UFRRJ
INSTITUTO DE FLORESTAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E FLORESTAIS

TESE

Diversidade de rizóbios na estruturação de comunidade de plantas nativas da Floresta Atlântica

Michele Aparecida Pereira da Silva

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIROINSTITUTO DE CIÊNCIAS AMBIENTAIS E FLORESTAIS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E FLORESTAIS

Diversidade de rizóbios na estruturação de comunidade de plantas nativas da Floresta Atlântica

MICHELE APARECIDA PEREIRA DA SILVA

Sob a Orientação
Dr. Sérgio Miana de Faria

e Co-orientação
Dr. Ederson da Conceição Jesus
Dr. Guilherme Montandon Chaer

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências,** no Curso de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais, Área de Concentração em Conservação da Natureza

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2014

Silva, Michele Aparecida Pereira, -
Diversidade de rizóbios na estruturação de comunidade de plantas em solos de Floresta Atlântica / Michele Aparecida Pereira da Silva. – 2014.
XXf. : il.

Orientador: Sérgio Miana de Faria.
Tese (doutorado)- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais.
Bibliografia: p. XX-XX.

1. Bactérias fixadoras de nitrogênio – Teses. 2. Nitrogênio – Teses. 3. Plantas – Biologia molecular - Teses I. de Faria, Sérgio Miana, XXXX- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Tese, desde que seja citada a fonte.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE FLORESTAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E FLORESTAIS

MICHELE APARECIDA PEREIRA DA SILVA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais, área de Concentração em Conservação da Natureza.

TESE APROVADA EM 27/02/2014.

_____
Sérgio Miana de Faria Ph.D. – Embrapa Agrobiologia
(Orientador)

_____
Luiz Fernando Duarte de Moraes Dr. – Embrapa Agrobiologia

_____
Juliana Muller Freire. Drª. – Embrapa Agrobiologia

_____
Orivaldo Saggin Júnior Dr. – Embrapa Agrobiologia

_____
Sílvia Regina Goi. Drª – UFRRJ

Para crescer, apenas observe uma árvore.

À medida que a árvore cresce, suas raízes se aprofundam.

Existe um equilíbrio: quanto mais alto a árvore cresce, mas profundamente suas raízes crescerão.

Você não pode ter uma árvore de 50 metros de altura com raízes pequenas; elas não poderiam sustentar uma árvore tão imensa.

Na vida, crescer significa aprofundar-se dentro de si mesmo- é aí que suas raízes se encontram.

Osho

Aos meus pais ***Trindade de Fátima Silva e Enio Pereira da Silva***
por serem a fortaleza quando mais precisei.

OFEREÇO

Aos meus Irmãos, ***Elaine e Everton*** *e ao meu filho* ***Miguel****, pelo amor incondicional.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus que tantas vezes me ouviu em momentos que pareciam intermináveis na ausência de pessoas essenciais.

À minha família, a base de tudo que sou.... o laço eterno que me completa como Michele e me faz perceber que a vida faz sentido.

Ao meu pequeno princípe Miguel, meu filho. O que eu era antes de tê-lo comigo não me possibilitava enxergar a mulher forte que sou hoje.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Florestais pela oportunidade de realização do curso assim como seu corpo docente e discente que fizeram parte desta trajetória.

Ao pesquisador Sérgio Miana de Faria, pela valiosa oportunidade que me proporcionou quando ingressei no doutorado aqui em Seropédica em 2010. Estendo este agradecimento aos meus co-orientadores Ederson da Conceição Jesus que além de contribuir cientificamente para o enriquecimento do trabalho se tornou também um grande amigo, a Guilherme Montandon Chaer pelas observações holísticas no trabalho e apoio indispensável na realização das atividades.

Aos pesquisadores Jerri Edson Zilli, Silvia Regina Goi e Ederson da Conceição Jesus por terem aceito o convite para o exame de qualificação e terem contribuído positivamente para a evolução do trabalho. Estendo estes agradecimentos também aos membros da banca, Fatima Maria de Souza Moreira, Sílvia Regina Goi, Luiz Fernando Duarte de Moraes, Orivaldo Jose Saggin Junior, Eliane Maria Ribeiro da Silva e Juliana Muller Freire.

Um agradecimento mais que especial a Rafael de Almeida Leite que eu diria que foi um anjo do céu que estagiou aqui em terras embrapianas. A você o meu carinho, reconhecimento por tudo que fez na minha ausência.

A Edilberto (Beto), pela valiosa atenção na disponibilidade de sementes para a execução dos trabalhos, além da transmissão do seu conhecimento prático na execução dos experimentos.

A Péricles Galisa (in memorian) e Jakson que me receberam no alojamento da Embrapa Agrobiologia há 4 anos atrás. Obrigada por tudo!

A Janaína, que na minha ausência em função do doutorado (último ano) foi a amiga e companheira do meu filho Miguel! A você obrigada por tudo!

À Embrapa Agrobiologia que me recebeu de braços abertos e que me proporcionou na sua infra-estrutura um ambiente tranqüilo para o desenvolvimento do trabalho. Orgulho de ter sido embrapiana.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto que foi desenvolvido no meu doutorado.

Aos técnicos, bolsistas, pesquisadores do Laboratório de Leguminosas Florestais que fizeram parte desta jornada de 4 anos. Em especial a Telmo Félix (in memorian) que com certeza eu gostaria que estivesse aqui entre nós.

A todos amigos que conquistei na UFRRJ, na Embrapa Agrobiologia e em Seropédica.
.

A todos muito obrigada!

BIOGRAFIA

MICHELE APARECIDA PEREIRA DA SILVA, filha de Trindade de Fátima Silva e Enio Pereira da Silva, nasceu em Bom Sucesso, Minas Gerais no dia 25 de julho de 1984. De De 1996 a 2002 cursou o ensino fundamental e médio na Escola Estadual Benjamin Guimarães nesta mesma cidade. De 2003 a 2009 graduou-se em Engenharia Florestal e se tornou mestre em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Lavras. Neste período foi bolsita de iniciação científica e em seguida de mestrado no Laboratório de Microbiologia do Solo-UFLA, orientada pela Dra. Fatima Maria de Souza Moreira. De 2010-2014 cursou o Doutorado em Ciências Ambientais e Florestais na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Durante a iniciação científica, mestrado e doutorado foi bolsita da FAPEMIG, CNPq e CAPES, respectivamente.

RESUMO

SILVA, Michele Aparecida Pereira da. **Diversidade de rizóbios na estruturação de comunidade de plantas nativas da Floresta Atlântica.** 2014. 113p. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais e Florestais, Conservação da Natureza). Instituto de Florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Este estudo objetivou isolar e caracterizar fenotípica e genotipicamente bactérias isoladas de nódulos de *Pseudopiptadenia contorta, Albizia pedicellaris* e *Piptadenia gonoacantha e* avaliar como a diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio influencia a produtividade de 6 espécies arbóreas nativas da Floresta Atlântica em condições de microcosmos. Foram conduzidos dois experimentos em casa de vegetação na Embrapa Agrobiologia. O primeiro foi realizado em bandejas contendo 45 kg de substrato simulando uma comunidade juvenil com 3 espécies de leguminosas e 3 de não leguminosas em crescimento conjunto. O segundo foi realizado com as mesmas espécies, porém as plantas foram individualizadas em vasos de 1,5 kg de substrato. Em ambos os experimentos foi utilizado o delineamento de blocos inteiramente casualisados com 6 repetições e constituídos dos seguintes tratamentos: controle não inoculado, controle nitrogenado e 2 níveis de riqueza de espécies de rizóbio (1 ou 3 estirpes recomendadas para cada leguminosa). As estirpes de rizóbio inoculadas incluíram bactérias recomendadas para *Albizia pedicellaris, Piptadenia gonoacantha* e que nodulam *Pseudopiptadenia contorta*. O substrato utilizado foi uma mistura autoclavada na proporção 1:1:1 (v:v:v) de areia, vermiculita e horizonte B de um Argissolo textura arenosa. A altura das plantas foi avaliada aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias após o transplantio. O material vegetal foi seco em estufa de circulação de ar forçada a 65ºC, até peso constante, determinando-se a matéria da parte aérea seca. Este material foi moído e analisado para o teor de nitrogênio foliar. Além disso, foi realizada a avaliação da ocupação nodular, amostrando alguns nódulos de cada leguminosa e tratamento. A caracterização morfofisiológica demonstrou uma considerável diversidade entre os isolados. A amplificação por PCR usando o iniciador *BOX-A1R* para a amplificação de regiões flanqueadas por sequências repetitivas de DNA (BOX-PCR) foi obtida com sucesso sendo verificada uma alta diversidade genotípica entre os isolados. Sete grupos principais foram formados. As análises de sequências moleculares do gene 16S DNAr revelou uma diversidade de espécies de rizóbio onde foram encontrados 4 gêneros diferentes nodulando as três espécies florestais: *Burkholderia, Bradyhrhizobium, Rhizobium* e *Mesorhizobium*. Um grupo de isolados se destacou dos demais ressaltando uma grande potencialidade para ser identificado como uma nova espécie nodulando leguminosas florestais. A ocupação nodular pelas bactérias inoculadas nas leguminosas florestais *Albizia pedicellaris* e *Piptadenia gonoacantha* foi diferente em condição de microcosmo quando comparadas às plantas individualizadas. Tanto em crescimento conjunto ou individualizado a leguminosa *Pseudopiptadenia contorta* não apresentou nodulação. Os níveis de diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio para algumas espécies de leguminosas causou um efeito positivo na altura média, acúmulo de massa de raiz e teor de nitrogênio foliar. Este efeito não foi observado para a variável matéria seca da parte aérea.

Palavras-chave: nitrogênio, produtividade, fixação biológica de nitrogênio

ABSTRACT

SILVA, Michele Aparecida Pereira da. **Diversity of rhizobia in structuring plant community of native Atlantic Forest.** 2014. 113p. Thesis (PhD in Environmental Science and Forestry, Nature Conservation). Forest Institute, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2014.

This study aimed to evaluate the influence of the diversity of nitrogen-fixing bacteria on the productivity of 6 tree species native to the Atlantic Forest in microcosm conditions. Two experiments were conducted in a glasshouse at Embrapa Agrobiologia. The first experiment simulated a community with 3 legume and 3 non-legume species and it was carried out in trays containing 45 kg of substrate (soil:sand:vermiculite v:v:v). These species were tested individually in 1.5 kg pots in the second experiment. Both experiments followed a randomized block design, with 6 replicates. The following treatments were tested: inoculation of plants with two levels of rhizobial richness (3 and 9 strains), and two controls, one receiving mineral fertilization and another that received neither inoculation or fertilization. The rhizobia inoculated are recommended for the legume species used in the experiments, that is, *Albizia pedicellaris, Piptadenia gonoacantha*, and *Pseudopiptadenia contorta*. Plant height was measured at 30, 60, 90, 120, 150 and 180 days after transplanting. Plants were collected after 180 days and dried at 65 ° C until constant weight and the masses of dry shoot and root, as well as shoot total N, were measured. Further, nodule occupancy was evaluated. The levels of diversity of nitrogen fixing bacteria for some species of legumes had a positive effect on average height , accumulation of root mass and leaf N content . This effect was not observed for the variable dry matter of shoots. Additionally, we isolated and characterized, phenotypic and genotypically, bacteria isolated from nodules *Pseudopiptadenia contorta* , *Albizia pedicellaris* and *Piptadenia gonoacantha*. The Morphophysiological characterization demonstrated considerable diversity among the isolates. PCR amplification using the primer BOX- A1R revealed a high genotypic diversity among isolates. Seven major groups were formed. The molecular analysis of 16S rRNA gene sequences revealed that these bacteria belong to the genera *Burkholderia*, *Bradyhrhizobium*, *Rhizobium* and *Mesorhizobium*. A group of isolates did not cluster closely to species already described, thus presenting a potential for the description of new species. Nodule occupancy by the inoculated bacteria in forest legume *Albizia pedicellaris* and *Piptadenia gonoacantha* in the microcosm differed from that in individual pots.

Keywords: nitrogen, productivity, biological nitrogen fixation

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Origem e identificação dos isolados bacterianos recomendados e/ou isolados de nódulos de *Albizia pedicellaris, Piptadenia gonoacantha, Pseudopiptadenia contorta, Anadenanthera peregrina e Piptadenia stipulacea.* 18

Tabela 2. Iniciador utilizado utilizado nas reações de amplificação do gene *BOX-PCR* com a respectiva sequência de nucleotídeo e referência. 20

Tabela 3. Iniciadores utilizados nas reações de amplificação do gene *16S DNAr* com as respectivas sequências de nucleotídeos e referência. 21

Tabela 4. Iniciadores utilizados nas reações de amplificação do gene *nodC* com as respectivas sequências de nucleotídeos e referência. 21

Tabela 5. Bactérias escolhidas para compor os níveis de diversidade dos tratamentos do experimento de comunidade e individual de plantas com suas respectivas características morfofisiológicas. 22

Tabela 6. Tratamentos utilizados no experimento de diversidade de rizóbios e plantas da Floresta Atlântica. 24

Tabela 7. Análise química da mistura de areia, vermiculita e argissolo na proporção 1:1:1 (v/v/v). 24

Tabela 8. Médias da altura, matéria da parte aérea seca (MSPA) e MSR (matéria de raiz seca considerando as espécies *A. pedicellaris, P.contorta, P.gonoacantha, C. glandulosa, H. chrysotrichus, C. vernalis* no experimento de comunidade de plantas, após 180 dias, em casa de vegetação, Seropédica, RJ. (continua) 45

Tabela 9. Número e peso seco de nódulos para as espécies *P.gonoacantha* e *B. pedicellaris* para o experimento de comunidade de plantas nos tratamentos Nmin e Nmax. 46

Tabela 10. Médias da altura média, matéria da parte aérea seca (MSPA), MSR (matéria de raiz seca) para o experimento individual nos diferentes tratamentos considerando as espécies *A. pedicellaris, P.contorta, P.gonoacantha, C. glandulosa, H. chrysotrichus, C. vernalis*, numero e peso seco de nodulos (NN e PSN) para as espécies *P.gonoacantha* e *B. pedicellaris.* 46

Tabela 11. Teor de nitrogênio foliar para as espécies *A. pedicellaris, C. vernalis, C. glandulosa, P. contorta, P. gonoacantha, H. crysotrichus* no experimento comunidade. 48

Tabela 12. Teor de nitrogênio foliar para as espécies *A. pedicellaris, C. vernalis, C. glandulosa, P. contorta, P. gonoacantha, H. crysotrichus* no experimento de individual de plantas. 49

Tabela 13. Percentagem de ocupação nodular pelas estirpes inoculadas no experimento de comunidade de plantas para as espécies *A. pedicellaris, P. gonoacantha.* 50

Tabela 14. Percentagem de ocupação nodular pelas estirpes inoculadas no experimento individual de plantas para as espécies *B. pedicellaris, P. gonoacantha.*.....50

