

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO - UEMA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROECOLOGIA  
CURSO DE MESTRADO EM AGROECOLOGIA

**NODULAÇÃO DO CAUPI (*Vigna unguiculata*), E EFICIÊNCIA DA  
COMUNIDADE NATIVA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS DE ÁREAS DE  
AGRICULTURA FAMILIAR NO CENTRO-NORTE MARANHENSE**

TÉRCIA CRISTINA DOS REIS SILVA

São Luís - MA

2011

TÉRCIA CRISTINA DOS REIS SILVA

Engenheira Agrônoma

**NODULAÇÃO DO CAUPI (*Vigna unguiculata*), E EFICIÊNCIA DA  
COMUNIDADE NATIVA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS DE ÁREAS DE  
AGRICULTURA FAMILIAR NO CENTRO-NORTE MARANHENSE**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do  
Programa de Pós-Graduação em Agroecologia da  
Universidade Estadual do Maranhão, para a  
obtenção do título de mestre em Agroecologia.

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Ph. D. Guillaume Xavier  
Rousseau.

São Luís - MA

2011

Silva, Tercia Cristina dos Reis.

Nodulação do caupi (*Vigna unguiculata*) e eficiência da comunidade nativa de bactérias diazotóficas de áreas de agricultura familiar no centro-norte maranhense / Tercia Cristina dos Reis Silva.– São Luís, 2011.

62f

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

Orientador: Prof.Dr.Guillaume Xavier Rousseau.

1.Rizóbio. 2.Comunidade nativa. 3.Fixação biológica. 4.Manejo do solo. I.Título

CDU: 631.46:635.654 (812.1)

**TÉRCIA CRISTINA DOS REIS SILVA**  
**NODULAÇÃO DO CAUPI (*Vigna unguiculata*) E EFICIÊNCIA DA**  
**COMUNIDADE NATIVA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS DE ÁREAS DE**  
**AGRICULTURA FAMILIAR NO CENTRO-NORTE MARANHENSE**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do  
Programa de Pós-Graduação em Agroecologia da  
Universidade Estadual do Maranhão, para a  
obtenção do título de mestre em Agroecologia.

Aprovado em: \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Comissão Julgadora:

---

Prof.º Ph. D. Guillaume Xavier Rousseau. – UEMA

---

Prof. Dr. Emanuel Gomes de Moura– UEMA

---

Prof. Dr Flávio Henrique Reis Moraes - CEUMA

São Luís - MA

2011

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por está presente em todos os momentos da minha vida

Ao Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, pela oportunidade e espaço concedido para a realização deste curso.

Aos meus orientadores Guillaume Xavier Rousseau e José Geraldo Donizette dos Santos

Aos meus pais, Rosilene dos Reis Silva e Joaquim Campelo da Silva pelo apoio, dedicação e amor incondicional

Às minhas tias, Helena, Amparo e Nete por todos os ensinamentos e apoio em toda minha caminhada acadêmica

À minha querida irmã, Josilene Reis Silva por todo carinho e amor

À meu querido Clenilson dos Santos Silva, por toda dedicação, paciência, carinho e amor.

Às minhas amigas, Évila de Castro Costa, Kátia Perreira Coelho, Edilaine da Silva Marques, Danúbia Lemes Dadalto, por todo apoio em todas as etapas desse trabalho, pelo carinho, força, dedicação e por todos os momentos de lágrimas e risos que passamos.

A todos os amigos do laboratório de Microbiologia do solo e Ártropodes: Meirijane, Caroen, Sílvia Letícia, Cibely, Abdias, Anilde, Amanda e Michela, pelo apoio

Aos amigos e colaboradores do Núcleo Tecnológico de Engenharia Rural: Neto, Aidê, Dona Carmelita e Naldo

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão de bolsa de estudo.

A todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	Pág.
<b>CAPITULO 1- BACTÉRIA FIXADORAS DE NITROGÊNIO NODULÍFERAS DE LEGUMINOSAS COMO BIOINDICADORES AMBIENTAIS EM DIVERSOS SISTEMAS DE MANEJO E USO DA TERRA NA AMAZÔNIA</b>	<b>09</b>
<b>1.1 SISTEMAS DE MANEJO E USO DA TERRA .....</b>	<b>11</b>
<b>1.2 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO E LEGUMINOSAS..</b>	<b>14</b>
<b>1.3 FEIJÃO CUPL.....</b>	<b>15</b>
<b>1.4 COMUNIDADE NATIVA DE BFNNL.....</b>	<b>16</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>19</b>
<b>CAPITULO 2- NODULAÇÃO DO CAUPI (<i>Vigna unguiculata</i>), E EFICIÊNCIA DA COMUNIDADE NATIVA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS DE ÁREAS DE AGRICULTURA FAMILIAR NO CENTRO-NORTE MARANHENSE.....</b>	<b>28</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>30</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>31</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>40</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>47</b>

## LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1- Dendrograma de similaridade entre BFNNL isoladas de nódulos de feijão-caupi com base nas características de morfologia de colônias em meio YMA. * CV- Área arada e gradeada de um ARGISSOLO PETROPLÍNTICO com camada impeditiva; RT- roça no toco; PG- pastagem; AT-Plantio direto; AS- aléias 6 anos; CP- capoeira.....	55
Figura 2- Dendrograma de similaridade entre BFNNL isoladas de nódulos de feijão-caupi com base nos perfis de tolerância a fatores abióticos de BFNNL isolados de nódulos de caupi capturados de diferentes sistemas de uso da terra na região pré amazônica. * CV- área arada e gradeada de um ARGISSOLO PETROPLÍNTICO com camada impeditiva ; RT- roça no toco; PG- pastagem; AT- plantio direto ; AS- aléias 6 anos; CP- capoeira.....	56
Figura 3- Dendrograma de similaridade entre BFNNL isoladas de nódulos de caupi com base no perfil de restrição do 16S rRNA com as endonucleases Hinf I, Msp I e Dde.....	57

## LISTA DE TABELAS

	Pag
Tabela 1. Análise química do solo das áreas de agricultura familiar estudadas.....	52
Tabela 2. Número de nódulos (NN), peso seco de nódulos (PSN), peso seco da parte aérea (PSPA), eficiência relativa (Efr), e teor de nitrogênio na parte aérea do feijão caupi (N).....	52
Tabela 3. Caracterização morfocultural de rizóbios baseada nas características fenotípicas das colônias 1=Tempo em dias para o aparecimento de colônias isoladas (R= rápido, 1 a 5 dias), (L= lento, 6 a 10 dias); 2= Diâmetro da colônia (mm); 3= Cor da colônia; 4= Forma da colônia; 5= Produção de goma; 6= Densidade.....	53
Tabela 4. Caracterização dos isolados quanto à resistência a fatores abióticos.....	54

**Bactérias Fixadoras de Nitrogênio Nodulífera de Leguminosas  
como Bioindicadores Ambientais em Diversos Sistemas de Manejo  
e Uso da Terra na Amazônia**

---

**CAPITULO I**

## 1. INTRODUÇÃO

A agricultura familiar do estado do Maranhão é praticada principalmente por pequenos agricultores sob sistema de corte e queima. Trata-se de um sistema de uso da terra que alterna períodos de pousio com curtos períodos de cultivo intensivo. O sistema de corte e queima é à base da agricultura familiar maranhense, no entanto, com aumento da densidade demográfica e do número de agricultores proprietários, os quais derivam dos programas de reforma agrária, reforçam a necessidade de substituição do modelo de agricultura de corte e queima, pois este modelo não garante mais a segurança alimentar das famílias. Um novo sistema deve levar em conta, além dos princípios de sustentabilidade, as particularidades agroambientais e sociais da região, onde uma parcela significativa da população ainda sobrevive da agricultura, com um dos menores índices de desenvolvimento humano do país (Moura et al., 2008).

Uma alternativa promissora à agricultura de corte e queima é o cultivo em aléias de leguminosas que dentre os vários benefícios destacam-se a proteção do solo contra a erosão, recuperação do processo de ciclagem natural de nutrientes, recuperação de áreas degradadas e, principalmente, a possibilidade de cultivo continuado da área, poupando extensas glebas com vegetação nativa.

A simbiose de plantas com os microorganismos afetam diretamente os fatores químicos e físicos do solo, contribuindo para a sustentabilidade dos sistemas agrícolas. Com frequência, os atributos relacionados à microbiota do solo são capazes de detectar alterações pelo manejo do solo e das culturas em um estágio anterior ao das mudanças, levando à sua utilização como bioindicadores de qualidade do solo (Balota et al., 2004; Franchini et al., 2007).

A fixação biológica do nitrogênio atmosférico (FBN) é um dos processos microbianos mais explorados tecnologicamente na agricultura, esse processo bioquímico é natural e essencialmente desenvolvido por bactérias. A FBN constitui passo crucial do ciclo de nitrogênio e responde, em grande medida, pela manutenção da vida na terra (Lindemann e Glover, 2003). Portanto, uma importante forma de introduzir o nitrogênio, em áreas sob estágios de degradação, é a utilização de espécies vegetais capazes de efetuar simbiose com bactérias que nodulam leguminosas e fixam  $N_2$  atmosférico (BNLFN). O conhecimento sobre a espécie das BNLFN é ainda limitado, por falta de conhecimento dos microssimbiontes para maioria das espécies vegetais, principalmente as tropicais.

Nas últimas décadas, estudos revelaram uma grande diversidade de rizóbios de espécies florestais, até então desconhecida, inclusive no gênero *Bradyrhizobium* (Moreira et al., 1993; Dupuy et al., 1994; Willems et al., 2000).

A diversidade, inclusive de leguminosas, encontrada nos vários sistemas de uso da terra (capoeira, pastagem tradicional, sistema agroflorestal, floresta e monocultura), na Amazônia, pode abrigar também uma grande variabilidade de rizóbios (Moreira et al., 1993; Pereira, 2000), adaptados às condições de baixos valores de pH e temperaturas elevadas (predominantes nos solos brasileiros), cujo imenso potencial ainda é pouco conhecido.

Um dos métodos mais utilizados para avaliar a diversidade de BNLFN nos solos é a utilização de plantas- isca, cuja principal característica é a promiscuidade, ou seja, devem ser capazes de nodular com uma grande diversidade de espécies. Entre as espécies de leguminosas consideradas promíscuas, podem-se destacar o feijão caupi (*Vigna unguiculata*) (Lewin et al., 1987; Martins et al., 1997). Sendo esta espécie de importância econômica na alimentação humana, o estudo da diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio que as nodulam têm adicional importância.

O estudo dos fatores que afetam a produtividade de culturas, como do feijão caupi, sob condições simbióticas, é de significativa relevância sócio econômica, pela grande importância da cultura na dieta da população regional e pela adequação desta tecnologia aos sistemas agrícolas de subsistência, predominante no cultivo desta cultura no Brasil (Freire Filho et al., 2005). Essa tecnologia também se adapta a alguns sistemas de produção associada à agricultura familiar, de menor nível tecnológico, e em ascensão em várias regiões produtoras.

Devido à diversidade de espécies de plantas, microrganismos e condições regionais, estudos relacionados a melhoria na produtividade das culturas em condições simbióticas, deve ser intensificado, para que se compreendam melhor essas associações, permitindo que sejam eficazes e auxiliem na viabilidade ecológica e econômica de sistemas agrícolas e agroflorestais implantados na Amazônia. Desta forma, com este trabalho objetivou-se estudar a nodulação do caupi, sua diversidade e eficiência fenotípica e genotípica da comunidade nativa de BNLFN de áreas de agricultura familiar no centro-norte maranhense.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Sistemas de manejo e uso da terra**

A intensificação das atividades agrícolas pode levar a alterações nas funções do ecossistema, diminuir a diversidade de vegetais e de animais, reduzir ou levar a perda total de

importantes serviços para um bom funcionamento do ecossistema, o que pode levar à perda da sua produtividade e sustentabilidade (Giller, 1997; Braga, 2009). A expansão do uso da terra pelo homem tem causado impacto sobre a área vegetada e mudança na disponibilidade de recursos (Braga, 2009; Turner 1996; Terborgh, 1992). De fato, todas as formas de agricultura causam mudanças no balanço e no fluxo dos sistemas preexistentes, o que limita dessa forma suas funções de auto-regulação do ecossistema (Schröder et al., 2002).

No Maranhão predomina dois sistemas de manejo agrícola. A agricultura itinerante, mais utilizada pelos agricultores de baixa renda e o cultivo convencional, o qual tem como premissa o revolvimento do solo através de arações e gradagens. Porém também não é incomum a presença de grandes áreas com pastagens, a maioria degradada. Contudo em escala experimental, tem-se o cultivo em aléias de leguminosas arbóreas, o qual surge como alternativa promissora a agricultura de corte e queima.

A agricultura itinerante ou agricultura de corte e queima, é o sistema agrícola mais utilizado na região pré amazônica. Esse tem como características o corte da vegetação nativa, queima da biomassa, cultivo por um ou dois ciclos, posterior abandono da área para pousio e reinício do processo após a revegetação natural de capoeira. Este sistema de cultivo ocasiona resultados negativos à produtividade desses solos visto que combina fatores como alta densidade demográfica, baixa fertilidade natural e frágil estrutura dos solos do centro-norte do Estado, causando aumento das áreas degradadas, maior empobrecimento do homem do campo e o êxodo rural (Ferraz Júnior, 2004).

O cultivo convencional também é outra prática bastante comum no Estado. A base do preparo é o revolvimento do solo, com a utilização de grades e arados como implementos para o manejo primário. Segundo Reichert et al., (2003), as operações agrícolas que envolvam mobilização e/ou tráfego de máquinas alteram substancialmente a estrutura dos solos, principalmente a agregação e a compactação, que modifica as condições que determinam o ambiente de crescimento radicular.

Vastas áreas de pastagens também retratam outro sistema de uso da terra bastante utilizado no Maranhão. As pastagens têm sido implantadas após a retirada das madeiras nobres e queima do material vegetal de baixo valor comercial e gera o aparecimento do capim duro ou capim furão (*Paspalum virgatum*).

A substituição da vegetação arbórea nativa, por culturas agrícolas, provoca um desequilíbrio no ecossistema, já que o manejo adotado influencia nos processos físico-químicos e biológicos do solo, e pode modificar suas características e, muitas vezes, causar sua degradação (Zalamena, 2008; Souza & Alves, 2003). Um dos grandes desafios para a

sustentabilidade na floresta amazônica e imediações é desenvolver sistemas de produção que sejam capazes de transformar áreas degradadas em áreas produtivas e sustentáveis, as quais considerem uma melhor qualidade de vida para os produtores e a capacidade suporte do ecossistema (Braga, 2009; Goodland, 1995; Ávila, 1992).

A adoção de pacotes tecnológicos sem preocupação ecológica tornou a agricultura uma fonte de poluição, um agroecossistema frágil e não sustentável (Rheinheimer et al., 2003). Modelos de exploração agrícola que consideram os princípios sustentáveis, surgem como alternativa viável às práticas sociais e ambientalmente inadequadas, como é o caso da agricultura itinerante.

