *Ann. Appl. Biol.*, 147, 211-226. 2005.
- RAIJ, B. VAN. Avaliação da fertilidade do solo. Piracicaba: POTAFOS, 1981. 142 p.
- RODER, W.; PHENGCHANH, S.; KEOBOULAPHA, B. Relationships between soil fallow period, weeds and rice yield in slash-and-burn systems of Laos. *Plant and Soil*, Amsterdam, 176: 27-36, 1995.
- RODRIGUES CS, LARANJO M, OLIVEIRA S. Effect of heat and pH stress in the growth of chickpea Mesorhizobia. *Curr Microbiol* 53:1–7, 2006.
- ROHLF, J.F. NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system: version 1.70. New York, Applied Biostatistics, 1992.

- RUÍZ-DÍEZ, B.; FARJADO, S.; PUERTAS-MEJIA, M. A.; FELIPE, M. R.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M. Stress tolerance, genetic analysis and symbiotic properties of root-nodulating bacteria isolated from Mediterranean leguminous shrubs in Central Spain. *Arch Microbiol*, 191:35–46, 2009.
- SINGLETON, P.W.; EL-SWAIFY, S.A.; BOHLOOL, B.B. Effect of salinity on *Rhizobium* growth and survival. *Applied Environmental Microbiology*, Baltimore, 44: 884-890, 1986.
- SOUZA, L. A. G.; NETO, E. B.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P. Desenvolvimento e nodulação natural de leguminosas arbóreas em solos de Pernambuco. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 42: 207-217, 2007.
- SPRENT, J. Evolution and diversity in the legume-rhizobium symbioses: chaos theory? *Plant and Soil*. Dordrecht, 161: 1-10, 1994.
- TAN, I. K. P.; BROUGHTON, W. J. Rhizobia in tropical legumes. XIII Biochemical basis of acid and alkali reactions. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, 13: 389-393, 1981.
- TRIPLETT, E.; SADOWSKY, M. Genetic of competition for nodulation of legumes. *Ann Rev Microbiol* 46: 399–428. 1992.
- VARGAS, M.A.T. & M. HUNGRIA. *Biologia dos solos dos cerrados*. Embrapa-CPAC, Planaltina, DF, 1997, 524 p.
- VINCENT, J. M. A Manual for practical study of root-nodule bacteria. London: International biological programme HANDBOOK, 1970.
- XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M.V.; RIBEIRO, J. R. A.; RUMJANEK, N. G. Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão – caupi de diferentes nacionalidades. *Caatinga* (Mossoró, Brasil), 19: 25-33, 2006.
- XAVIER, G.R.; SILVA, F.V.; ZILLI, J.E. & RUMJANEK, N.G. Adaptação de método para extração de DNA de microrganismos associados a raízes de plantas. *Seropédica*, Embrapa Agrobiologia, 2004. 24p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 171).
- WEIR, B.S. The current taxonomy of rhizobia [Last updated: 16th November, 2008]. Disponível em: <[http:// www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html](http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html)>. Acessado em: 20 abr. de 2009.
- WEISSBURG, W. G., S. M. BARNES, D. A. PELLETIER, AND D. J. LANE. 16S ribosomal DNA

amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 73:697–703, 1991.

ZAHNAN, H. H. Rhizobium–legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:968–989, 1999.

**ANEXOS**

---

## REVISTA BRASILEIRA DE CIÊNCIA DO SOLO

### INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A **Revista Brasileira de Ciência do Solo** é um periódico de divulgação científica publicado pela Sociedade Brasileira de Ciência do Solo (SBCS).

[Os trabalhos submetidos à publicação](http://www.sbcs.org.br) somente poderão ser enviados pelo site [www.sbcs.org.br](http://www.sbcs.org.br), e não mais em papel, e nas seguintes formas:

**Artigos ou notas científicas.**

**Revisões de literatura** sobre tema específico.

**Cartas ao Editor** de, no máximo, quatro páginas digitadas em espaço duplo, contendo um dos seguintes temas: (a) Comunicação de matéria diretamente ligada à Ciência do Solo; (b) Comentário crítico de trabalhos publicados na Revista Brasileira de Ciência do Solo.

Só serão aceitos trabalhos escritos em português ou inglês, depois de revistos e aprovados pela Comissão Editorial, e que não foram publicados e não submetidos à publicação em outro veículo. Excetuam-se, nesta última limitação, os apresentados em congressos, em forma de resumo. **O autor que encaminhar o trabalho deverá se responsabilizar pelos demais autores, quando houver, como corresponsáveis pelo conteúdo científico do trabalho.**

Os trabalhos subdivididos em partes I, II..., devem ser enviados juntos, pois serão submetidos aos mesmos revisores.