Tabela 15. Percentagem de ocupação nodular pelas estirpes inoculadas no experimento individual de plantas para as espécies *A. pedicellaris, P. gonoacantha.*.....53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das etapas de extração do DNA genômico utilizando o kit PROMEGA (Wizard Genomic, DNA Purification kit) fornecido pelo fabricante. 19

Figura 2. Desmontagem do experimento em junho de 2013.....25

Figura 3. Evolução do experimento de diversidade de rizóbios e plantas da Floresta Atlântica ao longo de 6 meses.....26

Figura 4. A e B nódulos nas raízes e C Bactérias isoladas de *Piptadenia gonoacantha*.....28

Figura 5. Distribuição das estirpes provenientes das leguminosas: *Pseudopiptadenia contorta, Piptadenia gonoacantha* e *Albizia pedicellaris* quanto às principais características morfofisiológicas avaliadas (alteração de pH, produção de muco, consistência da massa, absorção de indicador e forma da colônia).....29

Figura 6. Dendrograma de similaridade construído com o índice Jaccard e algoritimo UPGMA pelo programa R (R Core Team, 2013) das estirpes representativas dos perfis morfofisiológicos, evidenciando a diversidade dos grupos formados.....30

Figura 7. Diversidade morfofisiológica de estirpes de *Albizia pedicellaris, Piptadenia gonoacantha,* e *Pseudopiptadenia contorta*, respectivamente. 31

Figura 8. Fotografias capturadas em microscópio ótico de contraste de fase com objetiva de 100x, com óleo de imersão da reação de gram para as bactérias recomendadas para *Albizia pedicellaris.* 31

Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando os perfis obtidos pela técnica BOX-PCR para as 37 estirpes recomendadas para *Pseudopiptadenia contorta*, *Piptadenia gonoacantha* e *Albizia pedicellaris.*PM: Marcador de Peso Molecular 1Kb DNA ladder-Invitrogen. Neg: controle negativo.....32

Figura 10. Dendrograma de similaridade genética construído com o índice Dice e método de agrupamento UPGMA, mostrando os agrupamentos formados entre os isolados de *Albizia pedicellaris, Piptadenia gonoacantha* e *Pseudopiptadenia contorta* analisados pela técnica de BOX-PCR. 33

Figura 11.Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando a amplificação do gene 16S DNAr PCR para as 14 estirpes (demonstração da amplificação para um número parcial de amostras) .PM: Marcador de Peso Molecular 1Kb DNA ladder- Invitrogen. Neg: controle negativo. 34

Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando a amplificação do gene *nodC* para 17 estirpes (demonstração da amplificação para um número parcial de amostras). PM: Marcador de Peso Molecular 1Kb DNA ladder- Invitrogen. Neg: controle negativo.....35

Figura 13. Árvore filogenética baseada nas sequências quase completas do gene 16S DNAr das estirpes. A raiz usada para a árvore foi de *Bacillus subtilis*. A porcentagem suporte do *bootstrap* foi de 2000 replicações. O símbolo circular vermelho na árvore filogenética

indica a amplificação positiva por PCR do fragmento (de aproximadamente 620 pb) correspondente ao gene *nodC* usando os dois primers *NodC540* e *nodC1160*. 36

Figura 14. Crescimento das plantas em comunidade após 60 dias de instalação nos tratamentos Nmáx, TN, TSN e Nmín. 38

Figura 15. Altura (cm) média para todas as espécies nos diferentes tratamentos (Nmáx, Nmín, TN e TSN) observada após xxx de implantação do experimento de comunidade de plantas, em casa de vegetação, Seropédica (RJ). Inserir legenda (Nmáx, Nmín, TN e TSN). 38

Figura 16. Altura média (cm) das diferentes espécies após xxx dias de observação no experimento de comunidade de plantas realizado em casa de Vegetação, Seropédica (RJ). 38

Figura 17. Altura média (cm) das espécies *B. pedicellaris, P.gonoacantha, P. contorta, C. glandulosa, H. chrysotrichus, C. vernalis* e total (considerando todas as espécies) nos diferentes tratamentos após 180 dias de implantação do experimento de comunidade de plantas em casa de vegetação, Seropédica, RJ. 39

Figura 18. Altura das espécies *B. pedicellaris, P.gonoacantha, P. contorta, C. glandulosa, H. chrysotrichus, C. vernalis* nos diferentes tratamentos no experimento individualizado após 180 dias de observação, em casa de vegetação em Seropédica, RJ. 40

Figura 19. Acúmulo de massa da parte aérea seca para os tratamentos Nmáx, Nmín, TN e TSN para a comunidade de plantas. 42

Figura 20. Acúmulo de massa seca da parte aérea para as espécies *A.pedicellaris, P.contorta, P. gonoacantha, C. glandulosa, H. chrysotrichus, C. vernalis.* 42

Figura 21. Acúmulo de massa seca da parte aérea para a espécie *Albizia pedicellaris.* 42

Figura 22. (A) Planta de *H. chrysotrichus* e (B) Raiz de *H. chrysotrichus.*.....43

Figura 23. Acúmulo de matéria seca de raiz nos tratamentos Nmáx, Nmín, TN e TSN no experimento de comunidade de plantas.....44

Figura 24. Acúmulo de matéria seca de raiz nas espécies *A. pedicellaris, P.contorta, P.gonoacantha, C. glandulosa, H. chrysotrichus, C. vernalis* no experimento de comunidade de plantas.....44

Figura 25. Acúmulo de massa seca de raiz para a espécie *Pseudopiptadenia contorta* nos tratamentos Nmin, Nmáx, TN e TSN. 44

Figura 26. Número de nódulos da espécie *Piptadenia gonoacantha* nos tratamentos Nmín e Nmáx. 45

Figura 27. Dendrograma de similaridade genética construído com programa Bionumerics utilizando o método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean) baseado no índice de similaridade de Jaccard , mostrando os agrupamentos formados

entre os isolados de *Albizia pedicellaris, Piptadenia gonoacantha* na comunidade de plantas analisados pela técnica de BOX-PCR e as estirpes inoculadas.....52

Figura 28. Dendrograma de similaridade genética construído com programa Bionumerics utilizando o método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean) baseado no índice de similaridade de Jaccard , mostrando os agrupamentos formados entre os isolados de *Albizia pedicellaris, Piptadenia gonoacantha* no experimento individual analisados pela técnica de BOX-PCR. 54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 2
2.1-Floresta Atlântica 2
2.2 Família Leguminosae: interações com microrganismos 2
2.3 Interferência de simbiontes na estrutura de comunidade de plantas 3
2.4 Compreensão da relação biodiversidade-funcionamento dos ecossistemas 6
2.5 Co-existência /co-dependência entre a diversidade de micro-organismos e plantas e sua influência nos processos ecossistêmicos 7
2.5 Estudos de diversidade de micro-organismos 10
2.6 Taxonomia de rizóbios 10
2.6.1 Métodos de tipagem 13
2.7 Métodos para avaliação da ocupação nodular 15
3 MATERIAL E MÉTODOS 16
3.1 Origem e caracterização morfológica e molecular dos isolados 16
3.1.1 Reação de Gram 19
3.1.2 Extração do DNA Genômico 19
3.1.4 Avaliação da diversidade de isolados 19
3.1.5 Sequenciamento, análise de similaridade e filogenia 21
3.2 Experimento de diversidade de rizóbios e diversidade de plantas da Floresta Atlântica 22
3.2.1 Área de estudo 22
3.2.2 Estirpes inoculadas 22
3.2.4 Espécies de plantas da Floresta Atlântica 23
3.2.5 Tratamento das sementes 23
3.2.6 Delineamento experimental 23
3.2.5- Cultivo das estirpes inoculadas 24
3.2.6 Implantação do experimento 24
3.3 Determinações 25
A) Produtividade, avaliação do nitrogênio foliar e fertilidade do solo 25
B) Isolamento e caracterização cultural e avaliação da ocupação nodular utilizando a técnica *BOX-PCR* 27
3.4.8 Análises estatísticas 28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 28
4.1 Caracterização morfofisiológica e molecular das estirpes 28

4.1.1 Reação de Gram 31
4.1.2 Extração do DNA Genômico 31
4.1.3 Avaliação da diversidade dos isolados 31
4.1.4 Sequenciamento, análise de similaridade e filogenia 35
4.3 Experimento de diversidade de rizóbios e diversidade de plantas da Floresta Atlântica 37
4.3.1- Avaliação da altura, matéria seca da parte aérea e raiz 37
4.3.4 Avaliação do nitrogênio foliar 47
4.3.4- Avaliação da ocupação nodular 49
5 CONCLUSÕES 55
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 56
ANEXOS 68

1 INTRODUÇÃO

A Floresta Atlântica se apresenta como um dos *"hotspots"* de diversidade mais ameaçados do mundo e com uma alta riqueza de espécies mesmo com as severa degradação que o ecossistema sofreu ao longo dos anos (Mittermeier, 1999). É um centro de biodiversidade reconhecida no mundo abrigando cerca de 2500 espécies vegetais, onde muitas delas são pertencentes à família Leguminosae (JBRJ, 2013).

A família Leguminosae é uma das mais ricas em espécies, compreendendo árvores, arbustos, ervas e lianas e apresenta importante papel nos ecossistemas naturais já que muitas de suas espécies são capazes de se associarem à bactérias, comumente chamadas de rizóbios e formarem estruturas hipertróficas nas raízes e em alguns casos no caule, fixando o nitrogênio atmosférico (Faria et al., 1999).

Neste bioma, há ampla distribuição geográfica das leguminosas, representadas por diversas espécies (Mayers et al., 2000) e o levantamento de bactérias fixadoras de nitrogênio que formam simbiose com leguminosas é tarefa indispensável, principalmente no que diz respeito à diversidade, já que esta desempenha papel na entrada de nitrogênio no sistema. Para este levantamento a utilização das metodologias moleculares tem levado a uma grande mudança na perspectiva da diversidade microbiana, porém, não dispensa o uso dos dados fenotípicos e assim tem se adotado uma taxonomia polifásica (integração de dados fenotípicos e genotípicos) para a identificação de novos micro-organismos (Rademarker et al., 2005).

Já está claro o número de espécies da fauna e plantas vasculares, porém existem dúvidas acerca da diversidade de espécies dos micro-organismos no bioma,. O solo, sendo o habitat natural da diversidade microbiana, com todo seu caráter heterogêneo, complexo e dinâmico, apresenta-se como um ecossistema que trata de um mosaico vital repleto de interações que admitem condições propícias para uma alta biodiversidade. As interações entre plantas e micro-organismos são parte integral dos ecossistemas (Zak et al., 2003) e a redução de biodiversidade dos microssimbiontes observada em áreas da Floresta Atlântica pode levar a um decréscimo na biodiversidade de plantas e na produtividade dos ecossistemas. Dada a importância destes micro-organismos simbiontes é interessante o estudo da sua diversidade como determinante tanto da diversidade vegetal e da produtividade de ecossistemas naturais (van der Heijden et al., 2006)

É necessário avaliar a atividade destes organismos no ecossistema, uma vez que o nitrogênio fixado por estes simbiontes favorece toda a comunidade de plantas do local onde as leguminosas estão alocadas (van der Heijden et al., 2006). Conhecer a diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosas e como a mesma afeta a estrutura da comunidade de plantas é oportuno visto que poucos trabalhos até o momento foram realizados com este enfoque (Van der heijden, 1998; 2006a; 2006b; Bever et al., 2013).

Os benefícios científicos esperados de um maior conhecimento sobre a diversidade microbiana são extensos (Hunter-Cevera, 1998). Entre eles, destacam-se a melhor compreensão das funções exercidas pelas comunidades microbianas nos ambientes e o conhecimento das suas interações com outros componentes da biodiversidade.

Estudos que visem identificar a ocorrência, a diversidade e a eficiência de bactérias que nodulam leguminosas fornecem informações sobre a ecologia desses micro-organismos no solo.

O objetivo do trabalho foi isolar e caracterizar fenotípica e genotipicamente bactérias isoladas de nódulos de *Pseudopiptadenia contorta, Albizia pedicellaris* e *Piptadenia gonoacantha.* Assim como avaliar a relação entre a riqueza de espécies de bactérias fixadoras

de nitrogênio e o comportamento de espécies leguminosas e não leguminosas nativas da Floresta Atlântica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1-Floresta Atlântica

As florestas tropicais são ecossistemas que abrigam alta biodiversidade, englobando cerca de dois terços do total de espécies existentes no planeta (MAB – UNESCO, 2001). Dentre as florestas tropicais, a Floresta Atlântica é uma das mais ameaçadas de extinção. A Floresta Atlântica ocorre no litoral desde a região Nordeste chegando até a Argentina, avançando para o interior em extensões variadas e é composta de uma série de unidades fitogeográficas, constituindo um mosaico vegetal de grande diversidade.

A Floresta Atlântica é considerada um dos 25 centros de biodiversidade ("*hotspot"*) já tendo perdido 70% de sua cobertura original, (Myers, 1988). Na sua área original ocupava mais de 1 360 000 km^2, mas hoje está restrita a 7,9% desta área (Morellato & Haddad, 2000). Um exemplo é o estado do Rio de Janeiro que entre 1985 e 1990 perdeu 30.579 ha e, entre 1990 e 1995, mais 140.372 ha, ou seja, 170.951 ha em dez anos (SOS Mata Atlântica, 2013). Toda esta ameaça é reflexo da ocupação e exploração ilegal dos seus recursos (MMA, 2002). A eliminação de grandes trechos de floresta gera mudanças no microclima, dentre outras características, afetando as comunidades animais e vegetais e suas relações ecológicas. Segundo Mori et al. (1981), o desmatamento da Mata Atlântica é particularmente sério porque pode levar à extinção um número incalculável de espécies e populações, em função do seu nível de endemismo elevado. Muito embora uma quantidade apreciável de informações sobre a diversidade vegetal esteja disponível, pouco se sabe sobre a diversidade de micro-organismos existentes no solo e menos ainda sobre seus papéis funcionais nesse bioma.

Apesar de toda devastação, o bioma abriga uma riqueza considerável de fauna, flora e microbiota existentes nos ecossistemas terrestres. Em números, atentando-se para a flora, existem cerca de 20 mil espécies de plantas vasculares, onde 8000 delas só ocorrem na Floresta Atlântica (SOS Mata Atlantica, 2013).

Diante do conhecimento da diversidade de leguminosas da Floresta Atlântica, ficam lacunas quanto ao estudo da diversidade de micro-organismos associados a esta família e até mesmo estudos de nodulação nas mesmas. Sendo assim, grandes estudos poderão ainda ser feitos a fim de se obter registro da ocorrência e diversidade destes micro-organismos neste ecossistema e como estes afetam toda a estrutura da comunidade de planta que ali se desenvolve.