O cultivo em aléias é um sistema de exploração de terra que combina fileiras de leguminosas arbóreas e culturas anuais de interesse econômico, essas leguminosas são podadas anualmente e esta biomassa é depositada na entre linha para o cultivo das culturas anuais. Essa combinação tem como resultados benefícios a melhor estruturação do solo e disponibilidade de nutrientes, em especial o nitrogênio fixado biologicamente, pois aumenta o aporte de matéria orgânica no sistema, melhora a porosidade, além de favorecer a disponibilidade de água e oxigênio (Ferraz Júnior, 2004).

Os diferentes sistemas de uso da terra podem causar desequilíbrio entre os solos e os diferentes organismos que nele habitam. Indicadores biológicos, físicos e químicos são usados largamente para estimar a qualidade do solo diante a atividades antropogênicas (Moreira & Siqueira, 2006). Devido seu alto dinamismo, e por se adaptarem bem as mudanças ocorridas no meio em que vivem, os microrganismos representam indicadores sensíveis a alterações provenientes do manejo do solo (Kennedy & Papendick, 1995).

É necessário entender a diversidade microbiana do solo, pois ela propociona condições ao desenvolvimento de estratégias que aperfeiçoem os processos biológicos e aumentem sua sustentabilidade (Odum, 1998). Portanto, a biodiversidade do solo é de fundamental importância para sua resiliência e estabilidade, já que ela está ligada de forma completa nos processos de formação dos solos, na ciclagem e armazenamento de nutrientes (Santos et al., 2007).

O manejo inadequado do solo causa conseqüências negativas à produtividade do agroecossistema e prejuízos tanto na esfera econômica quanto na ambiental, portanto, a busca de alternativas que sejam viáveis pode trazer benefícios para a recuperação de áreas em processo de degradação.

### 2.3 Fixação biológica de nitrogênio em leguminosas

A simbiose de plantas leguminosas e bactérias do gênero *Rhizobium* é uma interação de grandes benefícios para a sustentabilidade, devido ao processo chamado de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) (Hungria et al. 1999). Esse processo fisiológico importante é explorado para obter aumento no rendimento de grãos de uma maneira ecológica e economicamente sustentável (Vessey, 2003).

Na natureza, somente um pequeno número de microrganismos, denominados diazotróficos ou fixadores de nitrogênio, são capazes de reduzir o nitrogênio atmosférico à amônia. Esse processo, chamado de fixação biológica do nitrogênio (FBN), é realizado pela enzima nitrogenase, um complexo protéico que catalisa a reação (Eady & Postgate, 1974). Mesmo sendo mediado por um reduzido número de microrganismos, os fixadores biológicos apresentam alta diversidade morfológica, fisiológica, genética e filogenética. Tal diversidade garante não só a resiliência da FBN nos ecossistemas, como também a ocorrência deste processo nos mais diferentes habitats terrestres (Moreira & Siqueira, 2006).

A relação simbiótica rizóbio/leguminosa caracteriza-se pela formação de estruturas hipertróficas nas raízes e raramente nos caules, denominadas de nódulos. Entretanto, a capacidade de nodular não é comum em todas as espécies de leguminosas. A formação dos nódulos é um processo complexo que ocorre em várias etapas e envolve mudanças fisiológicas e morfológicas, tanto na célula hospedeira, quanto na bactéria. As mudanças na bactéria visam, principalmente, o recebimento de fontes de carbono da planta hospedeira, para prover o ATP (adenosina trifosfato) e poder redutor, necessários para o processo de FBN, enquanto que as mudanças na planta hospedeira visam assimilar a amônia produzida pelas bactérias (Hungria e Campo, 2005).

A FBN é um exemplo de associação biológica cujos benefícios para a sustentabilidade agrícola são reconhecidos, sendo possível substituir parcial ou totalmente a adubação nitrogenada (Hungria et al., 1999). Diversos fatores físicos, químicos e biológicos influenciam essa simbiose, e limitam seu estabelecimento, desenvolvimento e funcionamento.

A disponibilidade de nutrientes está entre os principais fatores edáficos que influenciam a FBN com destaque para o fósforo (P), potássio (K) e molibdênio (Mo). O P auxilia na nodulação pela transferência de energia na forma de ATP e no aumento no número de pêlos radiculares o que proporciona mais sítios de infecção para a bactéria (Gualter et al., 2008; Okeleye e Okelana, 1997; Othman et al., 1991). A deficiência de K afeta a fotossíntese e, conseqüentemente, o fornecimento de fotossintatos da planta para a bactéria, e limita a nodulação e a fixação simbiótica do nitrogênio (Gualter et al., 2008; Duke e Collins,

1985). Contudo, o suprimento de N via fertilização mineral também influencia esse processo em leguminosas, uma vez que as plantas podem absorver diretamente o N presente no solo (Oliveira et al., 2004).

Fatores predominantes nos solos da região amazônica, como pH ácido e alta concentração de alumínio tóxico, podem diminuir a população desses microrganismos no solo (Hungria & Vargas, 2000; Wood, 1995; Octive et al., 1994). No entanto, algumas estirpes podem desenvolver mecanismos de tolerância a esses fatores estressantes (Kawai et al., 2000; Watkin et al., 2000). Além dos fatores edafo-climáticos, esse processo é também influenciado pelas características genotípicas do macro e microssimbionte e modulado por uma intensa troca de sinais moleculares e reflete nas diferentes respostas em relação à faixa hospedeira, especificidade e eficiência simbiótica (Xavier et al., 2006; Hartwig, 1998).

O sucesso na obtenção de alta fixação do nitrogênio atmosférico na simbiose leguminosa-rizóbio depende de uma série de fatores. Entre eles, destacam-se a efetividade e competitividade das estirpes presentes no inóculo ou no solo, riqueza do inóculo em número de células, técnicas de inoculação, semeadura e fatores ambientais, principalmente, os fatores químicos e físicos do solo (Straliotto e Rumjanek, 1999; Zilli *et al.*, 1998; Vargas & Hungria, 1997). Uma associação rizóbio versus leguminosa eficiente, na qual a necessidade da planta por nitrogênio seja suprida, é o alvo de muitas pesquisas que são desenvolvidas no mundo, principalmente, nos trópicos, uma vez que o nitrogênio é um dos elementos do solo mais limitante da produção nestas áreas (Franco & Balieiro, 1999).

Em todas as leguminosas a fixação de N<sub>2</sub> não é iniciada até que a planta possa sustentar esta atividade, ou seja, ceder energia para que a bactéria possa entrar em atividade e fornecer o nitrogênio necessário, ou até que se esgote o nitrogênio presente na semente, e a planta, portanto, venha a sentir a falta deste elemento (Mercante et al., 1992).

## 2.2 Feijão Caupi

O feijão caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) pertence à família *Fabaceae* e atualmente está amplamente distribuído nas regiões tropicais, cujas características edafoclimáticas assemelham-se às do seu provável centro de origem, a África (Mostasso et al., 2002). Devido às condições de adaptabilidade e do hábito alimentar da população, o caupi é cultivado predominantemente nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, e alcança quase a totalidade das áreas plantadas com feijão nos estados do Amazonas, Roraima, Rio Grande do Norte, Ceará, Piauí e Maranhão (Santos *et al.*, 2007; Cravo & Souza, 2007; Freire Filho et al., 2007). Os três últimos estados, junto com a Bahia, detêm o status de maiores produtores da

região e apresentam as maiores áreas plantadas no Norte e Nordeste (Freire Filho *et al.*, 2007; Andrade Júnior *et al.*, 2003). Na zona rural predomina o cultivo dessa cultura para a produção de grãos secos e verdes, visando o consumo humano (Andrade Júnior *et al.*, 2003).

O feijão caupi é considerado uma cultura de alto valor genético com uma alta capacidade de fixar N em simbiose com bactérias dos grupo dos rizóbios, em especial do gênero *Bradyrhizobium*, além de uma ampla adaptação edafoclimática (Xavier, 2000; Bezerra, 1997; Ehlers & Hall, 1997), o que contribui positivamente para a produtividade da cultura. No entanto, a associação feijão caupi e rizóbios apresenta baixa especificidade, esse fato está relacionado com a promiscuidade da simbiose entre plantas de feijão caupi e estirpes de rizóbio nativos dos solos tropicais (Neves *et al.*, 1998; Lewin *et al.*, 1987).

Essa promiscuidade tem gerado certa desmotivação na busca de novas estirpes, porque as estirpes nativas responsáveis pela nodulação são competitivas para a formação dos nódulos, mas ineficientes para a fixação de nitrogênio (Rumjanek *et al.*, 2005). O aumento da eficiência do processo de nodulação e conseqüentemente da FBN é uma das formas de aumentar a produtividade da cultura do feijão (Franco *et al.*, 2002), além disso, melhorando-se o desempenho simbiótico pode-se, da mesma forma que ocorre com a soja, dispensar o uso de adubos nitrogenados para obtenção de maiores rendimentos (Rumjanek *et al.*, 2005). Portanto esse processo é uma alternativa com potencial valor para atender a necessidade de nitrogênio do feijão caupi (Mercante *et al.*, 2004).

As bactérias que nodulam caupi pertencem ao grupo “miscelânea caupi”, e a denominação de *Bradyrhizobium* sp, está agrupando um número grande de estirpes capazes de nodular diversas espécies de leguminosas herbáceas comuns nas regiões tropicais. Esse grupo heterogêneo de rizóbios, capazes de colonizar as raízes de uma ampla faixa de espécies leguminosas, caracteriza-se pelo crescimento lento e alcalinização do meio de cultura (Martins, 1996; Jordan, 1984). Por essa razão, o feijão caupi serve como planta-isca para determinação da diversidade de rizóbio, haja vista a sua ampla distribuição.

Quando a espécie nodulífera é promíscua, como o feijão caupi, torna-se mais difícil a introdução, estabelecimento e desenvolvimento da simbiose com populações eficientes. Portanto, este tem sido um dos principais entraves à maximização da FBN nesta cultura (Moreira & Siqueira, 2002).

#### **2.4 Comunidade nativa de BFNNL**

O levantamento da biodiversidade nativa de rizóbios de regiões de clima tropical, capazes de nodular espécie de importância agrícola e adaptadas a determinadas regiões, têm

demonstrado grande potencial para obtenção de bactérias resistentes a estresses ambientais (tolerância à temperaturas elevadas, à estresses hídricos, pH extremo, entre outros) (Zilli et al., 2008; Chagas Jr, 2007; Stanford et al., 2005; Hara & Oliveira, 2005; Lima et al., 2005; Martins et al., 2003) .

O estudo de rizóbios nativos, visando à seleção de estirpes altamente eficientes, é facilitado com o uso de plantas-iscas e isolamento das bactérias a partir dos nódulos formados. As características morfofisiológicas dos rizóbios, tais como o tempo de crescimento, alteração do pH, consistência do muco produzido, além de outras, fornecem informações importantes para a identificação e agrupamento de estirpes (Chagas Júnior et al., 2009).

A especificidade simbiótica e a competitividade das populações de rizóbios nativos também influenciam as respostas da inoculação (Xavier et al, 2006; Martins et al., 2003), além disso, a população de rizóbios no solo também depende das condições bióticas e abióticas deste ambiente e das espécies de leguminosas silvestres ou cultivadas, tanto em tamanho quanto em variabilidade (Castro et al., 1999; Simon et al., 1996).

A seleção de estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio deve objetivar estirpes eficientes e adaptadas às condições prevalentes no local de emprego, como os solos ácidos e de baixa fertilidade da Amazônia. Além disso, as estirpes selecionadas devem ser competitivas, em relação à população nativa e apresentarem vários aspectos agrônômicos e culturais, tais como potencial de nodulação, fixação de  $N_2$  e crescimento da planta hospedeira (Lima et al., 2005; Zilli et al., 2006). A busca de melhores estirpes deve começar pela mais ampla possível avaliação do material genético existente já adaptado de preferência às condições ambientais locais. A alta variabilidade genética em que o crescimento bacteriano está sujeito faz com que as características ditas desejáveis nos rizóbios, como efetividade, competitividade, sobrevivência no solo, tenham caráter transitório e por isso estejam sujeitas à seleção e melhoramento (Chagas Júnior, 2007).

Para a seleção e caracterização de bactérias fixadoras de nitrogênio, várias técnicas têm sido utilizadas, as quais levam em consideração tanto características fenotípicas como genotípicas. A identificação e a caracterização de estirpes de rizóbio têm sido feitas, tradicionalmente, baseadas nos resultados de especificidade por hospedeiro e as características morfológicas e fisiológicas (Zilli et al., 2000; Martins et al., 1997a,b). Além destas, outras características utilizadas é a produção de exopolissacarídeos, tolerância à acidez e alumínio tóxico (Andrade et al., 2002; Campo & Wood, 2001), bem como, a capacidade de solubilizar fosfatos (Vessey, 2003; Nahas, 2002; Gynaneshwar *et al.*, 2002; Igual *et al.*, 2001). Estas

características têm sido utilizadas com sucesso em estudos da ecologia de rizóbios (Chagas Jr., 2007; Hara & Oliveira, 2004, 2005; Martins et al., 1997b) e permitem acessar a diversidade de rizóbio presentes em diferentes ecossistemas e usos da terra (Lima *et al.*, 2005; Jesus *et al.*, 2005).

O processo de seleção de estirpes para determinada espécie vegetal envolve, de modo geral, quatro estádios. No primeiro, é verificada, em câmara de crescimento (condições ótimas e controladas de temperatura, umidade luminosidade e nutrientes), a capacidade de nodular e fixar nitrogênio de um número elevado de estirpes, testadas separadamente, em tubos ou em sacos plásticos com solução nutritiva livre de nitrogênio na forma mineral, com ou sem ágar, em condições estéreis. No segundo estágio, estirpes selecionadas são testadas em mistura de areia, vermiculita esterilizada e solução nutritiva livre de nitrogênio, em vasos de Leonard, em casa de vegetação. Nos estádios seguintes, as estirpes selecionadas são testadas em vasos contendo solo em casa de vegetação e, depois, no campo. Estirpes que não obtiverem boa performance nos estádios iniciais de seleção são eliminadas, pois, se em condições controladas não estabelecem simbiose eficiente, também não o farão nas condições mais estressantes do campo (Moreira & Siqueira, 2006).

A competitividade para a formação de nódulos é também altamente desejável, pois pode impedir a dominância de estirpes menos efetivas existentes no solo ou introduzidas com a semente. A sobrevivência é também importante, pois viabiliza a manutenção da população do rizóbio selecionado. Com frequência tem sido relatada uma relação inversa entre resposta à inoculação e tamanho da população de rizóbios nativos no solo (Weaver & Frederick, 1974; thies *et al.*, 1991). Por esta razão, é interessante estudar estratégias para avaliar a composição e a contribuição de estirpes de rizóbios nativos onde se pretende introduzir o inoculante (Zilli, 2001).

## LITERATURA CITADA

ANDRADE, D.S.; MURPHY, P.J.; GILLER, K.E.. Effects of liming and legume/cereal cropping on populations of indigenous rhizobia in an acid Brazilian Oxisol. **Soil Biology & Biochemistry**, 34: 477-485, 2002.