Solicita-se observar as seguintes instruções para o preparo dos artigos e notas científicas:

1. O original deve ser encaminhado completo e revisto.
2. Deve ser enviado digitado em espaço 1,5, utilizando fonte “**Times New Roman 12**”, formato A4, com 2,5 cm nas margens superior e inferior e 2,0 cm nas margens direita e esquerda, enumerando-se todas as páginas e as linhas do texto.
3. O trabalho deve ser o mais claro e conciso possível. Somente em casos especiais serão aceitos trabalhos com número de páginas de texto superior a quinze.
4. **Os artigos, notas e revisões** deverão ser iniciados com o título do trabalho e, logo abaixo, os nomes completos dos autores. Como chamada de rodapé referente ao título, deve-se usar número-índice que poderá indicar se foi trabalho extraído de tese, ou apresentado em congresso, entidades financiadoras do projeto e, necessariamente, a data (Recebido para publicação em / / ) em que o trabalho foi recebido para publicação. O cargo, o local de trabalho dos autores [endereço postal e, se possível, eletrônico (E-mail)], deverão ser inseridos também no rodapé, em numeração consecutiva de chamada de números-índices colocados logo após o nome de cada autor. A condição de bolsista poderá ser incluída.
5. Os artigos deverão ser divididos, sempre que possível, em seções com cabeçalho, na seguinte ordem: **RESUMO, SUMMARY** (precedido da tradução do título para o inglês), **INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES, AGRADECIMENTOS e LITERATURA CITADA.** Não há necessidade dessa subdivisão para os artigos sobre educação, revisões de

literatura e notas científicas, embora devam ter, obrigatoriamente, **RESUMO** e **SUMMARY**.

Tais seções devem ser constituídas de:

- 5.1. **TÍTULO** do trabalho que deve ser conciso e indicar o seu conteúdo.
- 5.2. **RESUMO** que deve apresentar, objetivamente, **uma breve frase introdutória, que justifique o trabalho**, o que foi feito e estudado, os mais importantes resultados e conclusões. Será seguido da indicação dos termos de indexação, diferentes daqueles constantes do título. A tradução do RESUMO para o inglês constituirá o **SUMMARY**.
- 5.3. **INTRODUÇÃO** que deve ser breve, esclarecendo o tipo de problema abordado ou a(s) hipótese(s) de trabalho, com citação da bibliografia específica e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho.
- 5.4. **MATERIAL E MÉTODOS** em que devem ser reunidas informações necessárias e suficientes que possibilitem a repetição do trabalho por outros pesquisadores.
- 5.5. **RESULTADOS** que devem conter uma apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros ou figuras devem ser preparados sem dados supérfluos.
- 5.6. **DISCUSSÃO** que deve conter os resultados analisados, levando em conta a literatura, mas sem introdução de novos dados.
- 5.7. **CONCLUSÕES** que devem basear-se somente nos dados apresentados no trabalho e deverão ser numeradas.
- 5.8. **AGRADECIMENTOS** devem ser sucintos e não aparecer no texto ou em notas de rodapé.
- 5.9. **LITERATURA CITADA**, incluindo trabalhos citados no texto, quadro(s) ou figura(s) e inserida em ordem alfabética e da seguinte forma:
  - a. **Periódicos**: Nome de todos os autores, Título do artigo. Título abreviado do periódico, volume: páginas inicial e final, ano de publicação. Exemplo:
 

FONSECA, J.A. & MEURER, E.J. Inibição da absorção de magnésio pelo potássio em plântulas de milho em solução nutritiva. R. Bras. Ci. Solo, 21:47-50, 1997.
  - b. **Livro**: Autores. Título da publicação. Número da edição. Local, Editora, ano de publicação. Número de páginas. Exemplo:
 

KONHNKE, H. Soil physics. 2.ed. New York, MacGraw Hill, 1969. 224p.
  - c. **Participação em obra coletiva**: Autores. Título da parte referenciada seguida de In: Nome do editor. Título da publicação, número da edição. Local de Publicação, Editora, ano. Páginas inicial e final. Exemplos:
 

- *Capítulo de livro*:  
 JACKSON, M.L. Chemical composition of soil. In: BEAR, F.E., ed. Chemistry of the soil. 2.ed. New York, Reinhold, 1964. p.71-141.
  - d. **Trabalho em Anais**:
 

VETTORI, L. Ferro “livre” por cálculo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 15., Campinas, 1975. Anais. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1976. p.127-128.
  - e. **CD-ROM**:

SILVA, M.L.N.; FREITAS, P.L.; BLANCANEUX, P. & CURI, N. Índice de erosividade de chuva da região de Goiânia (GO). In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DO SOLO. 13., 1996. Anais. Águas de Lindóia, Embrapa, 1996. CD-ROM

**f. Internet:**

EL NIÑO and La Niña. Disponível em: <  
<http://www.stormfax.com/elnino.htm>>. Acesso em 15 out. 2000.