2.2 Família Leguminosae: interações com microrganismos

A família Leguminosae possui cerca de 727 gêneros e 19.325 espécies sendo reconhecida pela maioria dos especialistas como uma única família estando subdividida em três subfamílias: Caesalpinoideae, Mimosoideae e Papilionoideae (Lewis et al, 2005). É uma das mais ricas em espécies, compreendendo árvores, arbustos, ervas e lianas, das quais, muitas possuem capacidade de se associar a bactérias diazotróficas (comumente chamadas de "rizóbios") e fixar o nitrogênio do ar (N_2) formando estruturas hipertróficas nas raízes e em alguns casos no caule (Faria et al., 1999).

A fixação biológica de nitrogênio é um processo essencial para a vida na terra. O nitrogênio faz parte de componentes essenciais à nutrição animal como as proteínas,

aminoácidos e vitaminas. Estes são sintetizados pelas plantas a partir de carboidratos produzidos pela fotossíntese e de íons como NH_4^+ e NO_3^- absorvidos do solo. As principais fontes desses íons no solo são: a fixação biológica de nitrogênio (175 X 10^6 ton N ano^{-1}), a fixação industrial (49 X 10^6 ton N ano^{-1}) e a fixação atmosférica (10 X 10^6 ton N ano^{-1}). Apenas algumas espécies de bactérias possuem a enzima nitrogenase capaz de transformar N_2 em NH_3, podendo viver livremente no solo ou em simbiose e associações com algumas espécies vegetais e até animais (Moreira & Siqueira, 2006).

Até 2001 eram conhecidos apenas 6 gêneros de α-Proteobacteria (*Rhizobium, Azorhizobium, Bradyrhizobium, Sinorhizobium, Mesorhizobium, Alorhizobium)* denominadas coletivamente de "rizóbios", capazes de nodular leguminosas (e *Parasponia* spp.). Em 2010, genes simbiônticos foram revelados em *Pseudomonas*, indicando que estas bactérias endofíticas de nódulos podem evoluir para bactérias simbióticas por meio da transferência horizontal de genes (Shiraishi et al., 2010). Entretanto, os gêneros *Burkholderia* e *Cupriavidus* foram descobertos como simbiontes pertencentes a subclasse β-proteobacteria, sendo os demais α-proteobacteria (Moulin et al., 2001; Chen et al., 2001).

Assim, apesar de uma pesquisa intensiva por novos gêneros e espécies nodulíferas ter sido realizada nos últimos anos, especialmente no Brasil (Moreira et al., 2000; Moreira et al 2004., Moreira et al., 2006), ainda existe a possibilidade de que novas simbioses possam ser descobertas em ecossistemas naturais (florestas tropicais). A capacidade de nodular já foi estudada para 23% das espécies da família Leguminosae, e destas 88% revelaram a capacidade de nodulação (Faria et al., 1999).

A existência de um grande número de espécies de leguminosas e o fato de que nem todas foram analisadas quanto à diversidade dos microssimbiontes associados, leva a crer que a diversidade de grupos de micro-organismos seja bastante superior ao identificado até o presente momento.

Os levantamentos floristicos vêm revelando a abundância da família Leguminosae em florestais tropicais, estando esta família entre as cinco mais diversas do bioma Mata Atlântica (Morim & Barroso 2007). Estudos na região sudeste também demonstraram elevada diversidade (Ribeiro & Lima, 2009). Fica clara, portanto, a importância e a diversidade das leguminosas neste ecossistema.

2.3 Interferência de simbiontes na estrutura de comunidade de plantas

De maneira suscinta, uma comunidade pode ser definida como sendo uma organização de seres vivos que possui populações compostas por organismos de váias espécies (Begon et al., 1996). Nestas populações, a biota do solo é um fator importante a ser considerado, já que possui potencialidade para influenciar a diversidade, a estrutura e a produtividade de comunidades vegetais (Wardle et al., 2004). Segundo estes autores, isso se tornou mais evidente pelo atual reconhecimento da interligação entre os ecossistemas acima e abaixo da superfície do solo. São fortes os indícios de que o ambiente edáfico tenha grande influência sobre os organismos acima da superfície do solo e no controle de processos nos ecossistemas, devido à ação de "feedbacks" entre os organismos, plantas e biota do solo (Klironomos, 2002). Dada a importância destes micro-organismos simbiontes; até o momento poucos trabalhos tenham sido realizados visando avaliar a diversidade destes microssimbiontes como determinantes tanto da diversidade quanto da produtividade de ecossistemas naturais (van der Heijden et al., 2006). O mesmo não ocorre para patógenos e insetos predadores (Begon et al., 1996).

O impacto do micro-organismo na produtividade da planta pode ser explicado por dois mecanismos segundo van der Heidje et al. (2008). O primeiro é a forma direta por meio de associações mutualistas na raiz e o segundo é via ação de micro-organismos de vida livre que

alteram as taxas de nutrientes. Nesta forma direta, estão os micro-organismos que se associam simbioticamente e estimulam a produtividade da planta fornecendo nutrientes limitantes para as plantas. As associações simbióticas entre plantas e bactérias fixadoras de nitrogênio que convertem o N atmosférico em N-amoniacal são as mais estudadas.

Bactérias fixadoras de nitrogênio nodulíferas em leguminosas podem influenciar a estrutura da comunidade de plantas de várias formas. Pelo suprimento de nitrogênio estimulando o crescimento e aumentando a competitividade das leguminosas nodulíferas as quais se associam, e pelo aumento da disponibilidade de nitrogênio no solo estimulando o crescimento de outras espécies de plantas, através da transferência do nitrogênio já fixado, e alterando assim a distribuição tanto das leguminosas quanto das não leguminosas. Estas bactérias podem também, em situações onde ocorre limitação de nitrogênio e pouca limitação de outros fatores, influenciar somente as leguminosas nodulíferas, com pouco ou nenhum efeito sobre as outras espécies (van der Heijden et al., 2006), caracterizando um cenário de complementaridade.

Em experimento em microcosmo, com alta proporção de espécies leguminosas, ficou demonstrado que bactérias fixadoras de nitrogênio promovem a equitabilidade e a produtividade da comunidade (van der Heijden et al., 2006),. Como as leguminosas incrementam a disponibilidade de nitrogênio no solo, possibilitando que plantas vizinhas se beneficiem do nitrogênio fixado, sugere-se que a presença de um grupo diverso de bactérias nodulíferas seja requerida para que estas plantas cresçam e coexistam.

Todas estas informações sugerem que as interações planta micro-organismos são parte integrante dos ecossistemas (Zak et al., 2003) e que a redução de biodiversidade dos microssimbiontes em áreas de floresta atlântica pode levar a um decréscimo na biodiversidade de plantas e na produtividade dos ecossistemas. Conhecer a diversidade abaixo e acima do solo é um fator crucial para entender a dinâmica de um ecossistema equilibrado.

Há várias formas dos rizóbios influenciarem a comunidade de plantas: provendo nitrogênio e estimulando o crescimento de leguminosas assim como alterando as interações competitivas. Alem disso, leguminosas podem competir com outras plantas na presença das BFNNL (Bactérias Fixadoras de Nitrogênio Nodulíferas de Leguminosas), por exemplo, reduzindo a intensidade de luz ou diminuindo a disponibilidade de nutrientes. Os rizóbios também podem facilitar o crescimento de outras espécies de plantas aumentando a disponibilidade de nitrogênio no solo, ou tranferindo-o de leguminosas para não leguminosas (Martensoon et al., 1998).

Outro importante grupo de simbiontes de plantas são os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) que fornecem nutrientes para a planta e também aumentam sua produtividade. Os fungos micorrízicos são difundidos e formam simbiose com 80% das espécies de plantas terrestres (Smith e Read, 1997). Há uma estimativa de que 70-90% das espécies de plantas estão envolvidas em simbioses micorrízicas os quais são simbiontes obrigatórios, dependentes das raízes das plantas para fornecer carbono pela fotossíntese (Sikes et al., 2010).

Diversos estudos relataram que os fungos micorrízicos aumentam a produtividade em pastagem (van der Heidje, 1998). A absorção rápida do de fósforo (P) é um mecanismo dos FMA importante para as plantas que têm alta exigência deste nutriente, ou em condições em que a produtividade da planta é fortemente determinada pela disponibilidade de P, como nos trópicos. Já a presença de ectomicorrizas é de extrema importância em florestas boreais e temperadas.

Estudos em microcosmos mostram que várias leguminosas e ervas que crescem em ambientes pobres em nutrientes requerem bactéras fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos, para crescer e coexistir com outras plantas. Os trabalhos de van der Heijde et al., 1998, 2006a) mostraram que 72% das espécies de plantas em pastagens pobres em

nutrientes não cresceram e somente 25% sobreviveram na ausência de fungos micorrízicos ou bactérias fixadoras de nitrogênio. E difícil estimar o número de plantas que dependem de micro-organismos para sobreviver, uma vez que poucos estudos foram realizados neste sentido.

Porém evidências sugerem que pelo menos 20.000 espécies de plantas requeiram simbiontes microbianos para persistirem em um ambiente natural e em especialmente, ambientes pobres. O número de plantas que são dependentes da simbiose é provavelmente muito maior do que a freqüência de espécies de plantas dependentes de micorrizas e rizóbios em estudos de microcosmos. Atualmente, há um interesse muito forte entre a relação da diversidade microbiana e o funcionamento do ecossistema, porém poucos estudos foram feitos para avaliar o efeito da diversidade microbiana de planta e sua produtividade (van der Heidje et al., 2008). Em alguns estudos realizados foi observado que a produtividade, a diversidade de plantas e a aquisição de nutrientes aumentaram proporcionalmente ao aumento da diversidade de fungos (van der Heidje et al., 1998; Maherali & Klironomos, 2007), porém em outros trabalhos não encontraram nenhuma relação (van der Heijde et al., 2006b).

Van der Heidje et al., 1998 observaram que nos microcosmos de pastagem com maior diversidade de fungos micorrízicos houve acréscimo de 105% de diversidade de plantas e acréscimo de 42% na produtividade de plantas mais altas, respectivamente comparados a microcosmos onde somente um fungo foi inoculado. Maherali & Klinoromos (2007) com seus estudos forneceram uma explicação para a observação de que a diversidade de fungos micorrízicos pode promover a produtividade da planta. Eles descobriram que existe uma complementariedade funcional entre as diferentes famílias de fungos micorrizicos: uma ordem de fungo micorrízico (a Glomeracerae) fornece proteção contra patógenos de fungos, enquanto outra (como a Gigasporacerae) absorve o fósforo rapidamente. Subsequentemente, a produtividade da planta é aumentada quando membros de ambas as famílias estão simultaneamente presentes. Porém, estudos também verificaram que o tratamento com a inoculação de uma mistura de seis espécies de fungos e o tratamento com um fungo mais eficiente foram comparáveis na produção de biomassa do microcosmo. Isto mostrou a importância da identidade do fungo quando comparada à diversidade. Ambos os estudos têm suas explicações plausíveis para mostrar o efeito da diversidade de fungos micorrízicos aonde, mas experimentos adicionais precisariam ser feitos para resolver esta questão. Um estudo realizado por Scheublin et al (2007), mostrou que não só a presença mas também a identidade de FMAs podem ter influência considerável na competição da planta. A comunidade de FMA regula as interações entre as plantas e influencia a estrutura de suas comunidades. A composição da comunidade de fungos micorrízicos altera a forma da curva de resposta entre a diversidade de espécies de plantas e a produtividade (Klinoromos et al., 2000). Logo, o efeito positivo do aumento da riqueza de espécies de fungos micorrízicos arbusculares é mais dependente da composição de espécies destes fungos na comunidade do solo que do que número total de espécies propriamente dita (Santos, 2008).

Plantas são frequentemente menos dependentes de fungos micorrízicos e bactérias fixadoras de nitrogênio quando a disponibilidade de nutrientes no solo é alta (Sprent, 2001). Isto indica que micro-organismos e diversidade microbiana apresentam melhor desempenho em ecossistemas pobres em nutrientes (van der Heidje et al., 2008). Efeitos do aumento da diversidade microbiana na produtividade da planta provavelmente depende do número de grupos funcionais que estão presentes. Aumentando o número de espécies de um grupo funcional particular (dentro da diversidade funcional), provavelmente aumentará o grau de diversidade funcional, e terá efeitos leves no funcionamento do ecossistema (van der Heidje et al., 2008). Entretanto, adicionando diferentes grupos funcionais ou espécies específicas haverá um grande impacto na produtividade da planta e nos processos ecossistêmicos. Comunidades microbianas com linhagens diversas podem ter um grande impacto nos

processos do ecossistema porque eles são funcionalmente mais diversos como foi mostrado por Maherali & Klironomos (2007).

Scheublin et al. (2004) verificaram que comunidades de FMAs podem variar entre grupos funcionais de plantas (por exemplo, leguminosas ou não), entre espécies de plantas e entre partes de um sistema de raiz (por exemplo, raízes e nódulos de raiz). Porém necessita-se de estudos adicionais para determinar se as diferenças na composição de espécies das comunidades de FMAs são funcionalmente importantes para crescimento de planta, desempenho de nódulo, ou para a composição e estrutura da comunidades de planta.

O impacto da perda de diversidade de plantas na produtividade primária foi simulado em comunidades vegetais com diferentes números de espécies de plantas em 8 locais na Europa. Os resultados diferiram em detalhes em cada local, mas houve uma redução linear da produtividade primária média com a perda de espécies. Para um dado número de espécies, comunidades com menos grupos funcionais foram menos produtivas. Neste caso, os grupos funcionais utilizados foram leguminosas, gramíneas e outras espécies herbáceas, onde foram estabelecidos grupos com uma, duas ou três espécies. Os efeitos de diversidade ocorreram juntamente com diferenças associadas à composição de espécies e localização geográfica. Complementariedade de nichos e interações positivas de espécies parecem desempenhar um importante papel nas relações diversidade-produtividade dentro dos locais além da escolha do conjunto de espécies (Hector et al., 1999).

A diversidade microbiana (medindo a diversidade funcional) pode aumentar a decomposição e o lixiviamento de nitrogênio nos microcosmos de pastagem (Bonkowski & Roy, 2005). Há diversos mecanismos pelos quais os micro-organismos podem aumentar a decomposição e consequentemente, a provisão de nutrientes para a produtividade da planta. Algumas reações bioquímicas requerem condições específicas e são incompatíveis, ou são executadas por micro-organismos especializados com propriedades fisiológicas únicas (um exemplo é o fungo que degrada a lignina).

A diversidade microbiana pode também promover a diversidade de plantas e sua produtividade, quando os micro-organismos se associam com diferentes espécies de plantas ou quando estes fornecem recursos diferentes. Por exemplo, FMA e rizóbios atuando sinergicamente e estimulando a produtividade da planta por suprimentos de diferentes nutrientes limitados para a planta (nitrogênio pelo rizóbio e fósforo pelo FMA). Muitas leguminosas se beneficiam deste principio, uma vez que formam associações simbióticas tripartites com FMAs e rizóbios, ambos se beneficiando de diferentes produtos ofertados pelos simbiontes (Pascovsky et al., 1986). Fungos micorrízicos têm sido encontrados colonizando nódulos de raízes (órgãos das plantas designados para a fixação de nitrogênio por rizóbios) de várias leguminosas, indicando diretamente as interações planta- FMA- rizóbios (Scheublin et al., 2004). FMAs são capazes de colonizar nódulos em leguminosas, mas estes não fixam N e apresentam-se como não funcionais, sendo provavelmente estes os nódulos senescentes. Portanto, interações sinérgicas em simbiose tripartite leguminosa-FMA-Rizóbio são provavelmente indiretas e mediadas via leguminosas (Scheublin & van der Heidjen, 2006).