ANDRADE JUNIOR, A.S.; SANTOS, A.A.; SOBRINHOS, C.A.; BASTOS, E.A.; MELO, F.B.; VIANA, F.M.P.; FILHO, F.R.F.; CARNEIRO, J.S.; ROCHA, M.M.; CARDOSO, M.J.; SILVA, P.H.S.; RIBEIRO, V.Q. 2003. Cultivo do feijão caupi. **Embrapa**. Sistema de Produção, 2. Versão Eletrônica. Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>

ARAÚJO, R.S. Fixação biológica de nitrogênio em feijão. In: ARAUJO, R.S. & HUNGRIA, M., eds. Microrganismos de importância agrícola. Brasília, **Embrapa**, 1994. p. 91-120.

AVILA, M. Economics of agroforestry systems. In: SULLIVAN, G. M.; HUKU, S. M.; FOX, J. M. Financial and economic analysis of agroforestry systems. Paia, Hawaii: **Nitrogen Fixing Tree Association**, 1992. p. 77-94.

BALOTA, E.L.; COLOZZI FILHO, A.; ANDRADE, D.S. & DICK, R.P. Long-term tillage and crop rotation effects on microbial biomass and C and N mineralization. **Soil Till. Res.**, 77: 137-145, 2004.

BRAGA, R.F. **Efeitos da alteração do uso do solo na Amazônia Brasileira sobre serviços ecológicos proporcionados pelo Scarabaeinae (Coleóptera, Scarabaeidae)**. 2009. 61 p. Dissertação - Universidade Federal de Lavras – M.G.

BRANCO, S.M.; CAVINATTO, V.M. 1999. Solos: a base da vida terrestre. **Moderna**, São Paulo. 79pp.

BEZERRA, A.A. de C. **Variabilidade e diversidade genética em caupi (*Vigna unguiculata*, L. Walp.) precoce, de crescimento determinado e porte ereto e semi-ereto**. 1997. 105p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco - Recife.

CASTRO, S.; PERMIGIANI, M.; VINO CUR, M.; FABRA, A. Nodulation in peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots in the presence of native and inoculated rhizobia strains. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 13, p. 39-49, 1999.

CHAGAS JUNIOR., A.F. Características agronômicas e ecológicas de rizóbios isolados de solos ácidos e de baixa fertilidade da Amazônia. 2007. 157p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Amazonas - UFAM/ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA.

CHAGAS JUNIOR, A.F; OLIVEIRA, L.A; ARLEM NASCIMENTO DE OLIVEIRA, A. N; WILLERDING, A.L. Efetividade de rizóbios e caracterização fenotípica dos isolados que nodulam feijão-caupi em solos da Amazônia Central. **Acta Amazônica**, vol. 39(3) 2009: 489 – 494.

CRAVO; M.S.; SOUZA, B.D.L. 2007. Sistemas de cultivo de feijão-caupi na Amazônia. In: Zilli, J.E.; Vilarinho, A.A.; Melo, V.F. (Eds.). Workshop sobre a cultura do feijão-caupi em Roraima. Boa Vista, RR. **Embrapa Roraima**. p.6-14. (Embrapa Roraima. Documentos, 4).

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

DUPUY, N.; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; VANDENBRUAENE, I. Phenotypic and genotypic characterization of *Bradyrhizobium* nodulating the leguminous tree *Acacia albida*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.44, p.461-473, 1994.

EADY, R. R.; POSTGATE, J. R. Nitrogenase. **Nature**, n. 249, p. 805-810, 1974.

EHLERS, J.D.; HALL, A.E. Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **Field Crops Research**, v.53, p.187-204, 1997.

FERRAZ JÚNIOR A.L.S. O cultivo em aléias como alternativa para a produção de alimentos na agricultura familiar do trópico úmido. MOURA EG, Ed. Agroambiente de transição: Entre o trópico úmido e o semi-árido do Brasil. UEMA editora, São Luís 2004; 71-10.

FRANCO, A.A.; BALIEIRO, F.C. Fixação biológica do nitrogênio: Alternativa aos fertilizantes nitrogenados. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E.; CARVALHO, J.G. (eds.). **Inter-Relação Fertilidade, Biologia do Solo e Nutrição de Plantas**. Viçosa: SBCS, Lavras: UFLA/DCS. p. 577-595, 1999.

FRANCO, M. C.; CASSINI, S. T. A.; OLIVEIRA, V. R.; VIEIRA, C.; TSAI, S. M. Nodulação em cultivares de feijão dos conjuntos gênicos andino e meso-americano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 8, p. 1145-1150, 2002.

FRANCHINI, J.C.; CRISPINO, C.C.; SOUZA, R.A.; TORRES, E. & HUNGRIA, M. Microbiological parameters as indicators of soil quality under various tillage and croprotation systems in southern Brazil. **Soil Till. Res.**, 92: 18- 29, 2007.

FREIRE FILHO, F. R. Origem , evolução e domesticação do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) In: ARAÚJO, J. P. P. de; WATT, E.E. Org. **O Caupi no Brasil**. Goiânia: EMBRAPA-CNPAF/ Ibadan: IITA, 1988. p. 25-46.

FREIRE FILHO, F. R.; CARDOSO, M. J.; ARAÚJO, A. G. de; SANTOS, A.A. dos; SILVA, P. H. S. da. **Características botânicas e agronômicas de cultivares de feijão macassar** (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Teresina: EMBRAPA-UEPAE de Teresina, 1981. 40p. (EMBRAPA- Teresina. Boletim de Pesquisa, 4).

FREIRE FILHO, F.R.; LIMA, J.A.A.; RIBEIRO, V.Q. **Feijão caupi: avanços tecnológicos**. FREIRE FILHO, F.R.; LIMA, J.A.A.; RIBEIRO, V.Q (eds.). Brasília, DF. Embrapa Informações Tecnológicas. 519p, 2005.

FREIRE FILHO, F.R.; VILARINHO, A.A.; CRAVO, M.S.; CAVALCANTE, E.E. Panorama da cultura do feijão-caupi no Brasil. In: ZILLI, J.E.; VILARINHO, A.A.; MELO, V.F. (Eds.). Workshop sobre a cultura do feijão-caupi em Roraima. Boa Vista, RR. Embrapa Roraima. p.1-5. (Embrapa Roraima. Documentos, 4), 2007

GILLER, K. E. Nitrogen fixation in tropical cropping systems. 2. ed. Wallingford, UK: CABI International, 1997. 423 p.

GONÇALVES, A.S.; MONTEIRO, M.T.; BEZERRA, F.E.A.; GUERRA, J.G.M.; DE-POLLI, H. 1999. Estudo de Variáveis de Solo, Vegetação e Condicionamento de Amostras de Solo Sobre a Biomassa Microbiana do Solo no Estado do Rio de Janeiro. Embrapa Agrobiologia, Seropédica. 18p. (Embrapa- CNPAB. Documentos, 90).

GOODLAND, R. G. The concept of environmental sustainability. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 26, p. 1-24, Nov. 1995.

GUALTER, R.M.R; LEITE, L.F.C; ARAUJO, A.S.F; ALCANTARA, R.M.C.M; COSTA, D.B. Inoculação e adubação mineral em feijão- caupí: Efeitos na nodulação, crescimento e produtividade. **Scientia Agraria**, Curitiba, 9: 469-474, 2008.

GYANESHWAR, P.; KUMAR, G.N.; PAREKH, L.J.; POOLE, P.S. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plant. **Plant and Soil**, 245: 83-93.

HARA, F.A.S.; OLIVEIRA, L.A. 2004. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazônica**, 34: 343-357.

HARA, F.A.S.; OLIVEIRA, L.A. 2005. Características fisiológicas e ecológicas de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 40(7): 667-672.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. 2004. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazônica**, 34(3): 343-357.

HARTWIG, U. A. The regulation of symbiotic N<sub>2</sub> fixation: a conceptual model of N feedback from the ecosystem to the gene expression level. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**,1: 92-120, 1998.

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

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; ANDRADE, D. S.; CAMPO, R. J.; CHUEIRE, L. M. O.; FERREIRA, M. C.; MENDES, I. C. Fixação biológica do nitrogênio em leguminosas de grãos. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. (Ed.) **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Lavras: SBCS, 1999. p. 597-620.

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

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J. Fixação biológica do nitrogênio em sistemas agrícolas. *In: Congresso Brasileiro de Ciências do Solo, XXX*, 2005, Recife, Anais. Recife. 2005. Palestra. CD ROOM.

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

JESUS, E.C.; MOREIRA, F.M.S.; FLORENTINO, L.A.; RODRIGUES, M.I.D.; OLIVEIRA, M.S. 2005. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 40(8): 769-775.

JORDAN, D.C. 1984. Family III Rhizobiaceae. *In: KRIEGER, N.R.; HOLT, J.G. (Eds.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 234-256.*

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

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

LEWIN, A.; ROSENBERG, C.; MEYER, H.Z.A.; WONG, C.H.; NELSON, L.; MANEN, J.F.; STANLEY, J.; DOWLING, D.N.; DÉNARIE, J.; BROUGHTON, W.J. Multiple host-specificity *loci* of the broad host-range *Rhizobium* sp. NGR234 selected using the widely compatible legume *Vigna unguiculata*. *Plant Molecular Biology*, v. 8, p. 447-459, 1987.

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

LINDEMANN.V.C.; GLOVER, C.R. Nitrogen fixation by legumes Guide A- 129. Cooperative Extension Service College of Agriculture. *Home Economics*. México: Electronic Distribution May, 2003.

MARTINS, L.M.V. Características ecológicas e fisiológicas de rizóbios de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) isolados a partir de solos da região Nordeste do Brasil. 1996. 213p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Seropédica.

MARTINS, L.M.V.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brazil. *Soil Biology & Biochemistry*, 29(5/6): 1005-1010, 1997a

MARTINS, L.M.V.; XAVIER, G.R.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. 1997b. *Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de "rizóbio"*. Seropédica. *Embrapa Agrobiologia*. 14p. (Embrapa-CNPAB. Comunicado Técnico no 19).

MARTINS, L.M.V.; XAVIER, G.R.; RANGEL, F.W.; RIBEIRO, J.R.A.; NEVES, M.C.P.; MORGADO, L.B.; RUMJANEK, N.G. 2003. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the Semi-Arid Region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, 38(5): 333-339.

MARÉCHAL, R.; MASCHERPA, J. M; STAINIER, F. Étude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces de genres *Phaseolus* et *Vigna* (Papilionaceae) sur la base de données morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique. **Boissiera**, n. 28, p. 1-273, 1978.

MERCANTE, F. M. A inoculação do feijoeiro comum com rizóbio. Centro Nacional de Pesquisa de Biologia do Solo, 1992. 8 p. (CNPBS. Comunicado Técnico, 10). MERCANTE, F.M.; OTSUBO, A.A.; SILVA JÚNIOR, A. & VERALDO, F. Isolamento e seleção inicial de rizóbios obtidos de solos de Mato Grosso do Sul para inoculação em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Dourados, Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 24p. (Documentos, 67)

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2006, 620p.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. 2002. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras:UFLA.2002, 626p.

MOREIRA, F.M.S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSTERS, K.; FRANCO, A.A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative polyacrilamide gel electrophoresis of their total proteins. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 16, p. 135-146, 1993.

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. **Scientia Agricola** 65: 204-208, 2008.

MOSTASSO, L.; MOSTASSO, F.L.; DIAS, B.G.; VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Selection on bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, 73: 121-132, 2002

NAHAS, E. Microrganismos do solo produtores de fosfatases em diferentes sistemas agrícolas. **Bragantia**, Campinas, 61: 267-275, 2002.

NG, N. Q.; MARÉCHAL, R. **Cowpea taxonomy, origin germ plasm**. In: SINCH, S.R; RACHIE, K. O., eds. **Cowpea research, production and utilization**. Chichester, John Wiley, 1985. p. 11-21.

NEVES, M.C.P; MARTINS, L.M.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G. 1998. **Levantamento de estirpes de rizóbio capazes de nodular caupi (*Vigna unguiculata*) em solos do Nordeste do Brasil. I. Sertão**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 10p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 46).

OCTIVE, J.C.; JOHSON, A.C.; WOOD, M. Effects of previous aluminium exposure on motility and nodulation by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 26, p. 1477-1482, 1994.

ODUM, Ecologia. Guanabara Koogan, 1988.

OKELEYE, K. A.; OKELANA, M. A. Effect of phosphorus fertilizer on nodulation, growth and yield of cowpea (*Vigna unguiculata*) varieties. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, New Dehli, v. 67, p. 10-12, 1997.

OLIVEIRA, A.P. DE.; ALVES, E.V.; ALVES, A.V.; DORNELAS, C.S.M; SILVA, J.A.DA.; PORTO, M.L.; ALVES, A.V. Produção de feijão- fava em função de doses de fósforo em um Neossolo Regolítico. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 543-546, 2004.

OTHMAN, W. M. W.; LIE, T. A.; MANETJE, L.; WASSINK, G. Y.; WAN-OTHMAN, W. M. Low level phosphorus supply affecting nodulation, N<sub>2</sub> fixation and growth cowpea (*Vigna unguiculata*). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 15, p. 67-74, 1991.

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

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

PEREIRA, J.C.; NEVES, M.C.P.; GAVA, C.A.T. Efeito do cultivo da soja na dinâmica da população bacteriana em solos de cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 35: 1183-1190, 2000

REICHERT, J. M.; REINERT, D. J.; BRAIDA, J.A. Qualidade dos solos e sustentabilidade de sistemas agrícolas. **Ciência e Ambiente**, Santa Maria, v. 27, n. 2, p. 29-48, jul./dez. 2003.

RHEINHEIMER, D. S.; GONÇALVES, C. S.; PELLEGRINI, J. B. R. Impacto das atividades agropecuárias na qualidade da água. **Ciência e Ambiente**, Santa Maria, v. 27, n. 1, p. 85-96, jul./dez. 2003.

RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P. Fixação Biológica de Nitrogênio. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; SILVA, P. H. S.; VIANA, F. M. P. (Org.). **Feijão caupi: avanços tecnológicos**. p. 281-335, 2005.

VARGAS, M.A.T. & HUNGRIA, M. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. In: VARGAS, M.A.T. & HUNGRIA, M., eds. *Biologia dos solos dos cerrados*. Planaltina, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados, 1997. p. 297-360

SANTOS, C.E.R.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. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. v. 2, n. 4, p. 249-256, out-dez., 2007. Recife, PE.

SCHRÖDER, P. et al. Land use and sustainability: FAM research network on agroecosystems. **Geoderma**, Amsterdam, v. 105, p. 155-166, 2002.

SIMON, T.; KÁLALOVÁ, S.; PETRZIK, K. Identification of *Rhizobium* strains and evaluation of their competitiveness. **Folia Microbio**, v. 41, p. 65-72, 1996.

SOUZA, Z. M.; ALVES, M. C.; Propriedades químicas de um Latossolo Vermelho Distrófico de Cerrado sob diferentes usos e manejos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 27, n. 1, p.133-139, jan./fev.2003.