As abreviações de nome de revistas devem ser feitas de acordo com as usadas pelos “abstracting journals”, como dos Commonwealth Agricultural Bureaux.

6. As Referências no texto deverão ser feitas na forma: Silva & Smith (1975) ou (Silva & Smith, 1975). Quando houver mais de dois autores, usar a forma reduzida: (Souza et al., 1975). Referências a dois ou mais artigos do(s) mesmo(s) autor(es), no mesmo ano, serão discriminadas com letras minúsculas (Ex.: Silva, 1975a,b).
7. Os quadros deverão ser numerados com algarismos arábicos, sempre providos de um título claro e conciso e construídos de modo a serem auto-explicativos. Não usar linhas verticais. As linhas horizontais devem aparecer para separar o título do cabeçalho e este do conteúdo, além de uma ao final do quadro. O quadro deve ser feito por meio de uma tabela (MICROSOFT WORD/TABELA/INSERIR TABELA), no qual cada valor deve ser digitado em células distintas, estando centralizado e alinhado.
8. Os gráficos deverão ser preparados, utilizando-se “Softwares” compatíveis com “Microsoft Windows” (“Excel”, “Power Point”, “Sigma Plot”, etc.). Para fotos e mapas coloridos utilizar resolução de 150 a 300 DPI. Não serão aceitas figuras que repitam informações de quadros.
9. Fotos coloridas, quando imprescindíveis, a critério da Comissão Editorial, serão, também, aceitas. Os custos adicionais deverão ser cobertos pelos autores.
10. Para publicação de artigos na RBCS serão cobrados por página editorada (forma final na Revista): para sócios da SBCS (primeiro autor e, ou, autor correspondente) R\$ 25,00, até oito páginas, e R\$ 50,00 por página adicional, para não-sócios (primeiro autor e, ou, autor correspondente): R\$ 50,00 por página até oito páginas e R\$ 100,00 por página adicional.

## INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

The **Revista Brasileira de Ciência do Solo** is a scientific journal published by the Brazilian Society for Soil Science (SBCS).

Contributions for publication are to be sent in **by the site: [www.sbc.org.br](http://www.sbc.org.br), not in print**, in one of the following forms:

**Article or scientific notes.**

**Literature review** on a specific theme.

**Letter to the Editor** should contain a maximum of four pages (double spacing), related to one of the following categories: (a) Communications directly related to Soil Science; (b) Critical comments on articles published in the *Revista Brasileira de Ciência do Solo*.

Contributions, in Portuguese or English only, are subjected to revision and approval by the Editorial Board. With the exception of papers presented at professional meetings in summary form, only unpublished texts, not submitted to other periodicals, are eligible for publication. **The submitting author assumes responsibility for co-authors, where there are, as co-responsible for the scientific content of the text.**

Texts which are subdivided into parts I, II, etc., must be sent together, as they will be forwarded to the same reviewers.

**The following formatting instructions for articles and scientific notes should be observed:**

1. The complete original text should be sent in, ready for publication.
2. Manuscripts must be typed in **Times New Roman 12**, spacing 1.5, format A4, with margins (left and right 2.0 cm, superior and inferior 2.5 cm), **providing page and line numeration**.
3. Texts should be as clear and concise as possible. Only in exceptional cases can papers exceeding 15 pages be accepted.
4. **Articles, notes and reviews** should begin with the title, followed by the complete names of the authors. The title should have a numbered footnote, which specifies if the text was part of a thesis or presented at a professional meeting, subsidiary organizations of the project, and necessarily, the date of reception for publication (Received for publication on / / ). After the name of each author, a numbered footnote should include the author's current position, place of employment, postal and E-mail address. Reference to institutions providing financial support may be made.
5. Articles should be divided, wherever possible, into sections with headings, in the following order: RESUMO, SUMMARY (beginning with the translated English title), INTRODUCTION, MATERIAL AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION, CONCLUSIONS, ACKNOWLEDGEMENTS and REFERENCES (those cited in the text). This complete subdivision is not necessary for articles on education, literature reviews and scientific notes, though a SUMMARY and RESUMO are always required.