2.4 Compreensão da relação biodiversidade-funcionamento dos ecossistemas

A relação entre biodiversidade e funcionamento dos ecossistemas é uma questão científica importante atualmente. Há uma necessidade crescente de teorias e modelos de interpretações e generalizações robustas dos resultados experimentais, assim como de formulação de novas hipóteses. Uma reavaliação fundamental do paradigma da Revolução Verde que dominou nas últimas décadas ganhou espaço, uma vez que os efeitos a longo prazo

sobre a biodiversidade e o funcionamento do ecossistema trouxeram consequências inesperadas, principalmente quando esta biodiversidade foi reduzida (Loreau, 2000).

O declínio global da biodiversidade tem gerado preocupação em relação às possíveis conseqüências sobre os serviços e funcionamento do ecossistema. As funções dos ecossistemas controlados por micro-organismos do solo, como também pela produtividade das plantas, decomposição e ciclagem de nutrientes, são de suma importância particular de modo que as interelações entre a diversidade de plantas e micro-organismos do solo devem ser melhor entendidos (Eisenhanuer et al., 2010).

Interações simbiônticas têm um papel importantíssimo nos ecossistemas. Porém, há muita evidência empírica para o impacto das bactérias simbiônticas nas comunidades de plantas. Portanto, é extremamente escasso, por causa das restrições experimentais, informações científicas sobre o que ocorre no ecossistemas. Pesquisadores recorrem a microcosmos para estudar os processos que ocorrem no campo e o papel potencial dos micro-organismos dentro dos ecossistemas naturais são requeridos experimentos controlados para poder fazer a manipulação destes micro-organismos e reduzir a probabilidade de contaminação.

Desde 1986, uma série de experimentos em microcosmos foram conduzidos na tentativa de testar os princípios que controlam a estrutura e a dinâmica de comunidades de plantas nos ecossistemas. Estes microcosmos nada mais são do que pequenos ecossistemas em recipientes, sendo importantes ferramentas para pesquisa ecossistemológica. Entretanto, sua utilização tem sido muitas vezes negligenciada em ecologia terrestre. Os microcosmos agem como uma ponte entre a teoria e o que ocorre na natureza. Eles, definitivamente, não refletem o que realmente ocorre na natureza, mas aumentam a compreensão sobre os processos naturais simplificando as complexidades do ambiente natural. É um passo para a formulação de teorias e predições a partir de uma aproximação experimental do que ocorre no ambiente natural (Fraser, 1999). Experiências em microcosmos têm um importante papel no desenvolvimento de teorias sendo importante e útil em pesquisas ecológicas. (van der heidje, 2006a). Os microcosmos incluem a facilidade de replicação e manipulação dos tratamentos e parâmetros envolvidos. Entretanto, existem limitações e desvantagens quando se usa microcosmos, principalmente pela restrição de espaço. O Conselho de Pesquisa Ambiental Natural (NERC) da Inglaterra é o pioneiro no Reino Unido em trabalhos com microcosmos sintetizando comunidades terrestres e ecossistemas. O primeiro trabalho foi com infecção micorrízica, estrutura do solo e diversidade florística realizado por Grime et al., 1987 que verificou que os fungos micorrízicos são capazes de aumentar a biomassa de plantas, sugerindo que a transferência e assimilação de nutrientes pelas micorrizas pode ser um dos fatores que reduzem a competição e permite a coexistência de plantas em solos não férteis.

2.5 Co-existência /co-dependência entre a diversidade de micro-organismos e plantas e sua influência nos processos ecossistêmicos

"Coexistência" é um termo que tem sido usado pelos ecologistas para descrever uma mistura equilibrada de espécies em uma comunidade biótica. Esta convivência é um enigma biológico, porque a tendência para a exclusão competitiva deve tender para uma monoespécie. Teorias que tentam explicar a coexistência de plantas concentram-se em dois tipos de interações entre espécies, o equilíbrio competitivo (Tilman, &, Downing, 1994) e a prevenção da interação entre as espécies (Ricklefs, 1977).

Os ecologistas têm interessado muito em fatores que controlam a estrutura das comunidades e a importância relativa das simbioses microbianas. Muitas evidências apontam que estes fatores são importantes na determinação da estrutura da comunidade vegetal e indiretamente afetam herbívoros e predadores de níveis tróficos. Estudos com fungos

micorrízicos, bactérias fixadoras de nitrogênio e bactérias endofíticas de gramíneas tem demonstrado que elas podem afetar a competição, coexistência, dinâmica de nutrientes no solo e interações planta-herbívoro (Clay, 2001).

Todos os ecossistemas terrestres consistem em componentes da superfície e da parte subterrânea que interagem para influenciar a comunidade e ecossistema em nível de processos e propriedades. Wardle et al., 2004 mostram como estes componentes estão intimamente ligados na comunidade, reforçado por um maior grau de especificidade entre as plantas e organismos do solo do que previamente foi suposto. Como tal, as comunidades acima do solo e abaixo dele são poderosas condutoras mútuas, com feedbacks positivos e negativos entre as comunidades de plantas e micro-organismos.

Os componentes acima do solo e abaixo dele, nos ecossistemas, durante muito tempo foram considerados isoladamente um do outro. Há agora um reconhecimento crescente da influência destes componentes um no outro e do papel fundamental desempenhado abaixo e acima do solo no controle dos processos ecossistêmicos e suas propriedades (Wardle et al., 2004).

A produtividade é regulada por interações abaixo do solo. Por exemplo, a acumulação de parasitas, patógenos, e herbívoros na rizosfera podem diretamente remover o carbono e nutrientes da planta causando um *feedback* negativo na planta (Bever et al., 1997). Por outro lado, simbiontes mutualistas como FMAs e bactérias fixadoras de nitrogênio podem aumentar o acesso a nutrientes limitados, com um *feedback* positivo na produtividade das plantas (Smith et al., 1997).

Para se chegar a conclusões consistentes entre diversidade de plantas, produtividade e diversidade de micro-organismos (como fungos micorrizicos e bactérias fixadoras de nitrogênio) há necessidade de se determinar como as relações bióticas interagem com agentes abióticos para conduzir a comunidade e as propriedades do ecossistema. Vários estudos indicam que interações tróficas acima do solo têm efeito indireto sobre a sua biota, afetando a quantidade e qualidade dos recursos que as plantas produzem. A curto prazo, a herbivoria foliar pode causar a liberação substancial de carbono da rizosfera, o que pode afetar positivamente a atividade microbiana, causando um *feedback* na parte aérea com disponibilidade crescente de nitrogênio para a planta (Hamilton et al., 2001).

De maneira geral, muita atenção está mais voltada aos predadores e seus efeitos na estrutura da comunidade vegetal mas em grande parte é ignorado, nesta discussão, o potencial de micro-organismos simbiontes para regular as comunidades terrestres. A simbiose foi ignorada nas interações empíricas e teóricas em relação à competição e predação. Mas vários trabalhos estão provando que simbiontes microbianos podem afetar a estrutura de comunidade de plantas (van der Heidje et al., 1998; Clay & Holah, 1999). A regulação da estrutura de comunidade de plantas por micro-organismos simbióticos merece mais atenção uma vez que eles podem influenciar a produtividade primária através da sua capacidade para produzir ou captar recursos limitantes e alterar os padrões de alimentação de herbívoros e da dinâmica da população.

As plantas formam o maior componente da biomassa em sistemas terrestres. O funcionamento e a estabilidade dos ecossistemas terrestres são determinados pela biodiversidade de plantas e composição de espécies. Os mecanismos que controlam a diversidade de plantas ainda estão sendo debatidos. A habilidade de muitas espécies de plantas coexistir e determinar a biodiversidade de plantas pode ser explicado pelas interações competitivas por recursos temporais ou espaciais, por pertubações que acabam criando novas combinações de colonização e interações entre diferentes grupos funcionais que constituem o ecossistema (Aarssen et al., 1983).

Pouca atenção tem sido dada aos efeitos de interações micro-organismos-plantas, particularmente a simbiose micorrízica na variabilidade do ecossistema, produtividade e

biodiversidade de plantas. Os estudos têm sido focados em interações entre plantas ao invés de interações com outros níveis tróficos que não respondem às perdas de espécies em um ecossistema (Miki et al , 2010). Alguns trabalhos destacam a importância da interação com os microrganismos de fungos micorrízicos, patógenos terrestres e bactérias fixadoras de nitrogênio (klinoromos et al., 2000, Maron et al., 2011; van der Heidje et al., 2006). Evidências acumuladas indicam que a relação positiva entre a diversidade de plantas e interações multitróficas precisam ser consideradas (Mulder et al. 1999; Schnitzer et al. 2011).

Certamente, o ser humano está longe da compreensão clara de todas as interações biológicas, mas os caminhos para novas investigações são ilimitados. A ecologia e o funciomento da comunidade de plantas só serão compreendidos se as relações multitróficas forem consideradas. (Miki et al., 2010). Esta informação será crucial para predizer as reais conseqüências do desmatamento na perda da biodiversidade. A diversidade abaixo do solo pode agir como uma válvula de segurança para manter a produtividade da planta sob diferentes condições ambientais com uma significativa riqueza de fungos micorrízicos arbusculares influenciando na coexistência e produtividade de plantas (Wagg et al., 2011). Um conceito que tem sido aplicado nas interações abaixo e acima do solo é o de "complementariedade" com ênfase em diversidade de plantas, efeitos da biota e outros organismo no solo para o funcionamento da biodiversidade-ecossistema. A investigação neste contexto tem aumentado muito nos últimos 20 anos (Balvanera et al., 2006).

As interações entre micro-organismos e plantas ainda carecem de estudos que visem as suas conseqüências na estruturação da comunidade e no funcionamento do ecossistema. Apesar de inúmeros trabalhos publicados concernentes a determinadas associações micro-organismo-planta, tais como as micorrizas e as bactérias fixadoras de nitrogênio, a maior parte destes estudos se limita a sistemas simples de poucas espécies de plantas, as quais freqüentemente são de interesse econômico (Estrada-Luna et al., 2000). Mesmo os estudos que visam abranger uma perspectiva mais ampla das interações entre a microbiota e os produtores ainda são restritos a determinados sistemas de fácil manipulação e acompanhamento, tais como pequenas comunidades de plantas herbáceas, campos de gramíneas e sistemas semi-agrícolas. A extrapolação de resultados de estudos de interação micro-organismos-plantas com sistemas simples e de poucas espécies para a interferência de propriedades do ecossistemas deve ser feita com cautela, uma vez que os ecossistemas são muito complexos (Levin, 1998). Os sistemas complexos, por sua vez, são caracterizados por suas propriedades de não linearidade, imprevisibilidade e efeitos de contigência, o que é uma conseqüência de sua multiplicidade de componentes e de interações que estes componentes podem ter entre si. Contudo, deve-se ressaltar que as reduções da complexidade original do ecossistema podem ser úteis, uma vez que a complexidade do ecossistema não é passível de ser estudada em sua íntegra por questões logísticas e de tratabilidade de execução de um projeto de pesquisa. Os trabalhos com comunidades reduzidas, porém representativas da comunidade original, como os estudos em micro e macrocosmos (van der Heidjen et al., 2006) são extremamente úteis para o conhecimento das relações entre microbiota e o funcionamento do ecossistema.

Os micro-organismos se apresentam como o grupo mais diversificado dentre os ecossistemas (Pace, 1997). Esta diversidade possibilita milhares de interações entre produtores e micro-organismos e entre micro-organismos dentro de um ecossistema, aumentando a redundância funcional entre diferentes espécies de micro-organismos, o que reduz os efeitos de perda de espécies no funcionamento do ecossistema (Ekschmitt & Griffiths, 1998). Considerando o ecossistema como um sistema complexo, é provável que grande parte da complexidade e resiliëncia do ecossistema seja decorrente da microbiota, visto as características de elevada diversidade, multiplicidade de interações e redundância funcional da comunidade microbiana. Enfim, os micro-organismos simbiontes, partindo deste

princípio podem ser determinantes da diversidade de plantas de um ecossistema. Se eles não existissem, a dinâmica do ecossistema seria totalmente afetada e haveria um aumento de perda de espécies de plantas.

2.5 Estudos de diversidade de micro-organismos

Por definição, para a biologia, a biodiversidade consiste essencialmente do conteúdo da variação biológica que ocorre no mundo. Um termo amplo que engloba desde micro-organismos até organismos superiores como os animais. A diversidade biológica pode ser medida em vários níveis taxonômicos (família, gênero, intra espécie) ou ainda em termos de determinadas características genéticas ou fenotípicas (morfológicas, bioquímicas, fisiológicas e simbióticas). Assim soma-se a este conceito a diversidade funcional em que diferentes grupos filogenéticos ou metabólicos podem mediar diferentes funções no solo, sendo um fator importante para os processos de resiliência no solo quando as condições nestes não estão favoráveis (Moreira & Siqueira, 2006). Em termos moleculares, a diversidade é caracterizada pelo número de diferentes tipos de seqüências de DNA encontradas no ambiente.

Quando se fala em biodiversidade, desmatamento ou extinção de espécies em florestas tropicais se refere somente a espécies vegetais ou animais, como por exemplo, *Cedrela fissilis* ou o mico-leão-dourado, respectivamente. São bem-vindas todas as lutas em prol a preservação destas espécies, porém esquecem que seres importantíssimos, no ecossistema, como os micro-organismos estão sendo dizimados. Assim quando alguma catástrofe ambiental acontece não só animais e vegetais, mas também os micro-organismos são afetados e muitos deles não possuem habilidades locomotoras como outros seres vivos (Azevedo, 1998).