STAMFORD, N. P.; NEPTUNE, A. M. L. Especificidade hospedeira e competição entre estirpes de *Rhizobium* em inoculação cruzada com quatro cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Cad. Omega**, Recife, n. 3, p. 25-34, 1979.

STAMFORD, N.P.; SANTOS, C.E.R.S.; SANTOS, P.R.; SANTOS, K.S.R.; MONTENEGRO, A. 2005. Effects of rock phosphate, sulphur with and without *Acidithiobacillus* and organic by-products on mimosa (*Mimosa caesalpiniiifolia*) grown in a Brazilian tableland soil Trop. **Grass. Brisbane**, 39: 54-61.

STEELE, W. M, MEHRA, K. L. Structure, evolution and adaptation to farming system and inveronment in *Vigna*. In: SUMMERFIELD, D.R; BUNTING, A.H., eds. **Advances in legume science**. England, Royol Botanic Gardens, 1980. p. 459-468.

STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N.G. **Aplicação e evolução dos métodos moleculares para o estudo da biodiversidade do rizóbio**. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1999. 70p. (Documentos 93).

TERBORGH, J. Maintenance of diversity in tropical Forest. **Biotropica**, St. Louis, 24: 288-292, June. 1992.

THEODORO, V.C.A.; ALVARENGA, M.I.N.; GUIMARÃES, R.J.; MOURÃO JÚNIOR, M. Carbono da biomassa microbiana e micorriza em solo sob mata nativa e agroecossistemas cafeeiros. **Acta Scientiarum: Agronomy**, Maringá, 25(1): 147-153, 2003

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. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 19-28, 1991.

TURNER, I.M. Species loss in fregmentes of tropical rain florest: a review of evidence. **Journal of Applied Ecology**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 200- 209, Apr. 1996.

WATT, E. E. **First annual report on the EMBRAPA/IITA - Cowpea Program in Brasil**. Goiânia, EMBRAPA-CNPAP, 1978. 55p.

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

WEAVER, R. W.; FREDERICK, L. R. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max* L. Merril – I: greenhouse studies. **Agronomy Journal**, Madison, v. 66, p. 229-232, 1974.

WILLEMS, A.; DOIGNON-BOURCIER, F.; COOPMAN, R.; HOSTE, B.; DE LAJUDIE, P.; GILLIS, M. AFLP fingerprint analysis of *Bradyrhizobium* strains isolated from *Faidherbia albida* and *Aeschynomene* species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 23, p. 137-147, 2000.

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

VARGAS, L.K.; SCHOLLES, D. 2000. Biomassa microbiana e produção de C-CO<sub>2</sub> e N mineral de um podzólico vermelho-escuro submetido a diferentes sistemas de manejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, 24: 35-42.

VARGAS, M.A.T. & HUNGRIA, M. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. In: VARGAS, M.A.T. & HUNGRIA, M., eds. **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados, 1997. p. 297-360.

VASCONCELOS, I.; ALVES, J. F.; LIMA, I. T. Nodulação de feijão-de-corda, *Vigna unguiculata* (L.) Walp., ao longo do ciclo cultural da planta. **Ciencia Agronomica**, Fortaleza, v. 6, n. 1/2, p. 11-15, 1976. VERDCOURT, B. Studies in the Leguminosae - Papilionoidea for the flora of tropical East Africa. IV. **Kew Bulletin**, v. 24, p. 597-569, 1970.

VESSEY, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255:571-586.

XAVIER, G.R. **Estudo da ocupação nodular de genótipos de caupi (*Vigna unguiculata*) agrupados pela técnica de RAPD**. 2000.113p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - Seropédica.

XAVIER, G. R. et al. Especificidade simbiótica entre rizóbio e acessos de feijão-caupi de diferentes nacionalidades. **Revista Caatinga**, v. 19, n. 01, p. 25-33, 2006.

ZALAMENA, J. **Impacto do uso da terra nos atributos químicos e físicos de solos do rebordo do Planalto-RS**. 2008. 70 p. Dissertação - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo - RS.

ZILLI, J. E.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. Diversidade genética em um sistema integrado de produção agroecológica In: FERTBIO 98, V SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 5., 1998, Caxambu. **Resumos...** SBCS: Caxambu, 1998.

ZILLI, J.E.; RUMJANEK, N.G.; FREIRE FILHO, G.R. NEVES, M.C.P. 2000. *Levantamento de rizóbios isolados de nódulos de caupi cultivado em amostras de solos do Cerrado do Estado do Piauí*. Seropédica: **Embrapa Agrobiologia**. 23p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 125).

ZILLI, J.E. **Caracterização e seleção de estirpes de rizóbio para a inoculação de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) em áreas de Cerrado**. 2001. 112p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - Seropédica.

ZILLI, J. E. et al. Caracterização e avaliação da eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* em caupi nos solos de cerrados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, p. 811-818, 2006.

ZILLI, J.E.; XAVIER, G.R. RUMJANEK, N.G. 2008. BR 3262: Nova estirpe de *Bradyrhizobium* para a inoculação de feijão-caupi em Roraima. **Embrapa Roraima**. 7p. (Embrapa Roraima. Comunicado Técnico, 10).

**NODULAÇÃO DO CAUPI (*Vigna unguiculata*), E  
EFICIÊNCIA DA COMUNIDADE NATIVA DE BACTÉRIAS  
DIAZOTRÓFICAS DE ÁREAS DE AGRICULTURA FAMILIAR  
NO CENTRO-NORTE MARANHENSE**

---

**CAPITULO II**

**NODULAÇÃO DO CAUPI (*Vigna unguiculata*), E EFICIÊNCIA DA  
COMUNIDADE NATIVA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS DE ÁREAS DE  
AGRICULTURA FAMILIAR NO CENTRO-NORTE MARANHENSE <sup>(1)</sup>**

**Tércia Cristina dos Reis Silva<sup>(2)</sup>, José Geraldo Donizetti dos Santos<sup>(3)</sup>, Danúbia Lemes Dadalto<sup>(2)</sup>, Kátia Perreira Coelho<sup>(4)</sup>, Meirijane Rodrigues de Sousa<sup>(5)</sup>, Gustavo Ribeiro Xavier<sup>(6)</sup>, Emanuel Gomes Moura<sup>(7)</sup>, Alana das Chagas Ferreira Aguiar<sup>(8)</sup> & Guillaume Xavier Rousseau<sup>(9)</sup>**

<sup>1)</sup> Dissertação de mestrado do primeiro autor. Programa de Pós-Graduação em Agroecologia, Universidade Estadual do Maranhão – UEMA. Recebido para publicação em \_\_\_\_\_ de 2011 e aprovado em \_\_/\_\_/\_\_.

<sup>(2)</sup> Bolsista da CAPES, Universidade Estadual do Maranhão – UEMA. CEP 65.000-000. São Luís (MA). E-mail: terciacristinareis@yahoo.com.br; danubiadadalto@hotmail.com

<sup>(3)</sup> Professor Adjunto I da Universidade Federal do Tocantins – UFT/EMVZ. CEP 77804-970 Araguaína -TO. E-mail: [jgsanttos@uft.edu.br](mailto:jgsanttos@uft.edu.br)

<sup>(4)</sup> Bolsista FAPEMA, Universidade Federal de Lavras – UFLA. CEP-----, Lavras (MG). E-mail: [katiapc2004@yahoo.com.br](mailto:katiapc2004@yahoo.com.br)

<sup>(5)</sup> Aluna do curso de graduação em Agronomia. E-mail: [meirijanne22@hotmail.com](mailto:meirijanne22@hotmail.com)

<sup>(6)</sup> Pesquisador da Embrapa Agrobiologia

<sup>(7)</sup> Professor Adjunto da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA. CEP São Luís -MA. E-mail: [egmoura@elo.com.br](mailto:egmoura@elo.com.br)

<sup>(8)</sup> Professora Adjunta da Universidade Federal do Maranhão – UFMA. E-mail: [alanaaguiar@elo.com.br](mailto:alanaaguiar@elo.com.br)

<sup>(9)</sup> Pesquisador do Mestrado em Agroecologia da Universidade Estadual do Maranhão, UEMA. E-mail: [guilirous@yahoo.ca](mailto:guilirous@yahoo.ca)

**NODULAÇÃO DO CAUPI (*Vigna unguiculata*), E EFICIÊNCIA DA COMUNIDADE NATIVA DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS DE ÁREAS DE AGRICULTURA FAMILIAR NO CENTRO-NORTE MARANHENSE**

Tércia Cristina dos Reis Silva, José Geraldo Donizetti dos Santos, Danúbia Lemes Dadalto, Kátia Perreira Coelho, Meirijanen Rodrigues de Sousa, Gustavo Ribeiro Xavier, Emanuel Gomes Moura, Alana das Chagas Ferreira Aguiar & Guillaume Xavier Rousseau

**RESUMO:**

Dentre as inúmeras espécies leguminosas que se beneficiam naturalmente da fixação biológica do nitrogênio (FBN), o feijão caupí (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) tem merecido atenção, pois é largamente cultivado nas regiões norte e nordeste, devido sua boa adaptação as condições edafoclimáticas, além de ser essencial de segurança alimentar e fonte de renda para a agricultura familiar. O objetivo deste trabalho foi estudar comunidades nativas de bactérias fixadoras de nitrogênio em simbiose com o feijão caupí, provenientes de áreas de agricultura familiar sob distintos manejos de solos, no centro-norte maranhense. As áreas amostradas foram: Sistema de corte e queima; área com aração e gradagem de um ARGISSOLO PETROPLINTICO; plantio direto com leguminosa *Clitoria fairchildiana* (sombreiro); Aléias de leguminosa *C. fairchildiana* com seis anos de implantação; Pastagem de *Brachiária brizantha* em processo de degradação; Área com vegetação nativa de capoeira como referência e em casa de vegetação duas testemunhas (nitrogenada e absoluta). Houve ocorrência de rizóbios em todos os tratamentos. No entanto, os tratamentos aléias e plantio direto foram mais eficientes em abrigar uma comunidade de rizóbios compatível mais eficiente para o crescimento da cultura, superior até á testemunha nitrogenada. A biomassa seca do caupí variou de 7,1 g planta<sup>-1</sup> no sistema em aléias com 6 anos de implatação a 0,7 planta<sup>-1</sup> na testemunha Sem-N. A menor produção de biomassa seca, sob efeito da inoculação, foi verificado com bactérias oriundas da capoeira (2,06 g planta<sup>-1</sup>). Um total de 76 isolados nativos foram obtidos dos diferentes sistemas de uso do solo, com a grande maioria apresentando crescimento lento. Quanto aos fatores abióticos (pH, NaCl e temperatura) os isolados obtidos apresentaram comportamentos muito parecidos. Já para a caracterização genotípica das bactérias foi observada alta diversidade dos isolados e ausência de similaridade dos isolados nativos e os padrões utilizados. As estirpes nativas das áreas estudadas promoveram nodulação no caupí confirmando a promiscuidade da cultura. O sistema em

aléias foi capaz de estimular e abrigar uma comunidade de rizóbios mais eficiente em promover o crescimento do caupi quando relacionado com as outras áreas estudadas.

**Termos de indexação:** rizóbio, comunidades nativas, fixação biológica de nitrogênio, manejo do solo.

## ABSTRACT

Among the numerous legume species that benefit from biological nitrogen fixation, *Vigna unguiculata* (L.) Walp (cowpea) is of special interest as it is largely cultivated in the North and North Eastern region of Brazil. The specie is well adapted to local soil and climate conditions and therefore is essential for food safety and basic income for small farmers. The objective of this work was to study the native community of N-fixing bacteria simbiotic with cowpea from different soil management practices in small farmers area from Centre-North Maranhão state. Soil management practices were: slash-and-burn; area with plowing and harrowing a ULTISOL PETROPLINTHIC; 6-y-old alley cropping with *Clitoria fairchildiana* ; degraded *Brachiária brizantha* pasture; secondary forest. Rizobia were present in all soil managements nevertheless, alley cropping hosted a rizobia community more efficient to colonize and promote *Vigna Unguiculata* (L) growth. Cowpea dry biomass was 7.1 g.plant<sup>-1</sup> in the 6y alley cropping compared to 0.7g.plant<sup>-1</sup> in the control without N. The lowest dry biomass was produced with bacteria from the secondary forest. Seventy-six native isolates were cultivated from soil managements, most of them had low growth rate. Isolates had similar responses to abiotic factors pH, NaCl and temperature. However, the genotype characterization of bacterial isolates showed high diversity and low similarity with the control strains. The isolates of all soil managements were able to nodulate *Vigna Unguiculata* (L) thus confirming its promiscuity. The 6-y-old alley cropping system was able to stimulate and host a rizobia community more efficient to promote *V. Unguiculata* growth when compared to the other soil managements.

**Indexing terms:** Rizobium, native community, biological nitrogen fixation, soil management

## INTRODUÇÃO

O Maranhão é considerado um estado de transição, pois está localizado entre o domínio amazônico e o semi-árido. Essa localização lhe confere características diferenciadas quanto ao regime hídrico, temperaturas médias altas, e quanto às características dos solos, que em grande maioria são frágeis, ácidos e de baixa fertilidade natural. Nestas áreas é comum a agricultura familiar de subsistência, com reduzida capacidade de investimentos e de superação das limitações naturais dos solos. A agricultura itinerante de corte e queima predomina neste modelo de agricultura no trópico úmido (Moura, 2004).

A agricultura itinerante ou roça no toco é caracterizada pelo corte e queima da vegetação nativa, o cultivo sob as cinzas, como fonte de nutrientes e o posterior abandono da área (pousio). Esse sistema coopera com as emissões de CO<sub>2</sub> e NO<sub>2</sub> contribuindo para o efeito estufa (Grace, 2004); perda da matéria orgânica e empobrecimento do solo (Mackensen et al., 1996; Hölscher et al., 1997). Também reduz a biodiversidade vegetal ao eliminar aquelas espécies não adaptadas às queimadas, aumenta o risco de erosão, além do empobrecimento biológico do ecossistema (Moura et al., 2009). Estudos realizados nas áreas de agricultura familiar do centro norte do Maranhão, têm encontrado excelentes alternativas para o adequado manejo destes solos, sem causar degradação e ainda recuperar e aumentar sua capacidade produtiva ao longo do tempo. Uma destas tecnologias é o sistema de plantio direto em aléias.

Este sistema de cultivo tem sua origem nas áreas montanhosas da África (Ong, 1994) e combina na mesma área o plantio de culturas anuais e leguminosas arbóreas, cujos galhos e folhas são podados anualmente e depositados entre as fileiras das culturas de interesse econômico (Kang et al., 1990). Portanto, garante a cobertura morta do solo, reduz o processo erosivo, retém a umidade, aumenta a matéria orgânica e fertilidade do solo favorecendo o desenvolvimento das culturas e de microrganismos benéficos às plantas (Cooper et al., 1996), a exemplo dos simbiotróficos fixadores de nitrogênio.