The content of each section is expected to meet the following criteria:

- 5.1. The **TITLE** should be concise and indicate the content of the text.
- 5.2. The **RESUMO** should consist of a **brief introductory sentence stating the study's objective**, followed by a specification of what was performed and studied, and end with principal results and conclusions. This should be followed by index terms, different from those included in the title. The **SUMMARY** is the English translation of the **RESUMO**.

- 5.3. The **INTRODUCTION** should be brief, presenting the type of problem and/or working hypothesis(es) dealt with, citing specific references, and concluding with a statement about the study's objective.
- 5.4. **MATERIAL AND METHODS** should provide necessary and sufficient information to permit a replication of the study by other researchers.
- 5.5. **RESULTS** should contain a concise presentation of the data obtained. Tables or graphs should omit unnecessary data.
- 5.6. **DISCUSSION** should contain an analysis of the obtained results, taking current literature into consideration, but without introduction of new data.
- 5.7. **CONCLUSIONS**, based only on data presented in the study, should be numbered.
- 5.8. **ACKNOWLEDGEMENTS** should be succinct and not included in the main text or in footnotes.
- 5.9. **REFERENCES** should include studies cited in the text, tables, figures, and be organized in alphabetical order, using the following format:
- a. Journals: Name of each author, Title of the article. Abbreviated title of the Journal, volume: initial and final pages, year of publication. Example:

MYERS, R.G.; PIERZYNSKI, G.M. & THIEN, S.J. Improving the iron oxide sink method for extracting soil phosphorus. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 59:853-857, 1995

- b. **Book**: Authors. Title. Number of Edition. Place of publication, Editor, year of publication. Number of pages. Example:

KONHNKE, H. *Soil physics*. 2.ed. New York, MacGraw Hill, 1969. 224p.

- c. **Participation in collective work**: Authors, Title of part referred to. In: Name of editor. Title of publication, number of the edition. Place of Publication, Editor, year. Initial and final pages. Examples:

- *Chapter of book*:

JACKSON, M.L. Chemical composition of soil. In: BEAR, F.E., ed. *Chemistry of the soil*. 2.ed. New York, Reinhold, 1964. p.71-141.

- d. **Text in Annals**:

UEHARA, G & GILLMAN, G. Agric properties and their significance for soil classification. In: **INTERNATIONAL SOIL CLASSIFICATION WORKSHOP**, 8., Rio de Janeiro, Embrapa/SNLCS, 1985. p.19-22

- e. **CD-ROM**:

URQUIAGA, S.; OLIVEIRA, O.; OLIVEIRA, I.; FERREIRA, E.; ALVES, B.; CADISCH, G. & BODDEY, R. Soil nutrient availability in relation to the productivity of pastures in the Brazilian cerrado. In: **WORLD CONGRESS OF SOIL SCIENCE**, 16., Montpellier, 1998. Proceedings. Montpellier, International Soil Science Society, 1998. CD-ROM

- f. **Internet**:

EL NIÑO and La Niña. Access under: <  
<http://www.stormfax.com/elnino.htm>>. Access date: Oct.15, 2000.

Abbreviations of journal names should agree with those used by the “abstracting journals”, such as those of the Commonwealth Agricultural Bureaux.

6. References in the text are to be cited using the format: Silva & Smith (1975) or (Silva & Smith, 1975). When there are more than two authors, use the reduced format: (Souza et al., 1975). References to two or more articles by the same author(s) in the same year should be identified with small letters (Ex.: Silva, 1975a,b).
7. Tables should always be numbered with Arabic numerals and identified with clear, concise and self-explanatory titles. Do not use vertical lines. Horizontal lines should appear as a separation between title and heading, heading and content, and beneath the completed table. Format tables with MICROSOFT WORD/TABLE/INSERT TABLE. Each value should be set in its own cell, centralized and aligned.
8. For graphs, Microsoft Windows compatible software should be used (Excel, Power Point, Sigma Plot etc.). Figures repeating information contained in a table will not be accepted.
9. Colored photographs, where indispensable, may also be accepted at the discretion of the Editorial Board. Additional costs will be responsibility of the authsors.
10. A fee will be charged per page edited (final versin in the Journal) for articles published in the RBCS: for SBCS members (first author, and/or corresponding author) U\$ 10.00, up to eight pages, and U\$ 20.00 por additional page; for non-members (first author, and/or corresponding author) U\$ 20.00, per pag