O número de espécies microbianas identificadas cresce a cada ano, sendo formalmente descritos mais de 70.000 fungos, 36.000 protozoários, 30.000 algas, 5.000 bactérias e 3.600 vírus. Mas esses números ainda estão longe do total de espécies microbianas, estimado mais de 2 milhões (Rosseló-Mora & Amann, 2001). No entanto, estes números podem ser subestimados, visto que a real diversidade das comunidades microbianas pode deparar com algumas limitações, pois, por exemplo, no caso das bactérias nem todas as espécies são cultiváveis e este fato dificulta a detecção da variabilidade das mesmas. Além do mais, tem-se uma grande carência de taxonomistas na área, insuficiência de estudos mais aprofundados e restrições metodológicas que podem juntos contribuir para que estes números não sejam exatos (Jesus & Moreira, 2008). Várias são as técnicas moleculares que podem estar sendo utilizadas a fim de detectar o nível de diversidade estudado. Assim o pesquisador deve escolher qual metodologia é mais apropriado para caracterizar sua população microbiana de acordo com seus objetivos. Com o advento das técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) (Saiki et al., 1988) e seqüenciamento de DNA (Sanger et al., 1977), os métodos moleculares têm sido muito úteis na descoberta de novos micro-organismos trazendo facilidades para o estudo destes pequenos seres. A caracterização genotípica de bactérias diazotróficas é uma ferramenta útil para conhecimento da diversidade destes organismos. A aplicação de técnicas baseadas em ácidos nucléicos tem auxiliado muitos estudos de diversidade microbiana. Vários são os benefícios científicos esperados com a aplicação destas metodologias, entre eles, as funções exercidas pelas comunidades microbianas nos ambientes terrestres e o conhecimento de suas interações com outros componentes da biodiversidade, como por exemplo, as plantas. (Colwell, 1997).

2.6 Taxonomia de rizóbios

Identificar corretamente os micro-organismos, como fungos e bactérias, é fundamental e os métodos convencionais existentes podem levar a erros na identificação, uma

vez que são caracterizados com base na caracterização morfofisiológica e bioquímica e este tipo de caracterização pode sofrer interferência ambiental (Barcellos & Hungria, 2010).

Os termos sistemática, taxonomia, classificação e identificação, muitas vezes, são usados de forma inadequada por serem confundidos no seu real significado. A sistemática é definida como o estudo científico da diversidade e inter-relações entre os organismos, com o objetivo de caracterizá-los e arranjá-los de uma maneira ordenada (Truper & Schleifer, 1991). Já a taxonomia aborda a classificação, a identificação e a nomenclatura de um organismo (Cowan, 1968). A classificação, com base na similaridade, organiza os organismos em grupos (táxons) enquanto a nomenclatura determina os nomes para os grupos taxonômicos seguindo as regras internacionais descritas pelo International Code of Nomenclature of Bacteria (Lapage et al., 1992). Para identificação, o conceito se detém ao uso prático da classificação a fim de determinar a identidade de um isolado como membro ou não, de uma unidade. A ferramenta da taxonomia de um determinado organismo é o estudo da filogenia, que estuda as relações existentes entre os organismos, indicando seu possível grupo, suas relações com outros grupos e sua posição nas famílias e reinos chegando ao reconhecimento dos ancestrais. Compõem como a unidade taxonômica central com a espécie a classificação, nomenclatura e identificação taxonômica (Rademarker et al., 2005).

Para reavaliação na definição de espécies, o comitê ad hoc em bacteriologia se reuniu em Gent, Bélgica, em 2002 para dar várias recomendações relativas à definição de espécie aos sistematas, uma vez que uma espécie segundo Rosseló-Mora & Amman, 2001 é definida como uma categoria que circunscreve (preferencialmente) um grupo coerente genomicamente de isolados/estirpes individuais que compartilham alto grau de semelhança em muitas características independentes, comparativamente testadas sob muitas condições padronizadas. O comitê estimula os pesquisadores proporem novas espécies baseados em outros métodos de genômica ou técnicas, contanto que eles possam demonstrar que, dentro do taxa estudado, exista um grau suficiente de congruência entre a técnica usada e hibridização DNA:DNA.

O comitê considera as seguintes técnicas promissoras para definição de novas espécies como: métodos baseados nos perfis de DNA como AFLP, REP-PCR, RFLP, DNA-Arrays, seqüenciamento de *housekeeping* ou outros genes. Além disso, afirmam que as espécies devem ser identificadas por métodos prontamente disponíveis (fenotípicos e genômicos), onde esforços devem ser feitos para estabelecer métodos padronizados informando dados fenotípicos e genotípicos. Trabalhos com diversidade já tem adotado a integração dos métodos para maior confiabilidade dos dados (Mishra et al., 2012). Alguns tópicos (abaixo citados) foram enfatizados pelos autores demonstrando a importância dos mesmos na definição de novas espécies: 1) todas as descrições de espécies devem incluir o sequeciamento quase completo do 16S rDNA (apresentando mais de 1300 nucleotídeos e similaridade com outras sequências < 99,5%) além do da hibridização DNA:DNA ; 2) fenótipo (junto com o genótipo) continua a ter papel relevante para definição de espécies, mesmo que pareça defasado continua tendo propriedades diagnósticas importantes na descrição de uma espécie. Mais ênfase deveria ser colocada nos marcadores usados. É recomendado que um formato comum seja desenvolvido para facilitar a descrição de espécies. O formato deve ser baseado no uso de critérios bem documentados, protocolos laboratoriais, e reagentes dos quais sejam reprodutíveis 3) em prática, características descritivas e diagnósticas deveriam ser descritas em detalhes suficientes para permitir comparações entre taxa e permitir reproduções a partir de observações, principalmente pela disponibilidade de publicações eletrônicas de materiais suplementares pelo IJESM e outros jornais ou por servidores da Web de organizações públicas, estas exigências não são caras nem onerosas 4) propriedades diagnósticas ou diferenciadas deveriam ser obtidas por métodos comparáveis aplicados a estirpes referência de taxa relacionados estritamente; 5) o conteúdo de %G +C de DNA deveriam ser parte da descrição de estirpes tipo das espécies tipo de um novo gênero. O conteúdo de %G+C de uma

estirpe tipo de uma espécie nova em um gênero estabelecido é opcional (Stackebrandt et al., 2002). Teoricamente obter informações ideais sobre a relação filogenética de dois organismos seria através da comparação das seqüências de seus genomas inteiros, no entanto é de difícil execução e interpretação (Hugenholtz & Pace, 1996).

Os métodos fenotípicos para caracterizar uma bactéria incluem análise de características morfológicas do organismo em diferentes substratos de crescimento, utilização de diferentes fontes de carbono, diferentes condições de NACL, pH e temperatura, susceptibilidade e produção de antibióticos, atividades enzimáticas, entre outros (Vandame et aL., 1996). A desvantagem do método fenotípico é a condição da expressão do gene frente à condição ambiental em que o organismo se encontra e reproduzir os mesmos resultados em diferentes laboratórios passa a ser um problema, sendo assim procedimentos mais padronizados devem ser utilizados (On & Holmes, 1991).

Com as características peculiares destes micro-organismos, outras metodologias começaram a ser adotadas, sendo que a comparação DNA-DNA de bactérias assumiu grande importância na delimitação de espécies, onde a técnica de hibridização recebeu grande atenção (Rosselló-Mora; Amann, 2001). Porém, esta técnica é onerosa e os resultados não podem ser comparados com diferentes trabalhos de pesquisa. Mas, o uso de metodologias moleculares de análise do DNA (ácido desoxirribonucléico) permitiu a formação de banco de dados que permitiram comparações de dados de diferentes pesquisadores. E foi com o seqüenciamento genético que estas comparações puderam ser concluídas e enfatizaram a busca por genes conservados nos micro-organismos.

Para os estudos de filogenia e evolução, o ribossomo de procariotos foi o centro das atenções, já que a molécula tem características favoráveis. Estas características se detêm ao fato de serem encontrados em todos os organismos vivos, já que a síntese de proteínas é primordial para o funcionamento celular; as estruturas secundárias são altamente conservadas e isto garante um alinhamento correto das sequências destes genes; são componentes principais e abundantes na estrutura dos ribossomos o que facilita a identificação dos mesmos e como diferenças nas sequências desses genes evoluem em taxas diferentes, permite que análises filogenéticas sejam realizadas em vários níveis de resolução taxonômica. Por estes motivos há razões para que esta molécula tenha ganhado o título de cronômetro evolucionário e foi estabelecido como marcador genético universal (Woese, 1991; Wuyts et al., 2001).

Cerca de 1600pb constituem o gene 16S, que por sinal predominam nos bancos de dados mundiais e tem sido usada com confiabilidade para a separação de gêneros de bactérias, sendo 97% o limite para a separação de espécies , mas sugerindo o uso de diversos genes (MLSA-Multi Locus Sequence Analysis ou "análise de sequência multilocus"), para uma maior resolução taxonômica (Gevers et al., 2005). A sequência do gene ribossomal 16S em estudo pode ser comparada por similaridade com sequências ribossomais das estirpes tipo "*type strain*" (ou de referência) das espécies bacterianas depositadas em bancos de dados como *"GenBAnk do National Center of Biotecnology Information"* (NCBI) Ribosomal Database Project (RDP) (Barcellos & Hungria, 2010). Assim, o 16S rDNA é uma boa ferramenta para uma primeira afiliação filogenética, tanto de organismos já classificados como de novas espécies. No entanto, somente o estudo do gene 16S rDNA não fornece a evolução do genoma como um todo (Gaunt et al., 2001). Assim outras regiões do DNA de procariotos devem ser utilizadas.

Nos estudos do gene 16S RNAr a PCR permite amplificar pequenos e específicos segmentos do genoma. É uma técnica pela qual se obtém in vitro várias cópias de um determinado segmento de DNA, e por essa razão teve grande impacto na Biologia Molecular. Três etapas devem ser levadas em consideração para amplificação de uma sequência de DNA a) extração do DNA, b) reação de amplificação (PCR), c) eletroforese do produto da reação normalmente em géis de agarose. A extração do DNA genômico, ou seja a obtenção de DNA

livre de outros constituintes celulares , permitirá a obtenção de cópias de DNA-alvo que serão utilizados como moldes na reação de amplificação. Existem no mercado kits para este propósito, mas também protocolos laboratoriais que são mais elaborados, porém visto que para a técnica é requerida pequena quantidade de DNA, o alto grau de pureza não é uma exigência, que se comparada a outras técnicas em Biologia Molecular, é uma vantagem da PCR. A próxima etapa depois do DNA extraído é a reação de amplificação. Nesta etapa, o fragmento alvo será duplicado milhões de vezes. Assim como ocorre na célula, a PCR in vitro exige os mesmos constituintes: DNA molde, desoxinucleotídeos trifosfatos (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), DNA polimerase e os oligonucleotídeos *primers*. Os primers irão flanquear a região-alvo e são complementares às extremidades 3'de cada uma das fitas. Na PCR repetidos ciclos estão envolvidos para a amplificação, cerca de 30-45 e cada ciclo tem 3 etapas de amplificação que irão diferenciar em relação a temperatura: inicialmente, a temperatura de 90-95°C provocará a desnaturação do DNA, em seguida ocorrerá o anelamento dos *primers* a região de homologia ã temperatura de 40-55°C, e por último, a 72°C, ocorre o alongamento (ou extensão) da cadeia pela enzima *Taq* polimerase. Estas variações em temperaturas são obtidas por equipamentos chamados termocicladores e são todas programadas. A interpretação dos géis de PCR irá depender dos propósitos, da técnica que se aplica a PCR (Fungaro & Vieira, 1998).

2.6.1 Métodos de tipagem

A reação em cadeia da polimerase (PCR) baseados em métodos *fingerprinting* surgiram como os mais rápidos, confiáveis e simples como alternativas para caracterizar e diferenciar micro-organismos. Complementar à taxonomia, a tipagem permite a diferenciação de isolados dentro das espécies ou subespécies, ou seja, ao nível da estirpe (Rademarker et al., 2005). Essa técnica é chamada geralmente de *fingerprinting* (impressão digital), que significa que o padrão formado, de uma determinada estirpe, é único e específico, permitindo sua discriminação dos demais que compõem comunidades e agrupá-las em grupos de similaridade (Moreira et al., 2008).

Na tipagem, o objetivo é revelar a diversidade com a taxa. Unidades táxons ou taxonômica são grupos organizados com base em semelhanças ou relações definidas que as distinguem de outros organismos em um processo chamado de classificação. Uma variedade de métodos fenotípicos e genotípicos são utilizados para tipagem microbiana, identificação e classificação. Cada método tem suas vantagens e desvantagens, em termos de facilidade de aplicação, reprodutibilidade, exigência de equipamentos sofisticados, modo de ação e nível de resolução filogenética e taxonômica. Métodos de PCR baseados em tipagem permitem a digitalização de uma parte, ou a totalidade, da estrutura do genoma microbiano. Os métodos de tipagem são analisados com a ajuda de um computador por meio de comparatividade ou por identificação tendo por base banco de dados de bactérias. A maioria das metodologias moleculares para caracterizar isolados, linhagens e estirpes baseiam-se na análise de PCR, onde genericamente é chamado *PCR-based DNA fingerprinting techniques* e vem sendo aplicados em estudos de diversidade e identificação de estirpes de bactérias e fungos. A maioria dos trabalhos relatam o uso de RAPD, AFLP e rep-PCR.

Métodos baseados em tipagem têm um papel importante e difundido em estudos de meio ambiente, microbiano, agrícola e industrial, médica e ecológico. A tipagem microbiana é aplicada nos estudos de diversidade em todas essas configurações, incluindo diferentes tipos de isolados, como saprófitas, endófitos, comensais, patógenos, simbiontes e organismos envolvidos na produção biotecnológica. Métodos PCR *fingerprinting* tornaram-se ferramentas valiosas para os ecologistas de micro-organismos e taxonomistas por causa de seu poder discriminatório, velocidade, facilidade de aplicação e viabilidade de processar um grande

número de isolados. a maioria discriminatórias métodos baseados em PCR fingerprinting atualmente utilizados baseiam-se na análise do genoma inteiro (Rademaker et a., 2005).

Rep-PCR (Elementos repetitivos do DNA genômico) é uma das técnicas de tipagem que vêm sendo utilizadas a partir da análise de perfis *fingerprints* gerados a partir de genomas distintos com vários propósitos para bactérias fixadoras de nitrogênio (Binde et al., 2009, Stajković-Srbinović et al., 2012, Cardoso & Hungria, 2012). Está técnica rep-PCR foi, originalmente, desenvolvida para o estudo de diversidade e identificação de bactérias. Os elementos repetitivos parecem estar localizados em distintas posições intergênicas do genoma, em ambas orientações, onde supõe-se que, por serem associadas a graus elevados de polimorfismos, essas regiões gênicas tenham uma participação em processos de evolução adaptativa, mediando a interação dos micro-organismos com ambientes hostis. Existem três famílias principais de elementos repetitivos, incluindo as sequências de consenso palindrômicas (Rep) com 35-40 pb, sequências de consenso intergênicas (ERIC) com 124-127pb e elementos BOX com 154pb (Brujin, 1992; Versalovic et al., 1991,1994). Elementos repetitivos podem estar presentes em ambas orientações e estão localizados em distintas posições intergênicas, ao redor do genoma. Os *fingerprints* de rep-PCR gerados a partir de isolados bacterianos permitem a diferenciação das espécies, subespécies e nível de estirpe. Além disso, o método é largamente aplicável a uma grande variedade de micro-organismos, produzindo os perfis de *fingerprints* complexos em uma variedade de bactérias gram-negativas e gram-positivas. A necessidade de identificar iniciadores arbitrários adequados (por tentativa e erro) para conjuntos de isolados, para RAPD, RFLP não é normalmente necessário para a rep-PCR. Outra vantagem é que rep-PCR pode produzir *fingerprinting*s específicos em amostras de DNA, onde hospedeiro (humano, animal ou vegetal) está presente. Rep-PCR *fingerprinting* é uma técnica simples, rápida e robusta exigindo aproximadamente 50 ng de DNA do organismo alvo por cada 25 ml de reação de PCR com amplificação que requer 5-7 h. (Rademarker et al., 2005).