Esses microrganismos fazem simbiose com leguminosas e são capazes de reduzir enzimaticamente o nitrogênio da atmosfera em forma biologicamente assimilável, sendo utilizado para o crescimento e manutenção das células. Esse processo é chamado de fixação biológica de nitrogênio (FBN) (Moreira & Siqueira, 2006) Tal grupo de organismos é diversificado e desempenha papel de grande importância na recuperação, manutenção e sustentabilidade dos agroecossistemas (Bazzicalupo & Okon, 2000), especialmente para a agricultura de baixos insumos.

Dentre as inúmeras espécies leguminosas que se beneficiam naturalmente da FBN, o feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) tem merecido atenção (Freire Filho et al., 2005).

Este tem sido largamente cultivado nas regiões norte e nordeste, pois possui boa adaptação as condições edafoclimáticas (Freire Filho et al., 2005), é essencial para segurança alimentar e fonte de renda para a agricultura familiar. No entanto, tem apresentado baixa produtividade média, sendo a causa principal a indisponibilidade de nutrientes no solo, em especial o N, principalmente na região tropical úmida onde é comum alta precipitação e fluxo vertical de água no solo favorecendo as perdas (Dechert et al., 2005). A necessidade de incrementar os sistemas tradicionais com a disponibilidade de nitrogênio, em especial a biologicamente mediada (Drinkwater e Snapp, 2007), tem importância fundamental, tanto pela alta demanda das culturas, quanto pela grande mobilidade no sistema solo-planta e risco de contaminação do ambiente pelas fontes solúveis (Aguilar et al., 2009).

O feijão caupi é uma leguminosa considerada promíscua por sua grande facilidade em associar-se com diversos gêneros de bactérias fixadoras de nitrogênio podendo ser utilizada com sucesso em estudos de ocorrência e eficiência simbiótica destas bactérias (Melloni et al., 2006; Handley et al., 1998). E assim contribuir para a viabilidade da exploração da FBN no trópico úmido e o desenvolvimento de práticas ecologicamente sustentáveis, com reflexo para a melhoria da qualidade do solo e exploração agrícola (Kennedy, 1999).

O Manejo adequado das bactérias fixadoras de nitrogênio e a exploração do seu potencial benéfico envolvem conhecer as comunidades nativas destes microrganismos, quanto a sua identidade, eficiência simbiótica e sua resposta ao manejo de solo adotado. Portanto, conhecer a relação existente entre o sistema de manejo e atributos do solo que tem reflexo direto na sustentabilidade do sistema e qualidade ambiental representa avanços nesta área de estudo e suporte para o correto manejo destes solos, principalmente quando a estratégia envolve técnicas agroecológicas de cultivo como o plantio direto sob sistema de aléias. Diante disso este trabalho objetivou-se verificar a ocorrência e a eficiência de isolados nativos de bactérias fixadoras de nitrogênio em simbiose com o caupi, em diferentes usos do solo na agricultura familiar do centro norte do maranhão.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Amostragem de solo e manejos estudados**

O local da coleta de solo situa-se no município de Miranda do Norte - Maranhão, localizado a 3° 36' de latitude Sul e 45° 24' de longitude Oeste, a 60m de altitude. Esta é uma área de assentamento da reforma agrária, de agricultores familiares e o solo é um PLINTOSSOLO ARGILÚVICO Distrófico típico (Embrapa, 2006). Os sistemas de uso da terra e manejo amostrados foram: Agricultura itinerante de corte e queima (Roça no toco);

Área arada e gradeada de um ARGISSOLO PETROPLÍNTICO; Plantio direto com *Clitoria fairchildiana* (sombreiro) com três anos de implantação; Aléias de leguminosa *C. fairchildiana* com seis anos de implantação; Pastagem de *Brachiária brizantha* em processo de degradação; Área com vegetação nativa de capoeira como referência.

A área sob Argissolo petroplíntico com camada impeditiva passou por uma aração seguida de gradagem. O sistema em aléias com 6 anos foi implantado no ano de 2002, a capoeira foi desmatada e o solo foi corrigido com calcário para a implantação desse sistema. Foi utilizada a leguminosa arbórea nativa *Clitoria fairchildiana* (sombreiro) cultivada no espaçamento de 0,5m entre plantas e 2,6 m entre fileiras. Essas leguminosas foram cortadas anualmente a 0,5m do solo e seus ramos espalhados para manutenção da cobertura do solo. Nas entrelinhas das leguminosas foram plantadas culturas anuais (arroz, feijão, milho, mandioca, curcubitáceas). O sistema de plantio direto foi implantado em dezembro de 2005, foi efetuada a queima da capoeira de aproximadamente 5 anos e utilizada a leguminosa *Clitoria fairchildiana* (sombreiro). A capoeira tem aproximadamente 10 anos e predominância de tucum (*Astrocaryum vulgare*), babaçu, jurubeba (*Solanum paniculatum* L.) e sansão (*Mimosa cae salpineaefolia*). A área de pastagem predomina a *Brachiaria brizantha*, e está sob acelerado estado de degradação, com ocorrência de plantas do gênero *Cyperus* e a palmeira babaçu (*Attalea speciosa*).

Todas as áreas foram amostradas em outubro de 2008, na profundidade de 0 a 20 cm, sendo coletadas três amostras compostas por área. Cada amostra composta continha seis subamostras. Após a coleta o material foi adequadamente armazenado e levado para a Universidade Estadual do Maranhão-UEMA, setor de Agroecologia, campus de São Luís, onde os ensaios de laboratório de casa de vegetação foram conduzidos. Também foi realizada a análise química do solo, segundo metodologia de IAC (2001) (Tabela 1).

### **Nodulação e eficiência simbiótica da comunidade indígena de BFNNL**

A nodulação do feijão caupi foi avaliada partir do aparecimento de nódulos nas raízes, e sua eficiência com base na fórmula da eficiência relativa.

O experimento foi instalado no Núcleo Tecnológico de Engenharia Rural da Universidade Estadual do Maranhão, em casa de vegetação. Para acessar a comunidade nativa de BFNNL foram utilizados vasos de Leonard, segundo metodologia descrita em Andrade & Hamakawa (1994). Estes vasos são compostos por duas subunidades, a subunidade superior contém uma mistura de areia e vermiculita na proporção 1:1 e a subunidade inferior contém solução

nutritiva com macro e micronutrientes. Os vasos foram autoclavados por 1 hora à pressão de  $1,5 \text{ Kgf.cm}^{-2}$ . A planta hospedeira utilizada foi o feijão caupi, cultivar BRS Guariba.

As amostras de solo, oriundas das áreas sob diferentes manejos, foram diluídas a  $10^{-1}$ , em solução salina (0,55% de NaCl) e esta suspensão, provavelmente contendo células de bactérias diazotróficas nodulíferas, foi utilizada como única fonte de inóculo para a planta hospedeira. O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, com três repetições. Também foram implantadas duas testemunhas não inoculadas, uma recebeu solução de Hoogland completa (testemunha nitrogenada) e a outra recebeu solução de Hoogland sem nitrogênio (testemunha absoluta), que também foi aplicada para os tratamentos inoculados com a suspensão de solo. As soluções nutritivas foram utilizadas com 50% da concentração original e autoclavadas por 20 minutos, a uma pressão de  $1,20 \text{ Kgf.cm}^{-2}$ .

As sementes de caupi utilizadas foram desinfestadas superficialmente com álcool 70% por 4 minutos, seguida de hipoclorito de sódio a 1% de cloro por 3 minutos. Em seguida foram lavadas sucessivas vezes até a retirada completa de qualquer resíduo, posteriormente foram semeadas três sementes por vaso. Após cinco dias da germinação procedeu-se o desbaste deixando apenas duas plantas por vaso. As plantas foram mantidas em casa de vegetação até o florescimento, aproximadamente 45 dias após a germinação, ocasião em que foram coletadas, separadas em parte aérea e raízes e nódulos quando presentes.

Após o período de condução em casa de vegetação, determinou-se o peso seco da parte aérea (PSPA), após secagem em estufa de circulação forçada de ar a temperatura de  $60^{\circ}\text{C}$  por 72 horas, o número e o peso seco dos nódulos e o teor de N na parte aérea do caupi (Tedesco, 1995). Para facilitar o entendimento do comportamento das plantas de caupi, em relação aos tratamentos estudados, foi calculada a eficiência relativa, conforme descrito abaixo.

$$Efr = (MSPA_{\text{inoculado}} / MSPA_{\text{com N}}) \times 100$$

Onde: *Efr* = eficiência relativa; *MSPA<sub>inoculado</sub>* = massa seca da parte aérea do tratamento inoculado; *MSPA<sub>com N</sub>* = massa seca da parte aérea da testemunha nitrogenada (média das repetições).

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade e análise de variância seguido do teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### **Isolamento, caracterização fenotípica e tolerância a fatores ambientais das BFNNL**

As bactérias isoladas das raízes de caupi provenientes de cada sistema de manejo do solo foram isoladas e caracterizadas com base nas características morfológicas e quanto a resistência a pH, sal e temperatura.

Nesta etapa foram utilizados três nódulos de cada tratamento, um pequeno, um médio e um grande. Estes foram desinfestados superficialmente com álcool 95% por três minutos, posteriormente imersos em hipoclorito de sódio a 1% por um minuto e lavados 6 vezes com água autoclavada. Os nódulos então foram macerados com o auxílio de uma pinça devidamente esterilizada e riscados em placas de petri com meio YMA (Fred & Waksman, 1928), de forma a obter colônias isoladas.

Obtidas as colônias isoladas, foram avaliadas as seguintes características culturais: tempo em dias para a visualização das colônias (rápido-2 a 3 dias; intermediário-4 a 5 dias; lento-6 a 10 dias e muito lento > de 10 dias); diâmetro médio das colônias; densidade das colônias (opaca ou translúcida); produção de goma (alta, média ou baixa), coloração das colônias (amarela, branca, rosa), forma das colônias, produção de goma (baixa, média ou alta); elevação (convexa ou plana) e consistência (viscosa ou gomosa). Após a obtenção das colônias puras, os isolados foram cultivados em placas de petri contendo meio YMA (Fred & Waksman, 1928) a pH 6,5 e incubados a 28°C por cinco dias para os testes de tolerância a fatores ambientais.

Para os testes de acidez e alcalinidade, os isolados foram crescidos em meio YMA com pH ajustado para 4, utilizando ácido acético (absoluto), e para 12 com hidróxido de potássio (1M), acrescido de 5 ml/l de azul de bromotimol (0,5 g/l) e incubados a 28°C. A salinidade foi avaliada transferindo os isolados para o meio YMA modificado a pH 6,5, acrescido de 1%, 2%, 3% de NaCl. Para o teste de tolerância a temperatura os isolados foram transferidos para o meio 79 e logo após foram incubados a 45°C. As avaliações do crescimento foram feitas em intervalos de 3, 6, 9 e 12 dias.

Uma matriz binária foi construída utilizando as características culturais obtidas. 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 similaridade de Jaccard (J). Este método se baseia na média das distancias entre todos os pares de genótipo para a formação de grupos específicos (Bertan *et al.*,2006). Foi utilizado o programa NTSYSpc versão 2.1 (Rohlf, 1992) para a formação de dendogramas de similaridade fenotípica e de tolerância a fatores abióticos.

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

Os genes que codificam o 16S rRNA dos isolados de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas de leguminosas (BFNNL) foram amplificados através da reação em cadeia da polimerase (PCR) e posteriormente analisados por eletroforese através da técnica da análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA) em que um perfil de DNA de cada bactéria foi obtido.

Para as análises de restrição do DNA, foram utilizados 22 isolados representativos do total de 76. A representatividade dos grupos de isolados escolhidos teve como parâmetro a diversidade fenotípica. De cada grupo com características semelhantes foi escolhido apenas um isolado para a avaliação genotípica.

Colônias puras foram cultivadas em placas de pétri com meio YMA e incubadas a 28°C até apresentarem crescimento satisfatório. Após o crescimento uma pequena quantidade de massa celular foi transferida 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), seguiu-se a extração de DNA conforme metodologia descrita por Xavier et al. (2004). A purificação do DNA foi feita conforme metodologia de Ferreira & Grattapaglia (1998). A qualidade da extração do DNA foi avaliada através da visualização após eletroforese em gel de agarose a 0,8% horizontal em tampão TBE 0,5% a 80V constante, corado com brometo de etídeo, utilizando marcador de peso molecular 1 Kb.

A reação de PCR (polymerase chain reaction), método de amplificação de DNA, 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. Utilizou-se os primers 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 φX174 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 µL 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 similaridade de Jaccard e o método UPGMA de agrupamento para a construção de um dendograma de similaridade genotípica.

## RESULTADOS

### Análise de solo

Os indicadores químicos da qualidade do solo das áreas estudadas, usado como única fonte de inóculo para o caupi e de onde foram estudadas as comunidades indígenas de bactérias diazotróficas nodulíferas, revelaram uma tendência geral de baixa fertilidade e são apresentados na tabela 1. Todas as áreas apresentaram pH ácido, principalmente nas duas áreas de aléias. O teor de C-orgânico também foi mais baixo nestas duas áreas. Ao contrário, as áreas de aléias e plantio direto apresentaram teores mais elevados de P (acima de  $6,0 \text{ mg dm}^{-3}$ ) e de Al ( $13 \text{ mmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ), em relação às demais áreas, já o menor teor de P foi verificado no solo sob a pastagem ( $2,0 \text{ mg dm}^{-3}$ ).

### Nodulação e crescimento do feijão caupi

Bactérias diazotróficas compatíveis com a cultivar de caupi estudada estavam presentes em todas as áreas. As comunidades indígenas de rizóbios diferiram quanto à habilidade de promover a nodulação e estimular o crescimento da planta hospedeira, em relação ao uso e manejo do solo adotado (Tabela 2). Nenhum nódulo foi encontrado nas testemunhas não inoculadas (Com-N e Sem-N), isto evidencia as adequadas condições de condução do experimento. Abundante nodulação foi observada nas plantas inoculadas com bactérias oriundas das áreas de aléias, plantio direto e capoeira (até aproximadamente  $340 \text{ nódulos planta}^{-1}$ ) e escassa nodulação no corte e queima (menos de  $50 \text{ nódulos planta}^{-1}$ ). O peso seco dos nódulos (PSN) também variou marcadamente, de  $0,8 \text{ g planta}^{-1}$  (aléia 6 anos) a  $0,3 \text{ g planta}^{-1}$  sob influência da área arada e gradeada de um Argissolo petroplúntico com camada impeditiva.

Assim como verificado para a nodulação, a maioria das áreas estudadas possuíam comunidades de rizóbios nativos eficientes em estimular o crescimento do caupi. A biomassa seca do caupi variou de  $7,1 \text{ g planta}^{-1}$  (Aléia 6 anos) a  $0,7 \text{ g planta}^{-1}$  (Testemunha Sem-N). Dentre as áreas estudadas, o menor peso seco da parte aérea (PSPA) foi verificado sob

influência da capoeira ( $2,1 \text{ g planta}^{-1}$ ). Este, também, foi o único tratamento inferior à testemunha Com-N. Destaque para as áreas de aléias e plantio direto, com crescimento superior ao tratamento que recebeu nitrogênio mineral, ou seja, que apresentaram as únicas comunidades de rizóbios indígenas mais eficientes que a adubação nitrogenada aplicada. Os teores de nitrogênio na parte aérea do caupi apresentaram ligeira variação, apresentado amplitude entre os tratamentos de  $12,9 \text{ g kg}^{-1}$  (testemunha Sem-N) a  $31,7 \text{ g kg}^{-1}$  (capoeira). Pelo menos uma das áreas estudadas foi superior às testemunhas absoluta e nitrogenada (Tabela 2).

### **Caracterização dos rizóbios associados ao caupi, baseada na taxa de crescimento e morfologia das colônias**

Um total de 76 isolados de BFNNL foi obtido dos nódulos de caupi inoculados com suspensão de solo (diluição  $10^{-1}$ ) oriunda das seis áreas estudadas, dos quais 46 são de crescimento lento e 30 de crescimento rápido (Tabela 3). Deste total de isolados, a maior quantidade foi obtida da área arada e gradeada de um Argissolo petroplúntico com camada impeditiva (18 isolados), seguida de 16 na aléia 6 anos, 13 na Capoeira, 11 na pastagem, 10 no plantio direto e por último o corte e queima com apenas 8. Com exceção do corte e queima, nas demais áreas predominaram rizóbios de crescimento lento, os quais alcalinizam o meio e apresentam pouca produção de goma. O total de 76 isolados, obtidos das seis áreas de campo estudadas, foram agrupados em apenas 22 isolados com características distintas sendo estes utilizados para a construção do dendograma de diversidade fenotípica.

O dendograma de similaridade com base nas características morfológicas apresentou alta diversidade, demonstrada pela similaridade final de 16% (figura 1). Não houve coerência entre os grupos obtidos e os sistemas de uso e manejo do solo. O grupo VIII foi o que apresentou maior número de isolados, dos quatro isolados pertencentes a este grupo três se agruparam com similaridades de 100% e estes são provenientes da área de corte e queima, aléias 6 anos e capoeira.

### **Tolerância dos rizóbios a fatores abióticos**

A partir dos fatores ambientais analisados (pH, salinidade e temperatura) foi formado um dendograma de similaridade. Este teve similaridade final de 50%, mostrando que houve poucas diferenças entre os grupos com relação à resistência a esses fatores. Foram formados três grupos com similaridade superior a 70%, o grupo I foi o mais numeroso apresentando nove isolados, proveniente dos sistemas corte e queima, pastagem, plantio direto, aléias 6

anos e capoeira. Esse grupo foi caracterizado por isolados que se desenvolveram bem em pH 12, salinidade a 1% e temperatura de 45°C (Figura 2). O grupo II englobou sete isolados capturados de três sistemas de uso da terra, sendo da área arada e gradeada de um ARGISSOLO PETROPLÍNTICO, aléias 6 anos e capoeira. Dentro desse grupo, quatro isolados apresentaram semelhança de 100%, em relação a estas características. Não se observou nenhuma relação dos grupos com o sistema de manejo do solo utilizado. As características semelhantes a todos os isolados desse grupo foram a falta de sensibilidade a salinidade, não obtendo desenvolvimento de nenhum dos isolados nos três teores NaCl. O grupo III foi formado de 6 isolados dentre os quais 5 tiveram índice de similaridade máxima, tais isolados pertencem aos sistemas de cultivo corte e queima, aléias 6 anos e da área arada e gradeada de um Argissolo petroplíntico com camada impeditiva. A semelhança desses isolados, a tais fatores, está evidenciada na capacidade de resistirem aos dois extremos de pH.

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

O perfil de restrição do 16s rDNA dos 22 isolados gerou um dendograma de similaridade genética, o qual resultou em quatro grandes grupos (Figura 3). Um alto grau de diversidade foi expresso por meio do nível de similaridade final dos isolados (25%). O grupo A agregou a metade dos isolados e duas estirpes de *Bradyrhizobium*. Dentro desse grande grupo houve a formação de três subgrupos com similaridade menor que 70%, onde não foi observado nenhum agrupamento com base no sistema de cultivo utilizado. Os grupos B e C foram formados exclusivamente pelos padrões de rizóbios utilizados nesse estudo. O grupo D englobou os demais isolados com similaridade em torno de 28%. A técnica de ARDRA permitiu revelar uma alta diversidade entre os isolados, pois a grande maioria apresentou perfis únicos.

## **DISCUSSÃO**

### **Nodulação e crescimento do feijão caupi**

A nodulação do feijão caupi inoculado com suspensão de solo em condições controladas, é indicativo da ocorrência de rizóbios compatíveis nas seis áreas de campo estudadas. Não há relatos de histórico de inoculação de rizóbios nesta cultura na região. Portanto, as bactérias que induziram a nodulação do caupi são de comunidades nativas. Da mesma forma, a variação na nodulação e resposta do caupi, sob influência dos diferentes sistemas de uso da

terra e manejo estudados, evidencia a natureza da composição e afinidade das comunidades de rizóbios suportadas por cada área.

O plantio direto e o sistema em aléias apresentaram uma comunidade indígena de rizóbios compatível e eficiente que promoveu um bom desenvolvimento do caupi, em contrapartida foi observado que no sistema capoeira apesar de ter uma alta nodulação a comunidade de rizóbios foi ineficiente em promover o crescimento desta leguminosa. Este fato pode ter relação com a presença de leguminosas nas áreas em aléias e plantio direto, além do fato de que há histórico do plantio de caupi nesses sistemas, proporcionando dessa forma maior adaptabilidade dos isolados, e melhor eficiência na fixação biológica de nitrogênio nessa cultura. Pois práticas agrícolas que permite a cobertura vegetal do solo, pode resultar na melhoria da qualidade e sustentabilidade do solo, refletindo diretamente nas comunidades de microorganismos presentes nestes solos (Hungria et al., 1997; Primavesi, 1997; Ambrosano, et al. 2000). O incremento na fixação biológica do nitrogênio nos manejos onde houve uma cobertura vegetal e uso de leguminosas pode ser atribuída a várias características favoráveis desses sistemas: pela manutenção dos macroagregados do solo, preservando o nicho principal de atividade dos microrganismos, representando maior fonte de energia e nutrientes para os microrganismos, pela redução nas temperaturas máximas e na oscilação de temperaturas do solo, bem como maior retenção de umidade do solo, o que favorece o crescimento e atividade dos microrganismos (Sidiras et al., 1982; Derpsch et al., 1991; Franchine et al., 2000).

O melhor desempenho dos tratamentos aléias e plantio direto pode relaciona-se também com os pequenos níveis de P no solo dos sistemas em aléias e plantio direto (Tabela 1), visto que este elemento atua na atividade da nitrogenase, que é fonte direta de energia para o processo da FBN contribuindo dessa forma para a seleção natural e multiplicação de rizóbios mais eficientes nestas duas áreas. Segundo Chaudhary e Fujita (1998) o fósforo potencializa a FBN por estimular o crescimento de plantas hospedeiras além de influenciar diretamente a formação dos nódulos. Para Freire Filho et al., (2005), a deficiência do P pode reduzir a produção da biomassa do hospedeiro e a demanda por consumo de N<sub>2</sub> fixado, reduzindo a força de dreno para o nódulo e conseqüentemente o funcionamento dos nódulos.

Outra característica que pode ter grande relevância na resposta dos sistemas em aléias e do plantio direto é o teor de matéria orgânica no solo (Tabela 1), pois segundo Moreira & Siqueira (2006) quanto menor o teor de MO menos nitrogênio mineral é liberado no sistema contribuindo para uma maior participação da FBN para o crescimento vegetal e, conseqüente, a multiplicação das bactérias nativas locais.

A alta promiscuidade do feijão caupi observada nesse experimento confirma a premissa de que ele pode ser usado eficientemente como planta isca para a captura de rizóbios nativos. Corroborando com dados de Melloni et al. (2006), que avaliando a diversidade de isolados de caupi e feijão comum em áreas reabilitadas após mineração de bauxita, observaram que o caupi é mais indicado que o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L) para estudos de nodulação, eficiência e diversidade fenotípica, por recuperar maior diversidade de isolados de rizóbio. Com a presença de grande número de nódulos no sistema capoeira e sua baixa eficiência relativa confirma que a comunidade nativa dessa área tem grande poder competitivo para a nodulação, porém baixa eficiência para fixação biológica de nitrogênio. Pois a presença de estirpes de rizóbios competitivas e de baixa eficiência, além da promiscuidade das espécies são fatores importantes na redução da eficiência e no estabelecimento da simbiose de estirpes inoculadas (Fernandes Júnior e Reis 2008).

O acúmulo de massa seca do caupi foi maior nos tratamentos aléias e plantio direto (Tabela 2), a presença permanente de leguminosas arbóreas nesses sistemas pode ter influenciado positivamente na melhor eficiência do processo simbiótico. Segundo Moreira & Siqueira (2006) a presença de plantas hospedeiras estimula as populações de rizóbios nativas e cultivos continuados tendem a selecionar estirpes melhor adaptadas. Adicionalmente sistemas de uso do solo com características conservacionistas tendem a conservar a biota do solo e sua estrutura (Cooper et al., 1996; Ferraz Júnior, 2004).

O parâmetro número de nódulos (NN) não influenciou diretamente no acúmulo de matéria seca provavelmente por estar relacionado com a efetividade dos nódulos. Apesar da raiz ter vários nódulos estes podem se mostrar ineficientes ou mesmo em estado de senescência não podendo desempenhar sua função ecológica. A efetividade na formação dos nódulos e a fixação de  $N_2$  por estirpe de rizóbio estão diretamente influenciadas com a promiscuidade, por meio da produção de nódulos funcionais com estirpes da miscelânea feijão-caupi (Gwata et al. 2004).

A área de Capoeira apresentou menor peso seco da parte aérea (PSPA), o que pode estar relacionado à existência de uma comunidade nativa de rizóbios ineficiente em fixar N. De fato, foi observado baixos dados de peso seco dos nódulos (PSN) e eficiência relativa (Efr). Ademais, a capoeira apresentou maior conteúdo de N/kg de matéria seca, o que está relacionado à baixa estatura das plantas e conseqüentemente maior concentração de N em comparação aos demais tratamentos.

A resposta da nodulação do caupi aos diferentes sistemas de uso do solo estudados, não está relacionada com uma insuficiente população de rizóbios nativos, já que o caupi nodulou

em todas as áreas, e sim com uma comunidade de rizóbios indígenas eficiente em fixar o nitrogênio, a exemplo a área de capoeira.

### **Caracterização dos rizóbios associados ao caupi, baseada na taxa de crescimento e morfologia das colônias**

A maior parte dos isolados obtidos nesse trabalho apresentaram crescimento lento, diâmetro em torno de 1mm e colônias opacas, características do gênero *Bradirrhizobium* (Saleena et al., 2001; Zilli et al., 2004; 2006). Em contrapartida rizóbios de crescimento rápido também foram presentes. Segundo Zhang et al. (2007) alguns trabalhos já evidenciaram que rizóbios de crescimento rápido também são capazes de induzir nódulos no caupi. Estes resultados corroboram com os encontrados por Soares et al., (2006) que ao estudarem a eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões- MG, concluíram que apesar do feijão caupí ser uma espécie formadora de simbiose com estirpes de crescimento lento ela também pode nodular com gêneros de crescimento rápido.

O maior número de isolados de crescimento rápido apresentado na área de corte e queima, está relacionado ao fato de que estes isolados são mais comuns em regiões com limitações a umidade e altas temperaturas. Esta característica constitui uma estratégia de sobrevivência, já que são mais tolerantes à seca do que os de crescimento lento e se multiplicam rapidamente em curto espaço de tempo úmido, o que explicaria sua maior frequência nos solos das regiões semi-áridas (Santos et al., 2007). Estudos realizados por Figueiredo et al. (1996) mostraram que a ocorrência de rizóbio de crescimento lento ou rápido parece estar relacionada com aspectos ambientais, tais como altas temperaturas, umidade, pH e salinidade. Outra característica de destaque nesse sistema de uso do solo foi a presença de grupos de isolados com alta produção de goma. A produção de muco representa um mecanismo envolvido no processo de adaptação e sobrevivência do rizóbio em condições adversas de solo e clima, além de alterar a permeabilidade das células, tornando as estirpes mais resistentes a fatores bióticos de competição no solo, como a presença de microrganismos produtores de antibióticos (Bastista et al., 2007).

Apesar do caupi nodular amplamente com rizóbios de crescimento lento e rápido, o grupo de crescimento lento se mostra mais eficiente e compatível para estimular o crescimento da cultura. Fato que pode ser comprovado ao observar os sistemas em aléias onde as estirpes de crescimento lento predominaram em termos de número de isolados e tiveram melhor eficiência relativa.

### **Tolerância dos rizóbios a fatores abióticos**

Houve alta diferenciações no perfil morfocultural das comunidades nativas de rizóbios. De fato, foi observado uma similaridade final de 16%. Dos 8 grupos formados não foi observada nenhuma relação das características observadas com os sistemas de manejo do solo. Isso nos leva a inferir que o agrupamento leva mais em consideração as condições climáticas a que esses tratamentos estão expostos que o próprio modo de cultivo, pelo menos em um curto período de tempo. A existência de agrupamentos, com alta similaridade, abrangendo isolados provenientes de sistemas distintos sugere que o mesmo isolado, ou isolados morfoculturalmente semelhantes, podem ser encontrados nos diferentes sistemas estudados. Segundo Hameed et al. (2004), o estudo das características fisiológicas e morfológicas revela uma diversidade bastante ampla dos isolados de rizobio e costuma estar relacionado com estudos em nível de DNA. Estes dados são importantes, já que o conhecimento de comunidades nativas de rizóbios revelam-se fundamentais para o estudo da diversidade das espécies.

O dendograma de similaridade dos fatores ambientais estudados originou três grupos com similaridade maior que 70%. O primeiro grupo caracterizado por bom desenvolvimento em pH 12, salinidade a 1% e a temperatura de 45°C, sugere que a comunidade nativa de BFNNL desses sistemas de uso da terra poderiam expressar melhor sua eficiência em fixar o nitrogênio, visto que o pH dos solos em questão são baixos, podendo então interferir no desenvolvimento e na capacidade desses isolados no processo de FBN. Contudo esse grupo mostra maior capacidade de sobreviverem a períodos de estresse térmico, caracterizando-se como um grupo de grande potencial competitivo para solos dessa região que alcançam altas temperaturas. A alta temperatura alcançada na superfície dos solos tropicais torna-se um dos principais fatores limitantes no processo de fixação simbiótica de nitrogênio nos trópicos (Vargas & Hungria 1997).