Uma técnica que também vem sendo difundida e usada é o MLST, *Multilocus Sequence Typing*, que é a tipagem por seqüenciamento de lócus múltiplos, a qual consiste no seqüenciamento e análise conjunta, como uma única sequência concantenada, de vários genes *housekeeping*, em geral 5 (Woo et al., 2007). Estes genes são denominados de "*housekeeping gene*", ou seja, são genes que codificam funções metabólicas fundamentais e sempre são expressos, que fornecem uma discriminação suficiente para a classificação de bactérias. Os "genes housekeeping" evoluem mais rápido do que o 16S rRNA e podem representar uma alternativa útil ou um complemento aos genes ribossomais (Tayeb et al., 2008).

O MLST visa à caracterização genotípica em nível infraespecífico e foi desenvolvido inicialmente para estudar e identificar bactérias patogênicas à saúde humana (Gevers et al., 2005). Em 1998, esta técnica foi proposta como um método de caracterização bacteriana portátil e universal, utilizando o patógeno humano *Neisseria meningitidis* como exemplo (Maiden et al., 1998).

Na reunião do Comitê Internacional de Sistemática Bacteriana em 2002 foi recomendada que um nível informativo de dados filogenéticos seja obtido da determinação de um mínimo de 5 genes sob seleção estabilizada para codificar funções metabólicas (genes housekeeping). Tais genes devem estar em locis de cromossomos diversos e amplamente distribuídos entre taxa. Níveis similares de informação seriam obtidos pela determinação de um maior número de fragmentos de genes de comprimento e tamanho definidos. Os níveis de informação serão dependentes do nível de diversidade genética presente de um determinado táxon. MLST é portátil e simples entre laboratórios, entretanto o custo de seqüenciamento de 7 fragmentos de genes para cada isolado é proibitivo (Gurtler & Mayall, 2001).

A tipagem por seqüenciamento de lócus múltiplos que aborda genes como marcadores filogenéticos alternativos, além de serem conservados para o grupo em estudo, obedecem

alguns critérios como: 1) distribuição no genoma com uma distância mínima entre os genes de 100kb; 2) presença no genoma em uma única cópia; 3) extensão nucleotídica sufiente que permite o seqüenciamento; 4) contém informações suficientes para as análises e 5) o uso obtidos com o uso desses genes devem ser correlacionados com os dados obtidos com o gene ribossomal 16S e com os percentuais de similaridade obtidos por hibridização DNA-DNA (Zeigler, 2003). A grande vantagem desta técnica é que a diferença entre linhagens fica diretamente indexada nas sequências de DNA e também, diferente dos padrões de bandas gerados por métodos de *fingerprinting*, as sequências gênicas podem ser acumuladas em bases de dados de domínio público e comparadas com facilidade (www.cria.org.br/cgee/documentos/microtax.doc.). A técnica vem sendo utilizada também para caracterização de genótipos dentro do gênero *Bradyrhizobium* (van Berkum et al., 2012).

As limitações da hibridização DNA:DNA, 16S DNAr, características fenotípicas e *fingerprints* poderão ser suplantadas por metodologias alternativas, como o MLST, uma sugestão dos pesquisadores na reunião em que foi discutida a definição e o conceito de espécies em procariotos. Uma vez que a metodologia baseada na sequência de vários genes, os ensaios são de baixo custo, há uma facilidade de construir banco de dados de acesso públicos com a possibilidade de inserção de novos dados (Gevers et al., 2005).

Em resumo, vários itens devem ser levados em consideração quando se trata de escolher a melhor técnica molecular dentre todas as existentes, como o orçamento financeiro, natureza da investigação cientifica, organismos a serem estudados, habilidade do pesquisador ou da equipe técnica e disponibilidade do laboratório.

2.7 Métodos para avaliação da ocupação nodular

Assegurar que a maioria dos nódulos em uma leguminosa é ocupado pela cepa inoculante é um verdadeiro desafio para maximizar a fixação de nitrogênio em ambientes agrícolas. Sendo assim, selecionar inoculantes competitivos e eficientes passa a ser mais importante quando comparados a resultados positivos em condições controladas, umas vez que se os inoculantes não atendem aos padrões acima citados, os resultados no campo são insatisfatórios (Yates et al., 2011).

A ocupação dos nódulos por estirpes de rizóbios introduzidas no solo, via inoculantes, tornou-se um desafio para os rizobiologistas, que vêm desenvolvendo diversos trabalhos, em diferentes áreas da pesquisa, para solucioná-lo. Várias pesquisas têm sido conduzidas com "rizóbios" com o objetivo de aumentar sua competitividade intrínseca, além de avaliar o efeito da interação entre os mesmos e outros micro-organismos. Uma vez que a taxa de ocupação do nódulo pela estirpe inoculada pode apresentar causas variadas, além da especificidade, que é dependente de uma complexa troca de sinais moleculares entre a planta e a bactéria (Araújo & Hungria, 1999).

Muitas técnicas estão sendo utilizadas com o objetivo de estudar a localização dessas bactérias, principalmente os métodos sorológicos, porém uma abordagem alternativa e mais completa para este propósito provavelmente, seriam os métodos que utilizam a biologia molecular como ferramenta, já que estes suprem as deficiências dos outros métodos. Entretanto, há poucos relatos que ligam a sorologia de estirpes de rizóbio com resultados obtidos por métodos moleculares (van Berkum et al., 2012).

Há muitos anos, os métodos sorológicos vêm sendo usados na investigação da interação e ecologia de rizóbios e leguminosas, porém um problema significativo com a sorologia deve-se a uma incidência elevada de reações cruzadas (Hungria et al., 2000, Mpepereki e Wollum 1991). As abordagens tradicionais para o estudo da ecologia de rizóbios no campo sofrem algumas desvantagens, principalmente ao trabalho intensivo dos ensaios, o que limita a quantidade de dados que podem ser recolhidos, e da falta de especificidade

suficiente para permitir a identificação da estirpe inespecífica. Novas técnicas que se baseiam em biologia molecular podem proporcionar vantagens significativas sobre estes métodos ou complementá-los na identificação das espécies de rizóbio (Wilson, 1995; Svenning et al., 2001; Mostasso et al., 2002; Hungria et al., 2003; Raposeiras et al., 2006; Simon & Salava, 2006; Sarr & Lesueur, 2007; van Berkum et al., 2012). As reações cruzadas que ocorrem quando se utiliza o método da sorologia na ocupação de nódulos podem ser resolvidas com o uso de MLST para determinar genótipos, no entanto, há poucos relatos que ligam trabalhos de sorologia com estirpes de rizóbios com resultados obtidos por métodos moleculares.

Van Berkum e colaboradores, 2012, estabeleceram a técnica MLST (*Multilocus Sequence Typing)* para ligar afinidades sorológicas e genótipos cromossomais de soja com o objetivo de determinar a ocupação dos nódulos destas plantas no campo que já têm um vasto histórico de estudos baseados em sorologia. Verificaram que o método foi aplicado com sucesso para a determinação de ocupação de nódulos em soja realizando a extração dos bacterióides diretamente dos nódulos sem o prévio cultivo onde é descrito no artigo, facilitando os trabalhos para aplicação da técnica de PCR para amplificação dos 7 genes *housekeeping.*

Também os métodos de tipagem têm sido usados com sucesso para identificação das bactérias fixadoras de nitrogênio respondendo positivamente quanto à ocupação em nódulos de leguminosas (Saar & Lesueur, 2007; Raposeiras et al., 2006; Hungria et al., 2003; Svenning et al., 2001).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem e caracterização morfológica e molecular dos isolados

Colônias 37 isolados são recomendados como inoculante para *Albizia pedicellaris* (DC.) L.Rico (Iganci, 2012), *Piptadenia gonoacantha* (Mart.) J.F.Macbr (Morim, 2012) e que nodulam *Pseudopiptadenia contorta* (DC.) G.P.Lewis & M.P.Lima (Morim, 2012). Estas colônias foram previamente armazenadas em tubos com meio YMA (Yeast Manitol Ágar) (Anexo A) sólido inclinado sob condições ambiente. Para a reativação destas bactérias, estas foram estriadas em placa de Petri contendo meio de cultura 79 (Fred & Waksman, 1928) sob condições assépticas, pH 6,8 com azul de bromotimol e em seguida incubadas em câmera de crescimento sob temperatura de 28ºC. A origem e a identificação dos isolados estão descritos na tabela 1. Em seguida, foi realizada a purificação dos isolados e sua caracterização morfológica. As seguintes características culturais foram avaliadas: alteração do pH do meio de cultura após o crescimento da bactéria (ácido, neutro ou alcalino); taxa de crescimento, avaliada pelo tempo de formação de colônias isoladas (1 dia, crescimento muito rápido; 2-3 dias, crescimento rápido; 4-5 dias, crescimento intermediário; 6-10 dias, crescimento lento; mais de 10 dias, crescimento muito lento); características das colônias: cor das colônias (creme, branca, amarela ou rosa); diâmetro das colônias (mm); borda (inteira, irregular ou lobada); forma (circular, irregular ou puntiforme); elevação (plana, lenticular, convexa ou pulvinada); detalhes ópticos (translúcida, transparente, brilhante ou opaca) e consistência da colônia (seca, aquosa, gomosa, butírica ou viscosa). O muco produzido pelas células foi avaliado quanto à quantidade (escasso, pouco, moderada ou abundante) (Moreira, 1991).

Para cada uma destas estirpes foi feito um novo estoque criopreservado em glicerol 10% após a checagem da pureza e a caracterização morfológica. A cultura foi repicada para meio de cultivo TY (Anexo B) para uma menor produção de expolissacarídeos e incubada a 28ºC até o crescimento, sendo os estoques preparados a partir dos mesmos. Em seguida, foi dispensada a solução de glicerol a 10% (todo o conteúdo do tubo de ensaio) sobre o

crescimento bacteriano na placa, homogeneizando a biomassa que se desprende do meio de cultivo com a micropipeta até formar uma suspensão densa (verificação visual). Foi colocado 1 mL da suspensão em cada um dos 2 criotubos, identificando-os e agitando-os em vórtex antes da armazenagem a -20ºC

Algumas destas estirpes com codificação BR estão depositadas na "Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas e outros Micro-organismos Multifuncionais" na Embrapa Agrobiologia e as que não possuem este código estão depositadas na coleção do Laboratório de Leguminosas Florestais/ Embrapa Agrobiologia. Resssalta-se que algumas das estirpes recomendadas como inoculante para as plantas de estudo não pertencem ao hospedeiro original e todas elas podem ser consultadas em detalhes pelo site: http://mwpin004.cenargen.embrapa.br/jrgnweb/jmcohtml/jmcohome01.jsp. A origem dos isolados partiram de nódulos coletados nos locais abaixo especificado na tabela 1, onde estas foram cultivadas em casa de vegetação na Embrapa Agrobiologia para obtenção dos nódulos conforme metodologia proposta por Fred & Waksman (1928).

Tabela 1. Origem e identificação dos isolados bacterianos recomendados e/ou isolados de nódulos de *Albizia pedicellaris*, *Piptadenia gonoacantha, Pseudopiptadenia contorta, Anadenanthera peregrina e Piptadenia stipulacea.*

Plantas de estudo	Estirpes recomendadas		Hospedeiro original	Origem
	Original/outras identificações	Idenficação na tese		
Pseudopiptadenia contorta	CVRDIII-3	PC3	*Pseudopiptadenia contorta*	Compahia Vale do Rio Doce
	CVRDIII-4	PC4	*Pseudopiptadenia contorta*	Compahia Vale do Rio Doce
	CVRDIII-5	PC5	*Pseudopiptadenia contorta*	Compahia Vale do Rio Doce
	CVRDIII-7	PC7	*Pseudopiptadenia contorta*	Compahia Vale do Rio Doce
	CVRDIII-8	PC8	*Pseudopiptadenia contorta*	Compahia Vale do Rio Doce
Albizia pedicellaris	CVR 07 = SEMIA 6408	BR6815	*Albizia pedicellaris*	Compahia Vale do Rio Doce
	Jurema branca 10	BR6816	*Albizia pedicellaris*	Compahia Vale do Rio Doce
	Jurema branca 11	BR6817	*Albizia pedicellaris*	Compahia Vale do Rio Doce
	Jurema branca 15	BR6818	*Albizia pedicellaris*	Compahia Vale do Rio Doce
	CVRDII-10	AP10	*Albizia pedicellaris*	Compahia Vale do Rio Doce
	CVRDII-12	AP12	*Albizia pedicellaris*	Compahia Vale do Rio Doce
	CVRDII-13	AP13	*Albizia pedicellaris*	Compahia Vale do Rio Doce
	CVRDII-14	AP14	*Albizia pedicellaris*	Compahia Vale do Rio Doce
	SMF616-1	SMF616-1	*Albizia pedicellaris*	Pará, Porto de trombetas
	SMF616-2	SMF616-2	*Albizia pedicellaris*	Pará, Porto de trombetas
	SMF616-3	SMF616-3	*Albizia pedicellaris*	Pará, Porto de trombetas
Piptadenia gonoacantha	Ag 6	BR4802	*Anadenanthera peregrina*	Colombo, PR
	UFC 832.55	BR4812	*Piptadenia stipulacea*	Fortaleza, CE
	Ag 3 Pav. Jacaré	BR4813	*Piptadenia gonoacantha*	São Paulo, SP
	IFSP-1	BR4816	*Piptadenia gonoacantha*	São Paulo, SP
	IFSP-4	BR4817	*Piptadenia gonoacantha*	São Paulo, SP
	IFSP-3	BR4818	*Piptadenia gonoacantha*	São Paulo, SP
	IFSP-9	BR4820	*Piptadenia gonoacantha*	São Paulo, SP
	IFSP-10	BR4821	*Piptadenia gonoacantha*	São Paulo, SP
	AV 1	BR4822	*Piptadenia gonoacantha*	São Paulo, SP
	AV 2	BR4823	*Piptadenia gonoacantha*	São Paulo, SP
	AV 3	BR4824	*Piptadenia gonoacantha*	São Paulo, SP
	AV 4	BR4825	*Piptadenia gonoacantha*	São Paulo, SP
	AV 6	BR4826	*Piptadenia gonoacantha*	São Paulo, SP
	AV 7	BR4827	*Piptadenia gonoacantha*	São Paulo, SP
	SMF1181-1	SMF1181-1	*Piptadenia gonoacantha*	Parahibuna-SP
	SMF1181-2	SMF1181-2	*Piptadenia gonoacantha*	Parahibuna-SP
	SMF1181-3	SMF1181-3	*Piptadenia gonoacantha*	Parahibuna-SP
	SMF1181-5	SMF1181-5	*Piptadenia gonoacantha*	Parahibuna-SP
	SMF1181-6	SMF1181-6	*Piptadenia gonoacantha*	Parahibuna-SP
	SMF1181-7	SMF1181-7	*Piptadenia gonoacantha*	Parahibuna-SP
	SMF1181-8	SMF1181-8	*Piptadenia gonoacantha*	Parahibuna-SP

3.1.1 Reação de Gram

Para a coloração de Gram, retirou-se com o auxílio de uma alça de platina uma porção de cultura bacteriana, espalhando-a em uma gota de água destilada colocada no centro da lâmina. O esfregaço foi seco ao ar e fixado através da passagem rápida da face inferior da lâmina sobre a chama. Posteriormente, aplicou-se o corante cristal violeta, por um minuto, o lugol (que tem a função de fixar o cristal violeta), por um minuto, o álcool, por aproximadamente 20 segundos e a fucsina por um minuto, sempre escorrendo o material aplicado em água corrente entre um procedimento e outro. As lâminas foram avaliadas em microscópio óptico em objetiva de 100 X, com utilização de óleo de imersão, sendo definidas Gram-positivas as células que se coraram de roxo e Gram-negativas as que se coraram de róseo/vermelho (Yano et al., 1991).