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

O dendograma de similaridade das características genéticas gerado mostrou diferenças no perfil dos isolados, e nenhuma relação de agrupamento com a origem das estipes. Estes resultados enfatizam a promiscuidade do feijão caupi e indicam ausência de diferenciação da comunidade nativa com base no sistema de cultivo. Devido a baixa similaridade final do grupo A, em relação ao gênero *Bradyrhizobium*, não se pode garantir que os isolados nativos sejam pertencentes a esse gênero. O grupo D englobou os demais isolados com similaridade

em torno de 28%. A técnica de ARDRA permitiu revelar uma alta diversidade entre os isolados, pois a grande maioria apresentou perfis únicos. A ausência de similaridade entre os isolados nativos e os padrões utilizados pode estar relacionada com o fato de esses padrões serem oriundos de regiões com características ambientais distintas das existentes no local, além de indicar a possibilidade da existência de estirpes ainda não descritas, visto não haver outras pesquisas nessa linha na área de estudo.

## CONCLUSÕES

1. O sistema agroflorestal de cultivo em aléias e o plantio direto foram capazes de estimular e abrigar uma comunidade de rizóbios compatível para nodular o feijão caupi abundantemente e eficiente para o crescimento da cultura, em relação às demais áreas estudadas.
2. As características morfoculturais dos isolados dos diferentes sistemas de manejo mostra predominância de estirpes de crescimento lento, as quais o predominam em simbiose com o caupi.
3. A alta diferenciação genética de bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em simbiose com o caupi obtida neste estudo sugere a existência de novas espécies ainda não identificadas.

## LITERATURA CITADA

- AGUIAR, A.C.F.; BICUDO, S.J.; COSTA SOBRINHO, J.R.S.; MARTINS, A.L.S.; COELHO K.P, MOURA EG 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.* 335:363-371, 2009.
- AMBROSANO, E.J.; MURAOKA, T.; AMBROSANO, G.M.B.; TRIVELIN, P.C.º; WUTKE, E.B.; TAMISO, L.G. O papel das leguminosas para adubação verde em sistemas orgânicos. In: Curso regional de agricultura orgânica/adubação verde para agricultura orgânica. Piracicaba-SP, p17-76, 2000.
- ANDRADE, D.S.; HAMAKAWA, P.J.. Estimativa do Número de Células de Rizóbio no Solo e Inoculantes por infecção em planta. In. HUNGRI, M.; ARAUJO, R.S.. Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Brasília: EMBRAPA-SPI, p. 63-94, 1994.
- BATISTA, J. S. S.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; FERREIRA, M. C.; MENDES, I. C. Variability in *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* seven years after introduction of both the exotic microsymbiont and the soybean host in a cerrados soil. *Microbial Ecology*, v. 53, n. 2, p. 270-284, 2007.
- BAZZICALUPO, M. & OKON, Y. Associative and endophytic symbiosis. In: PEDROSA, F.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G. & NEWTON, W.E., eds. Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 2000. p.409-410.
- 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. Agrocência*, 12: 279-286, 2006.
- CARVALHO, J. G. (Ed.). Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas: Soil fertility, soil biology, and plant nutrition interrelationships. Viçosa: SBCS, Lavras: UFLA/DCS, 1999. p. 487 - 508.
- CHAUDHARY, M.I, FUJITA, K. Comparison of phosphorus deficiency effects on the growth parameters mashbean, mugbean, and soybean, *Soil Science and plant Nutrition*, Tokio. V.44 n.1. p.19-30, 1998.
- COLOZZI-FILHO A.; BALOTA, E.L. & ANDRADE, D.S. Microrganismos e processos biológicos no sistema plantio direto. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES.A.S.; GUILHERME, L.R.G.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A.E. & CARVALHO, J.C., eds. Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas, Lavras, Viçosa:SBCS, Lavras, Universidade Federal de Lavras, 1999. p.487-508.
- COOPER, P.J.M.; LEAKEY, R.R.B.; RAO, M.R.; REYNOLDS, L. 1996. Agroforestry and the mitigation of land degradation in the humid and sub-humid tropics of Africa. *Experimental Agriculture*, 32: 235-290.

DECHERT G, VELDKAMP E, BRUMME R (2005) Are partial nutrient balances suitable to evaluate nutrient sustainability of land use systems? Results from a case study in Central Sulawesi, Indonesia. *Nutr Cycl Agroecosyst* 72:201-212

DERPSCH, R.; ROTH, C.H.; SIDIRAS, N. & KOPKE, U. Controle da erosão no Paraná, Brasil: Sistemas de cobertura do solo, plantio direto e preparo conservacionista do solo. Eschborn, Londrina, GTZIAPAR, 1991. 272p.

DRINKWATER LE, SNAPP SS (2007) Nutrients in Agroecosystems: Rethinking the Management Paradigm. *Adv Agron* 92:163-186.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Sistema brasileiro de classificação de solos. 2. ed. Brasília: Embrapa Produção de Informação; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006.

FERRAZ JUNIOR, A.S.L. O cultivo em aléias como alternativa para a produção de alimentos na agricultura familiar do trópico úmido. In: MOURA, E.G. (Ed.). *Agroambientes de transição: entre o trópico úmido e o semi-árido do Brasil*. São Luís: Universidade Estadual do Maranhão, 2004. cap.3, p. 71-100.

FIGUEIREDO, M. V. B.; STAMFORD, N. P.; MEDEIROS, R.; SANTOS, C. E. R. S. Efeito da adubação com diferentes relações potássio/magnésio no jacatupé em latossolo amarelo com e sem inoculação. *R. Bras. Ci. Solo*, 20: 49-54, 1996.

FRANCHINI, J.C.; BORKERT, C.M.; FERREIRA, M.M. & GAUDÊNCIO, C.A. Alterações na fertilidade do solo em sistemas de rotação de culturas em semeadura direta. *R. Bras. Ci. Solo*, 24:459-467, 2000.

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

FREIRE FILHO, F.R.; LIMA, J.A.A.; RIBEIRO, V.Q.. Feijão caupi: avanços tecnológicos. FREIRE FILHO, F.R.; LIMA, J.A.A.; RIBEIRO, V.Q (eds.). Brasília, DF. Embrapa Informações Tecnológicas, 2005. 519p

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. Brasília:EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.

FERNANDES JÚNIOR, P.I; REIS, V.M. Algumas limitações a fixação biológica de nitrogênio em leguminosas. *Seropédica: Embrapa Agrobiologia*, 2008. 33p ( Documento/ Embrapa Agrobiologia, ISSN 1517- 8498; 252)

GRACE, J. Understanding and managing the global carbon cycle. *Journal of Ecology*, 92: p.189-202, 2004

GWATA, E. T.; WOFFORD, D. S; PFAHLER, P. L; BOOTE, K. J. Genetics of promiscuous nodulation in soybean: nodule dry weight and leaf color score. *Journal of Heredity*, 95(2): 154-157, 2004.

HAMEED, S.; YASMIN, S.; MALIK, K. A.; ZAFAR, Y.; HAFEEZ, F. Y. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Agrobacterium* strain isolated from cultivated legumes. *Biology and Fertility of Soils*,39: 179-185, 2004.

HANDLEY, B.A.; HEDGES, A.J.; BERINGER, J.E. Importance of host plant for detecting the population diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* in soil. *Soil Biology & Biochemistry*.30: 241-249, 1998.

HARA, F.A.S.; OLIVEIRA, L.A. 2005. Características fisiológicas e ecológicas de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 40(7):667-672.

HÖLSCHER, D.; MOELLER, R.F.; DENICH, M. & FÖLSTER, H. (1997): Nutrient input-output budget of shifting agriculture in eastern Amazonia. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 47: 49-57.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A. Importância do sistema de semeadura na população microbiana do solo. Comunicado Técnico/Embrapa-Soja, Londrina, Paraná, no 56, 1997, p.1-9.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J. Fixação biológica do nitrogênio em sistemas agrícolas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 30., 2005, Pernambuco. Solos, sustentabilidade e qualidade ambiental. Pernambuco: SBCS, UFPE; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2005. p.1-30.

INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS. Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. IAC, Campinas. 2001.

KANG, B. T.; REYNOLDS, L.; ATTA-KRAH, A. N. Alley farming. *Advanced Agronomy*, 43:15-359,1990.

KENNEDY, A.C.; PAPENDICK, R.I. Microbial characteristics of soil quality. *Journal of Soil and Water Conservation*,50:.243- 248, 1995.

KENNEDY, A.C. Bacterial diversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 74: 65-76, 1999.

LIMA, A.S.; PEREIRA, J.P.A.R.; MOREIRA, F.M.S. 2005. Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. de solos da Amazônia. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 40(11):1095-1104.

MACKENSEN, J.; HÖLSCHER, D.; KLINGE, R. & FÖLSTER, H. (1996): Nutrient transfer to the atmosphere by burning of debris in eastern Amazonia. *Forest Ecology and Management*. 86: 121-128.

MELLONI, R.; MOREIRA, F. M. D.; NOBREGA, R. S. A; SIQUEIRA, J. O. Efficiency and phenotypic diversity among nitrogen-fixing bacteria that nodulate cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) walp] and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in bauxite-mined soils under rehabilitation. *R. Bras. Ci. Solo*,30:235-246, 2006.

MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2006,729p.

MOURA, E.G. In: MOURA, E.G. (Org.). Agroambientes de transição entre o trópico úmido e o semi-árido do Brasil: atributos, alternativas, usos na produção familiar. São Luís: UEMA, 2004, 312p.

MOURA, E.G.; ARAÚJO, J.R.G.; MONROE, P.H.M.; NASCIMENTO, I.O. & AGUIAR, A.C.F. Patents on periphery of the Amazon rainforest. Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture, 1:142-148, 2009.

ODUM, Ecologia. Guanabara Koogan, 1988

OLIVEIRA, L. A; VIDOR, C. Capacidade competitiva de estirpes de *Rhizobium japonicum* em solos com alta população deste *Rhizobium*. R. Bras. Ci. Solo, 8:49-55 Ong, C.K. (1994): Alley cropping - ecological pie in the sky? Agroforestry Today 6(3) :8-10, 1984.

ONG, C. 1994. Alley Cropping—Ecological Pie in the Sky? In: Agroforestry Today, July-September 1994.

PELCZAR, M.J., E.C.S. CHAM, N.R. KRIEG, D.D. Edwards & M.F. Pelczar. Microbiologia: conceitos e aplicações. Pearson Makron Books, Vol. II, São Paulo. 2005, 517p.

PEREIRA, E.G. Diversidade de rizóbio isolados em diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia. 93 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

PRASAD, P.; BASU, S.; BEHERA, N. A comparative account of the microbiological characteristics of soils under natural forest, grassland and crop field from Eastern India. Plant and Soil,175:85-91, 1994.

PRIMAVESI, A. Agroecologia: ecosfera, tecnosfera e agricultura. São Paulo, Nobel, 1997. 199p.

PERREIRA, J.P.A.R; FERREIRA, P.A.A; DO VALE; NOGUEIRA, C.O.G; SOARES A.L.L.; MOREIRA, F.M.S. E ANDRADE, M.J.B. Nodulação e produtividade de feijão-caupi cv Poços de caldas por estipes selecionadas de rizóbios em Iguatama- MG. FERTIBIO, 2004, Lages, SC. Resusmo expandido.

PEREIRA, A.A; HUNGRIA M; FRANCHINI JC; KASCHUK G; CHUEIRE LMO; CAMPO RJ; TORRES E. 2007. Variações qualitativas e quantitativas na microbiota do solo e na fixação biológica do nitrogênio sob diferentes manejos com soja. R. Bras. Ci. Solo, 31: 1397-1412.

ROHLF, J.F. NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system: version 1.70. New York, Applied Biostatistics, 1992.

RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P. Fixação Biológica de Nitrogênio. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; SILVA, P. H. S.; VIANA, F. M. P. (Org.). Feijão caupi: avanços tecnológicos. p. 281-335, 2005.

SALEENA, L. M.; LOGANATHAN, P.; RANGARAJAN, S; NAIR, S. Genetic diversity and relationship between Bradyrhizobium strains isolated from blackgram and cowpea. *Biology and Fertility of Soils*, 34:276-281, 2001.

SANTOS, C. E. R. 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. de C. Ag.*, 2:249-256, 2007.

SIDIRAS, N.; HENKLAIN, J.C. & DERPSCH, R. Comparison of three different tillage systems with respect to aggregate stability, the soil and water conservation and the yields of soybean and wheat on an Oxisol. *J. Agron. Crop Sci.*, 151:137-148, 1982.

SOARES, AL.L.; PERREIRA, J.P.A.R; FERREIRA,P.A.A; VALE, H.M.M.; LIMA, A.S.;ANDRADE,M.J.B; MOREIRA, F.M.S. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas modulíferas em Perdões (MG). *R. Bras. Ci. Solo* v 3º, nº 5. Voçosa. 2006.

TEDESCO, M.J., GIANELLO, C., BISSANI, C.A.,. *Análise de solos, plantas e outros materiais*. UFRGS, Porto Alegre. 1995.

VARGAS, M.A.T. & M. HUNGRIA. 1997. *Biologia dos solos dos cerrados*. Embrapa-CPAC, Planaltina, DF. 524 p.

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).

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.

ZHANG, W. T.; YANG, J. K.; YUAN, T. Y.; ZHOU, J. C. Genetic diversity and phylogeny of indigenous rhizobia from cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. *Biology and Fertility of Soils*,44: 201-210, 2007.

ZILLI, J. E.; VALISHESKI, R. R.; FREIRE, F. R.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Assessment of cowpea rhizobium diversity in Cerrado areas of Northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*,35:281-287, 2004.

ZILLI, J. E.; VALICHESKI, R. R.; RUMJANEK, N. G.; SIMOES-ARAÚJO, J. L.; FREIRE, F. R.; NEVES, M. C. P. Symbiotic efficiency of cowpea Bradyrhizobium strains in Cerrado soils. *Pesq. Agrop. Bras.*,41: 811-818, 2006.

**Tabela1.** Análise química do solo das áreas de agricultura familiar estudadas.

Tratamentos	Cult. aração e grade	Corte e queima	Pastagem	Plantio direto	Aleias 6 anos	Capoeira
pH (CaCl <sub>2</sub> )	5,1 a	4,8 b	5,2 a	4,6 c	4,5 c	4,9 b
P (mg/ dm <sup>3</sup> )	3,0 c	3,0 c	2,0 d	6,0 b	8,7 a	3,0 c
K ( mmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	3,00 c	3,93 ab	4,03 a	3,43 bc	2,26 d	3,23 c
Ca ( mmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	36,67 a	27,0 d	31,0 b	29,0 bc	20,0 e	27,7 bc
Mg ( mmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	14,34 b	14,66 b	29,66 a	29,00 b	15,66 b	17,00b
H+Al( mmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	34,0 c	38,7 b	28,3 d	49,0 a	38,0 b	32,7 c
Na ( mmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	4,9 c	6,5 a	6,6 a	5,7 b	3,9 d	5,2 bc
Al ( mmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	1,3 c	6,0 b	1,3 c	13,0 a	13,3 a	3,0 c
C ( %)	3,04 a	1,63 d	2,21 c	1,49 d	0,94 e	2,49 b

Médias seguidas pela mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Turkey a 5 % de probabilidade

**Tabela 2.** Número de nódulos (NN), peso seco de nódulos (PSN), peso seco da parte aérea (PSPA), eficiência relativa (Efr), e teor de nitrogênio na parte aérea do feijão caupi (N).

TRATAMNENTOS	NN	PSN (g)	PSPA (g)	EFR (%)	N total (g.kg <sup>-1</sup> )
Cult. aração e grade	116,8 bcd	0,3 bc	4,0 b	100,6 b	20,6 bc
Corte e queima	49,7 cd	0,4 b	3,3 bc	82,6 bc	24,3 ab
Pastagem	71,5 cd	0,3 bc	3,6 bc	90,9 bc	20,7 bc
Plantio direto	340,5 a	0,3 b	5,9 a	149,1 a	20,6 bc
Aleia6	286,2 ab	0,8 a	7,1 a	178,6 a	19,7 bc
Capoeira	330,2 abc	0,3 b	2,1 cd	51,7 cd	31,7 a
Test.com N	0,0 d	0,0 c	3,9 b	100,0 b	20,0 bc
Test.sem N	0,0 d	0,0 c	0,7d	16,7 d	12,9 c

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Turkey a 5 % de probabilidade

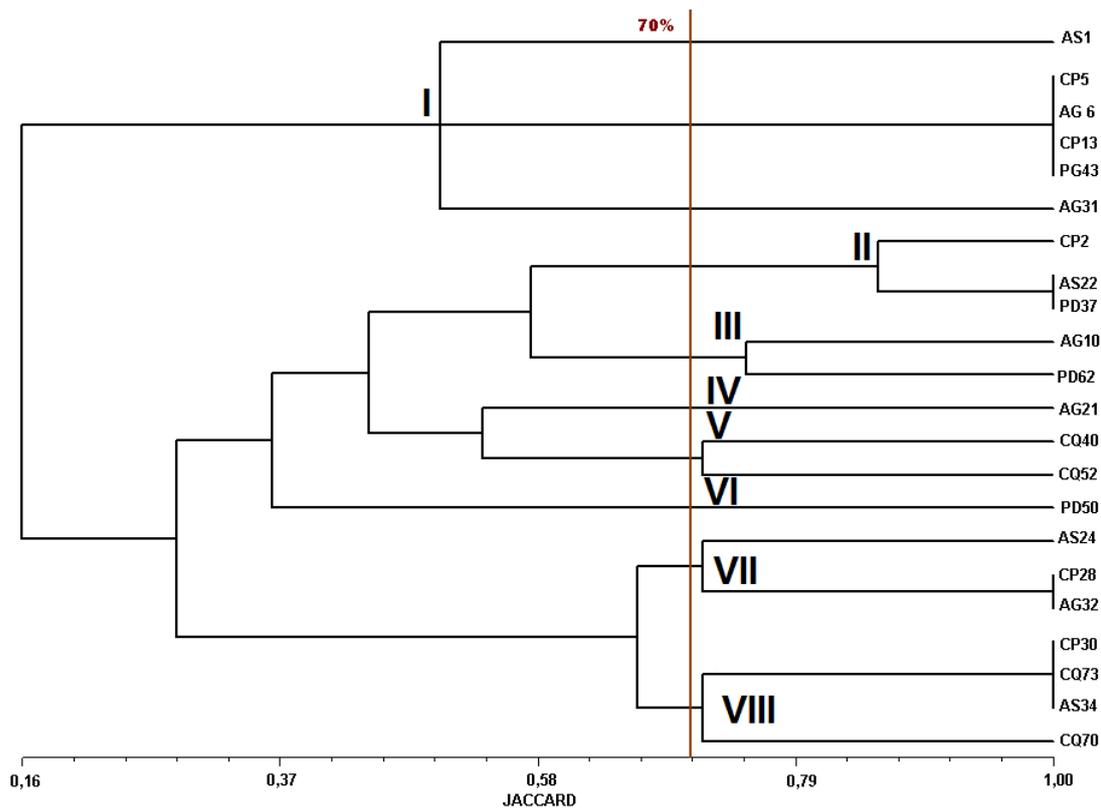
**Tabela 3.** Caracterização morfo-cultural de rizóbios baseada nas características fenotípicas das colônias 1=Tempo em dias para o aparecimento de colônias isoladas (R= rápido, 1 a 5 dias), (L= lento, 6 a 10 dias); 2= Diâmetro da colônia (mm); 3= Cor da colônia; 4= Forma da colônia; 5= Produção de goma; 6= Densidade

Uso da terra	CARACTERÍSTICAS									GRUPOS
	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>	
Cult. aração e grade	R	<1 1 a 2	branca amarela	circular	pouca	translúcida opaca	viscosa gomosa coreácea	alta pouca	achatada convexa	7
	L	<1 1 a 2	branca	circular	pouca média	opaca translúcida	viscosa gomosa	pouca média	achatada convexa	11
Corte e queima	R	<1 1 a 2	branca	circular	pouca alta média	opaca translúcida	viscosa	alta	achatada	5
	L	<1	branca	circular	pouca	translúcida opaca	viscosa	pouca	achatada	3
Pastagem	R	<1 1 a 2	branca amarela	circular	pouca alta	opaca translúcida	viscosa	pouca	achatada convexa	3
	L	<1	branca	circular	pouca média	opaca translúcida	viscosa gomosa	pouca média	achatada convexa	8
Pantio direto	R	<1	branca	circular	pouca média	opaca	gomosa coreácea	pouca	achatada	3
	L	<1 1 a 2	branca	circular	pouca	opaca translúcida	viscosa coreácea	pouca	achatada convexa	7
Aléias 6	R	<1 1 a 2	branca amarela	circular	pouca média	translúcida opaca	gomosa viscosa gomosa	pouca alta	convexa achatada	7
	L	<1	branca	circular	pouca média	translúcida opaca	viscosa gomosa	pouca média	achatada convexa	9
Capoeira	R	<1	branca	circular	alta pouca	translúcida opaca	gomosa viscosa	pouca	achatada	5
	L	<1 1 a 2	branca rosa	circular	pouca média	translúcida opaca	viscosa coreácea	pouca	achatada convexa	8

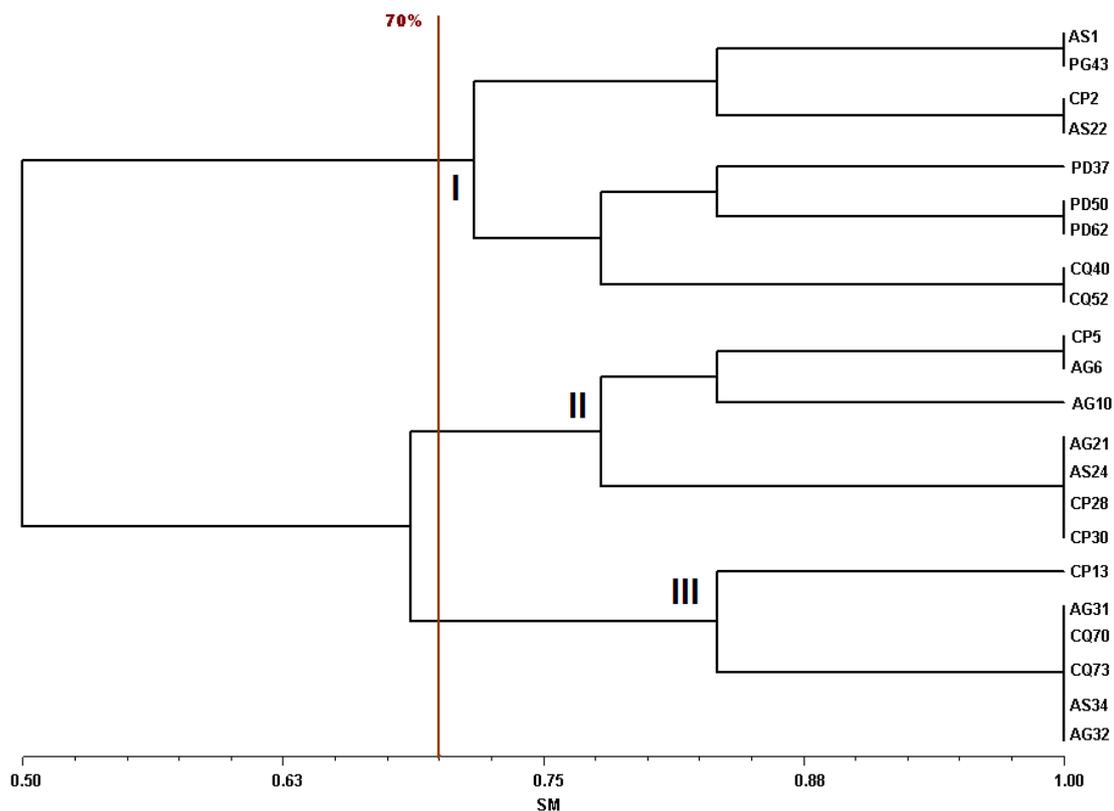
1=Tempo em dias para o aparecimento de colônias isoladas (R= rápido, 1 a 5 dias), (L= lento, 6 a 10 dias); 2= Diâmetro da colônia (mm); 3= Cor da colônia; 4= Forma da colônia; 5= Produção de goma; 6= Densidade; 7= Consistência; 8= Coalescência das colônias; 9= Elevação da colônia.

**Tabela 4.** Caracterização dos isolados quanto à resistência a fatores abióticos

GRUPOS	SISTEMA DE USO DA TERRA	pH			NaCl (%)			TEMPERATURA	N° DE ISOLADOS
		4	12	1	2	3	45°		
1	Corte e queima								
	Pastagem								
	Plantio direto	±	+	+	±	-	±	9	
	Aléias 6								
	Capoeira								
2	Cult. aração e grade								
	Aléias 6	-	±	-	-	-	±	7	
	Capoeira								
3	Cult. aração e grade								
	Corte e queima								
	Aléias 6	+	+	±	-	-	-	6	
	Capoeira								

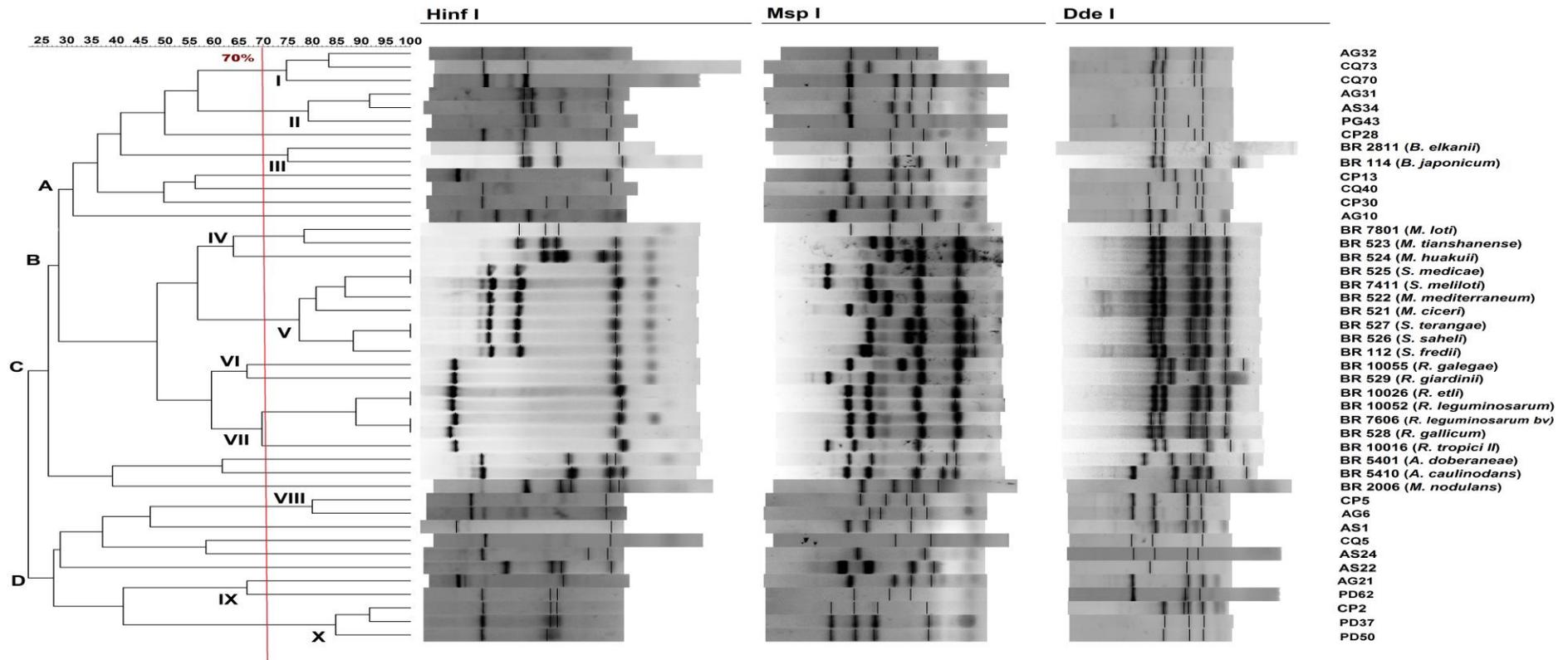


**Figura 1.** Dendrograma de similaridade entre BFNNL isoladas de nódulos de feijão-caupi com base nas características de morfologia de colônias em meio YMA. \* AG- área com aração e gradagem; CQ- corte e queima; PG- pastagem; PD- plantio direto; AS- aléias 6 anos; CP- capoeira.

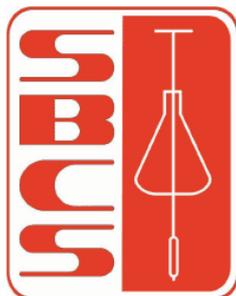


**Figura 2.** Dendrograma de similaridade entre BFNNL isoladas de nódulos de feijão-caupi com base nos perfis de tolerância a fatores abióticos de BFNNL isolados de nódulos de caupi capturados de diferentes sistemas de uso da terra na região pré amazônica. . \* AG- área com aração e gradagem; CQ- corte e queima; PG- pastagem; PD- plantio direto; AS- aléias 6 anos; CP- capoeira.

Hinf I + Msp I + Dde I  
ENZIMAS



**Figura 3.** Dendrograma de similaridade entre BFNNL isoladas de nódulos de caupí com base no perfil de restrição do 16S rRNA com as endonucleases Hinf I, Msp I e Dde



## INSTRUÇÕES AOS AUTORES

### **Escopo e política**

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 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 co-responsáveis pelo conteúdo científico do trabalho.**

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

### **Forma e preparação de manuscritos**

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 superiores e inferiores e 2,0 cm nas margens direitas e esquerdas, 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 iniciadas 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)], deverá ser inserido 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. Serão seguidos 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 preparadas 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 iniciais e finais, 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.

### **Envio de manuscritos**

Os trabalhos submetidos à publicação **somente poderão ser enviados por correio eletrônico, acessando o site [www.sbcs.org.br](http://www.sbcs.org.br) (E-mail: [autores@sbcs.org.br](mailto:autores@sbcs.org.br)), e não mais em papel.**