3.1.2 Extração do DNA Genômico

A extração do DNA genômico destes isolados, de acordo com as especificações do fabricante, foi realizada utilizando-se o kit Promega (Wizard Genomic, DNA Purification Kit) (Figura1) após prévio cultivo em meio YMA (Fred & Waksman, 1928) e caracterização morfofisiológica cultural (Moreira, 1991; Jordan, 1984).

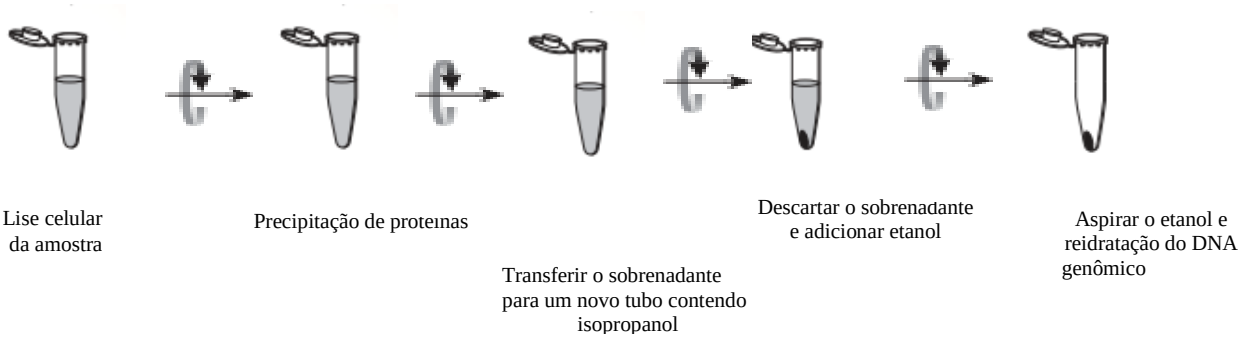


Figura 1. Representação esquemática das etapas de extração do DNA genômico utilizando o kit PROMEGA (Wizard Genomic, DNA Purification kit) fornecido pelo fabricante.

O produto de extração foi avaliado por leitura em espectrofotômetro do tipo NanoDrop (Thermo Scientific) para verificação da concentração de DNA em $g.L^{-1}$ e a razão entre os valores de absorbância a 260 e 280 nm, como estimativa da pureza do extrato obtido. A qualidade do DNA genômico foi feita por eletroforese em gel de agarose (1% p/v) e por meio da realização de reações de PCR com diferentes pares de iniciadores. Um µl de cada amostra juntamente com 2µl de tampão de amostra (0,25% de azul de bromofenol e 40% de sacarose) foram submetidos a uma voltagem de 100 volts por uma hora e 30 minutos em tampão TAE 1x (0,04M tris acetato e 1mM de edta). Em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo ($0,5\mu g.mL^{-1}$) e visualizado sob luz ultravioleta em um fotodocumentador kodak logic 100 (kodak®).

3.1.4 Avaliação da diversidade de isolados

a) Reação de BOX-PCR

Para a comparação dos 37 isolados recomendados para *Albizia pedicellaris*, *Piptadenia gonoacantha* e *Pseudopiptadenia contorta*, foram realizadas reações de *BOX-PCR*

segundo metodologia descrita por Kaschuk et al., 2006. As reações de amplificação foram preparadas em volume final de 25 µL constituída de: água ultrapura estéril; dNTPs (0,3mM); tampão 1X; DMSO (5%); MgCl2 (1,75mM), *primer BOX A1R* (Tabela 2) (1µM); Taq (1,25U); 2,0 µL de DNA. As condições de PCR foram: um ciclo de desnaturação inicial, a 95°C, por 5 minutos; 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 53°C e 8 minutos a 65°C; um ciclo de extensão final, a 65°C, por 16 minutos e manutenção, a 4°C. Após a reação de amplificação, os produtos foram submetidos a eletroforese onde 3µL de cada amostra juntamente com 2µL de tampão da amostra foram submetidos a uma voltagem 85 volts, em gel de agarose a 1,9%, por 6 horas. Utilizou-se como peso molecular o marcador 1kb plus DNA Ladder (InvitrogenTM). Em seguida, o perfil de bandas gerado foi visualizado em fototransluminador (KODAK GL100) após o gel ter sido corado com brometo de etídeo (5 $\mu g.mL^{-1)}$ e descorado em água destilada por 1 h Os perfis de bandas gerados foram analisados pelo programa Gel Compar 2.0 *Applied Maths* baseado no coeficiente de Dice e o método de agrupamento UPGMA para a construção do dendrograma de similaridade.

Tabela 2. Iniciador utilizado utilizado nas reações de amplificação do gene *BOX-PCR* com a respectiva sequência de nucleotídeo e referência.

Iniciador	**Sequência 5'→3'**	**Referência**
BOX-A1R	5'- CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'	Versalovic et al., 1994

b) Amplificação do gene 16S DNAr

Para a amplificação do fragmento de *16S DNAr* para as mesmas estirpes foi utilizada a combinação de iniciadores *Amp1* e *Amp2* (Tabela 3.). As reações de amplificação foram preparadas num volume final de 25µL. A concentração final dos reagentes por reação foi de 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e, 2,5 mM de cloreto de magnésio, tampão 1 x para PCR, 0,2 µM de cada dNTP e 0,02 U Taq DNA polimerase (Taq DNA polimerase, Invitrogen) e 2,0 µL de DNA. As condições de PCR foram de um ciclo de desnaturação inicial de 94ºC por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação (94ºC por 40 s), anelamento (55º por 40 s), extensão (72ºC por 1,5 min) e uma extensão final de 72ºC por 7 minutos. Após a reação de amplificação, os produtos foram submetidos a eletroforese onde 3µL de cada amostra juntamente com 2µL de tampão da amostra foram submetidos a uma voltagem de 90 volts, em gel de agarose a 1,0%, por 1:30 horas. Utilizou-se como peso molecular o marcador 1kb plus DNA Ladder (InvitrogenTM). Em seguida, o perfil de bandas gerado foi visualizado em fototransluminador (KODAK GL100) após o gel ter sido corado com brometo de etídeo (5 $mg.mL^{-1)}$ e descorado em água destilada por 30 minutos.

Os produtos de PCR da região 16S DNAr foram purificados e seqüenciados na República da Coréia, na empresa Macrogen, e os nucleotídeos foram reunidos e submetidos à montagem de sequências contíguas com o auxílio do program Chromas.

Tabela 3. Iniciadores utilizados nas reações de amplificação do gene *16S DNAr* com as respectivas sequências de nucleotídeos e referência.

Iniciadores	Sequência 5'→3'	Referência
Amp 1	5' GAGAGTTTGATYCTGGCTCAG 3'	Wang et al., 1996
Amp 2	5' AAGGAGGT GATCCARCCGCA 3'	

c) Amplificação do gene nodC

Para a amplificação do fragmento do gene *nodC* para as mesmas estirpes foi utilizada a combinação de iniciadores *nodCF540* e *nodCF1160* (Tabela 4.) As reações de amplificação foram preparadas num volume final de 25µL. A concentração final dos reagentes por reação foi de 0,8 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e, 1,75 mM de cloreto de magnésio, tampão 1 x para PCR, 0,25 µM de cada dNTP e 1,25 U Taq DNA polimerase (Taq DNA polimerase, Invitrogen) e 1,0 µL de DNA. As condições de PCR foram de um ciclo de desnaturação inicial de 95ºC por 5 min, 35 ciclos de desnaturação (95ºC por 1 min), anelamento (60º por 2 min), extensão (72ºC por 2 min) e uma extensão final de 72ºC por 5 minutos. Após a reação de amplificação, os produtos foram submetidos a eletroforese onde 3µL de cada amostra juntamente com 2µL de tampão da amostra foram submetidos a uma voltagem de 90 volts, em gel de agarose a 1,0%, por 1:30 horas. Utilizou-se como peso molecular o marcador 1kb plus DNA Ladder (InvitrogenTM). Em seguida, o perfil de bandas gerado foi visualizado em fototransluminador (KODAK GL100) após o gel ter sido corado com brometo de etídeo (5 $mg.mL^{-1)}$ e descorado em água destilada por 30 minutos.

Tabela 4. Iniciadores utilizados nas reações de amplificação do gene *nodC* com as respectivas sequências de nucleotídeos e referência.

Iniciadores	Sequência 5'→3'	Referência
nodCF 540	5' TGATYGAYATGGARTAYTGGCT 3'	Sarita et al., 2005
nodCR 1160	5' CGYGACARCCARTCGCTRTTG 3'	

3.1.5 Sequenciamento, análise de similaridade e filogenia

Os produtos de PCR amplificados das amostras foram congelados e em seguida secos no *speed vac* e enviados a empresa Macrogen, na República da Coréia, para a realização de purificação e sequenciamento direto. As sequências obtidas foram analisadas quanto à qualidade, pelo programa Chromas. Foram obtidas sequências similares no GenBank (NCBI) utilizando o programa Basic Local Alignment Search Tool (Blast, 2009), para a realização dos alinhamentos pelo programa ClustalW. As sequências alinhadas foram então utilizadas para análise filogenética, por meio do método Neighbour-Joining usando Kimura-2 parâmetros (Kimura, 1980), pelo programa MEGA 4.1 (Tamura et al., 2007), aplicando um *bootstrap*, com um mínimo de 2.000 replicações.

3.2 Experimento de diversidade de rizóbios e diversidade de plantas da Floresta Atlântica

3.2.1 Área de estudo

Os dois experimentos de diversidade de rizóbios e de plantas da Floresta Atlântica foi realizado em casa de vegetação, na Embrapa Agrobiologia, Seropédica entre os meses de dezembro de 2012 e junho de 2013, com duração de aproximadamente seis meses.

3.2.2 Estirpes inoculadas

As espécies de rizóbio inoculadas englobou os principais gêneros encontrados a partir da análise do seqüenciamento genético dos isolados recomendados para *Albizia pedicellaris* (Iganci, 2012), *Piptadenia gonoacantha* (Morim, 2012) e que nodulam *Pseudopiptadenia contorta* (Morim, 2012) (descritas no item 3.1) (Tabela 5.). A escolha para a combinação destas estirpes nos diferentes tratamentos de inoculação proporcionou uma maior aproximação do que ocorre no campo devido à grande heterogeneidade e até mesmo noções da dinâmica dos microrganismos na comunidade de plantas.

Foram utilizados para a inoculação uma mistura de esporos de *Gigaspora margarita* Becker & Hall e *Glomus clarum* Nicolson & Schenck, obtidos da rizosfera de *Brachiaria decumbens* cultivada, onde os fungos foram multiplicados. Com o objetivo de evitar a contaminação dos vasos com outros rizóbios no momento da inoculação dos FMAs, foi realizada a esterilização superficial ou desinfestação dos esporos previamente à sua aplicação nos tratamentos. A inoculação com fungos micorrízicos foi realizada para todos os tratamentos a fim de garantir a nodulação das leguminosas que já tem registro desta dependência micorrízica (Jesus et al., 2005) .

Tabela 5. Bactérias escolhidas para compor os níveis de diversidade dos tratamentos do experimento de comunidade e individual de plantas com suas respectivas características morfofisiológicas.

Identificação das estirpes	Taxonomia	Crescimento	pH	Cor	Absorção de indicador
BR4802	*Burkholderia phymatum*	Rápido	Neutro	Creme	Sim
BR4812	*Burkholderia tuberum*	Rápido	Alcalino	Branca	Sim
BR4826	*Mesorhizobium sp.*	Rápido	Neutro	Branca	Sim
BR6815	*Bradyrhizobium sp.*	Lenta	Ácido	Creme	Não
BR6816	*Burkholderia sp.*	Rápido	Neutro	Creme	Sim
SMF 616-1	*Rhizobium sp*	Rápido	Ácido	Creme	Sim
PC-7	*Burkholderia sp.*	Rápido	Ácido	Creme	Não
PC-3	*Burkholderia sp.*	Rápido	Alcalino	Creme	Não
PC-5	*Burkholderia sp.*	Rápido	alcalino	Creme	Não

O procedimento para obtenção de esporos desinfestados consistiu de extração, limpeza em lupa e a desinfestação propriamente dita, com uso de detergente e antibióticos. Para a extração, foi utilizado o método de peneiramento úmido proposto por Gerdemann & Nicolson

(1963), seguido de centrifugação em água e sacarose a 45 % (Daniels & Skipper, 1982), para separação dos esporos de impurezas.

Para facilitar o isolamento dos esporos, foram utilizadas peneiras que permitissem a máxima eliminação de impurezas como, pedaços de raízes, areia, etc. Para *G. clarum* foram utilizadas as peneiras 0,42 mm e 106 µm, e para *G. margarita* 0,42 mm e 210 µm, selecionando desse modo, esporos com maiores diâmetros que a segunda peneira para cada espécie de fungo. Em seguida, os esporos retidos nas respectivas peneiras, foram selecionados em microscópio estereoscópio para aumentar a eficiência do método, através da eliminação de impurezas, esporos mortos e espécies indesejáveis.

A desinfestação foi realizada de acordo com a metodologia de Bécard & Fortin (1987), com algumas modificações (Laboratório de Micorrizas da Embrapa Agrobiologia, dados não publicados). Consistiu dessa etapa, a lavagem dos esporos em detergente Tween 20 (0,05 %) durante 1 minuto, agitação com chloramine T 2 %, por 2 períodos de 10 minutos cada, e remoção dos gases dissolvidos dos diferentes materiais em suspensão, através de um vácuo de 20 cm^3, com o uso de uma seringa. Em seguida, foram realizadas quatro lavagens de 10 minutos cada com solução antibiótica constituída de uma mistura de 200 mg L^{-1} de estreptomicina e 100 mg L^{-1} de gentamicina, e para finalizar essa etapa, realizou-se 4 lavagens com água esterilizada.

Na segunda etapa, os procedimentos foram semelhantes ao primeiro, exceto, a lavagem com Tween 20, que não foi necessária. Dando seqüência, foi realizado a filtragem da estreptomicina e gentamicina em filtro miliporo 0,22 µm estéril e remoção das diferentes fases líquidas com uso de seringa de Pauster esterilizada em chama.

3.2.4 Espécies de plantas da Floresta Atlântica

A escolha das espécies foi baseada em critérios ligados a disponibilidade de sementes e épocas de coleta, e que fossem nativas da Floresta Atlântica. Foram selecionadas 3 espécies de leguminosas: *Pseudopiptadenia contorta, Piptadenia gonoacantha e Albizia pedicellaris* e 3 espécies de não leguminosas: *Cupania vernalis, Colubrina glandulosa e Handroanthus chrysotrichus.*

3.2.5 Tratamento das sementes

Antes da semeadura em bandejas de isopor contendo areia fina autoclavada, as sementes de *Pseudopiptadenia contorta, Piptadenia gonoacantha, Albizia pedicellaris, Cupania vernalis, Colubrina glandulosa e Handroanthus chrysotrichus* foram desinfestadas superficialmente em hipoclorito 1%. Para as espécies *Albizia pedicellaris* e *Cupania vernalis* houve a necessidade de um tratamento com ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado por 20 min para quebra de dormência. Após estes dois tratamentos as sementes foram lavadas e logo mantidas em água destilada estéril até a semeadura.

3.2.6 Delineamento experimental

As parcelas experimentais do experimento de comunidade consistiram de bandejas plásticas de 20x21x23 cm simulando uma comunidade juvenil com espécies de plantas em crescimento conjunto; já para os experimentos com as plantas individualizadas foram utilizados vasos com capacidade de 3 kg. Os tratamentos tanto para o experimento em que foram cultivadas as 6 espécies em conjunto, quanto para o experimentos em que cada planta foi cultivada de forma individualizada constituíram de: a) um controle não inoculado e sem nitrogênio (TSN), b) um nível mínimo (Nmín) composto por três estirpes de rizóbios (duas recomendadas para *Albizia pedicellaris* e uma para *Piptadenia gonoacantha),* c) um nível

máximo (Nmáx) composto de 9 estirpes de rizóbio (duas recomendadas e uma que nodula cada leguminosas em questão - Tabela 6), e d) um tratamento referência com nitrogênio, sendo utilizadas 6 repetições para cada um destes tratamentos. Os experimentos foram montados em delineamento de blocos casualizados (DBC).

Tabela 6. Tratamentos utilizados no experimento de diversidade de rizóbios e plantas da Floresta Atlântica.

Tratamentos	Estirpes de rizóbio
TN	Não inoculado
TSN	Não inoculado
Nmin	BR4812, BR6815,PC3
Nmáx	BR4812, BR6815,PC3, BR4802, BR4826, BR6816, SMF616-1, PC7 e PC5

N= níveis de riqueza de espécies de rizóbios.
Nmin= nível mínimo de estirpes de rizóbio
Nmax=nível máximo de estirpes de rizóbio
TN= tratamento nitrogenado
TSN=tratamento sem nitrogênio e sem inoculação

3.2.5- Cultivo das estirpes inoculadas

As estirpes foram cultivadas separadamente em 50 mL de meio YMA, sob agitação de 140 rpm durante 72 horas para aquelas de crescimento rápido, e até 120 horas para as estirpes de crescimento lento. Em seguida, todas as suspensões bacterianas foram ajustadas para uma densidade ótica de 0,8 a λ=600nm, em um espectofotômetro (aproximadamente 10^9 células.mL^{-1}). Para compor cada nível de inoculação as estirpes referentes ao nível mínimo e nível máximo foram misturadas em erlenmeyers separadamente.

3.2.6 Implantação do experimento

O substrato utilizado foi uma mistura autoclavada na proporção 1:1:1 (v/v/v) de areia, vermiculita e um argissolo horizonte B. Este argissolo foi coletado no campo experimental da Embrapa Agrobiologia ("Terraço"). Foi realizada uma adubação fosfatada e com calcário mediante a análise de solo (Tabela 7.). Antes da autoclavagem foi misturado na bitoneira junto ao solo 96mg/kg^{-1} de calcário dolomítico com PRNT de 75,1%,, 2,75g/kg^{-1} de fosfato de Argélia com 29% de P_2O_5. Após um mês de instalação foi aplicada semanalmente uma solução nutritiva livre de nitrogênio (ANEXO C). As análises químicas do solo foram realizadas pelo Laboratório de Química Agrícola da Embrapa Agrobiologia/CNPAB.

Tabela 7. Análise química da mistura de areia, vermiculita e argissolo na proporção 1:1:1 (v/v/v).

pH S	AlS	Ca+Mg	Ca	Mg	P	k
	----------cmolc.dm^{-3}----------				------mg.dm^{-3}------	
5,48	0,06	2,31	1,08	1,23	2,9	16,5

No primeiro experimento em bandejas plásticas 20x21x23 cm simulando uma comunidade juvenil foram transplantadas ao acaso 36 mudas, 6 plantas de cada espécie

situando-as em distâncias de 2,5 cm. Os outros experimentos foram realizados com as mesmas espécies e mesmos procedimentos e tratamentos, porém as plantas foram individualizadas em vasos de 3 dm^3. As bandejas plásticas e os vasos contendo a mistura estéril para os diferentes tratamentos receberam as plântulas padronizadas quanto a sua altura e vigor para cada espécie e foram distribuídas aleatoriamente no mesmo.

A irrigação foi realizada com o propósito de manter a umidade do solo próximo a capacidade de campo sendo utilizada água estéril para evitar contaminação.

Juntamente com as mudas, foram adicionados os inoculantes de rizóbio e FMAs para todos os tratamentos, 1mL e 2g/planta, respectivamente, de acordo com os mesmos. O inoculante de FMAs continha aproximadamente 12 esporos/mL.

A adubação semanal com nitrogênio mineral foi feita sob a forma de nitrato de amônio com doses crescentes (conforme resposta visual) variando de 5mgN/mL a 20mg N/mL de NH_4NO_3.

3.3 Determinações

A) Produtividade, avaliação do nitrogênio foliar e fertilidade do solo

Os experimentos foram avaliados aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias após o transplantio, determinando-se a altura de todas as plantas em todos os experimentos. No final do experimento (figura 2 e figura 3), o material vegetal foi seco em estufa de circulação de ar forçado a 60ºC, até peso constante, determinando-se a matéria seca da parte aérea para inferência da produtividade de cada microcosmo relacionado a cada tratamento e a cada espécie. A MPAS foi moída e analisada em relação ao teor de nitrogênio foliar nas espécies individualizadas e em comunidade nos diferentes tratamentos.

Figura 2. Desmontagem do experimento em junho de 2013.

Figura 3. Evolução do experimento de diversidade de rizóbios e plantas da Floresta Atlântica ao longo de 6 meses.

B) Isolamento e caracterização cultural e avaliação da ocupação nodular utilizando a técnica *BOX-PCR*

Após a colheita do experimento o isolamento das bactérias presentes nos nódulos de *Piptadenia gonoacantha* e *Albizia pedicellaris* foi realizado para 3 nódulos retirados de cada tratamento inoculado (Nível mínimo e Nível máximo), repetição e espécie para as plantas crescidas individualmente. Estes isolados foram purificados e estocados em glicerol. Para a comunidade de plantas foram coletados 12 nódulos para isolamento abordando as 3 repetições. A concentração nas três repetições foi escolhida a fim de uma amostragem mais consistente para a avaliação da ocupação nodular. Abaixo uma imagem mostrando uma planta de *Piptadenia gonoacantha*, seus nódulos e bactérias isoladas e purificadas de um de seus nódulos (Figura 4).

Para identificação dos isolados foram utilizadas letras iniciais referentes ao nome da espécie da planta; seguida do tratamento e repetição que a bactéria foi isolada e por fim um número correspondente ao número do nódulo. Para isso, os nódulos foram mergulhados em álcool por 30 segundos com o objetivo de quebrar a tensão superficial, por 60 segundos em H_2O_2 para a desinfestação, e em seguida, lavados seis vezes em água destilada estéril para retirar o peróxido de hidrogênio. Os nódulos foram então macerados, em condições assépticas, sobre meio de cultura 79 pH 6,8 com azul de bromotimol. Após a purificação dos isolados, as seguintes características morfofisiológicas foram avaliada conforme mencionado no item 3.1.

A extração do DNA genômico destes isolados foi realizada de acordo com as especificações do fabricante utilizando-se o kit Promega (Wizard Genomic, DNA Purification Kit) (Figura1), após prévio cultivo em meio YMA (Fred & Waksman, 1928) e caracterização morfofisiológica cultural (Moreira, 1991; Jordan, 1984).

O produto de extração foi avaliado por leitura em espectrofotômetro tipo NanoDrop (Thermo Scientific) para verificação da concentração de DNA em $g.L^{-1}$ e a razão entre os valores de absorbância a 260 e 280 nm, como estimativa da pureza do extrato obtido. A qualidade do DNA genômico foi feita por eletroforese em gel de agarose (1% p/v) e por meio da realização de reações de PCR com diferentes pares de iniciadores. 1 µl de cada amostra juntamente com 2µl de tampão de amostra (0,25% de azul de bromofenol e 40% de sacarose) foram submetidos a uma voltagem de 100 volts por 1 hora e 30 minutos em tampão TAE 1x (0,04M tris acetato e 1mM de EDTA). Em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídeo ($0,5\mu g.ml^{-1}$) e visualizado sob luz ultravioleta em um fotodocumentador kodak logic 100 (kodak®).

Para avaliação da ocupação nodular nas espécies de *Albizia pedicellaris e Piptadenia gonoacantha* , as reações de *BOX-PCR* foram realizadas segundo descrição de Kaschuk et al., 2006. As reações de amplificação foram preparadas em volume final de 25 µL constituída de: água ultrapura estéril; d NTPs (0,3mM); tampão 1X; DMSO (5%); MgCl2 (1,75mM), *primer BOX A1R* (Tabela 2),Taq (1,25U**);** 2,0 µL de DNA. As condições de PCR foram: um ciclo de desnaturação inicial, a 95°C, por 5 minutos; 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 53°C e 8 minutos a 65°C; um ciclo de extensão final, a 65°C, por 16 minutos e manutenção, a 4°C. Após a reação de amplificação, os produtos foram submetidos a eletroforese onde 3µL de cada amostra juntamente com 2µL de tampão da amostra foram submetidos a uma voltagem 85 volts, em gel de agarose a 1,9%, por 6 horas. Foi utilizado como peso molecular o marcador 1kb plus DNA Ladder (InvitrogenTM). Em seguida, o perfil de bandas gerado foi visualizado em fototransluminador (KODAK GL100) após o gel ter sido corado com brometo de etídeo ($5\ \mu g.mL^{-1)}$ e descorado em água destilada por 1 h. Os perfis de bandas gerados foram analisados pelo programa Bionumerics (Aplieds Mathematics, Kortrijk, Bélgica, v. 7.0), onde foi gerado um dendrograma dos 53 isolados obtidos. Para a análise de agrupamento, foi utilizado o método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with

Arithmetic mean, Sneath & Sokal, 1973) baseado no índice de similaridade de Jaccard (Jaccard, 1912). Este dendrograma permitiu o agrupamento dos isolados das diferentes leguminosas (inoculadas com diferentes níveis de diversidade) às estirpes inoculadas nos diferentes tratamentos, indicando a dominância com que as mesmas nodularam estas leguminosas quando estavam crescendo em conjunto com outras plantas como também quando estavam crescendo isoladamente.

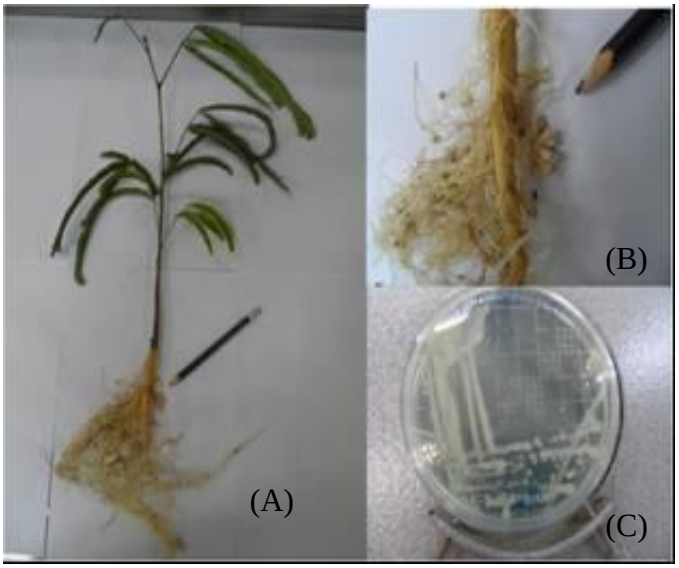


Figura 4. A e B nódulos nas raízes e C Bactérias isoladas de *Piptadenia gonoacantha.*

3.4.8 Análises estatísticas

Os dados de crescimento e produtividade obtidos foram analisados estatisticamente utilizando o programa SISVAR versão 4.3 (Ferreira, 2000) e os efeitos dos tratamentos foram comparados pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização morfofisiológica e molecular das estirpes

A caracterização morfofisiológica das culturas é o primeiro passo para identificar novos micro-organismos e auxiliar nos estudos de diversidade. A caracterização cultural das 37 estirpes que são recomendadas e que nodulam as espécies *Albizia pedicellaris, Pseudopiptadenia contorta e Piptadenia gonoacantha* estão sumarizadas no ANEXO D. Verificou-se após a observação da morfologia das colônias dos isolados de rizóbios, que de forma geral, a maioria das 37 estirpes apresentaram um crescimento rápido e acidificaram o meio de cultura, apresentando colônias creme, de consistência gomosa, forma circular e com absorção positiva de indicador do meio de cultura (Figura 5 e 7).

As maioria das estirpes isoladas da espécie *B. pedicellaris, P. gonoacantha, P. contorta* apresentaram crescimento rápido e pH ácido. Estas características, segundo Graham (1976) e Moreira (1991) são de extrema importância para uma primeira aproximação taxonômica de uma bactéria que ainda não foi identificada.

A quantidade de muco produzida, em geral, foi pouca para os isolados estudados e esta também é uma característica que pode indicar um mecanismo de adaptação e sobrevivência das bactérias em diferentes condições ambientais (Coutinho et al, 1999).

A partir destes dados de caracterização morfológica, foi elaborado um dendrograma de similaridade e observado que as bactérias que nodulam as 3 espécies em questão (*B. pedicellaris*, *P. gonoacantha*, *P. contorta)* se distribuíram em 4 grupos com 70% de similaridade, evidenciando elevada diversidade morfológica (Figura 6).

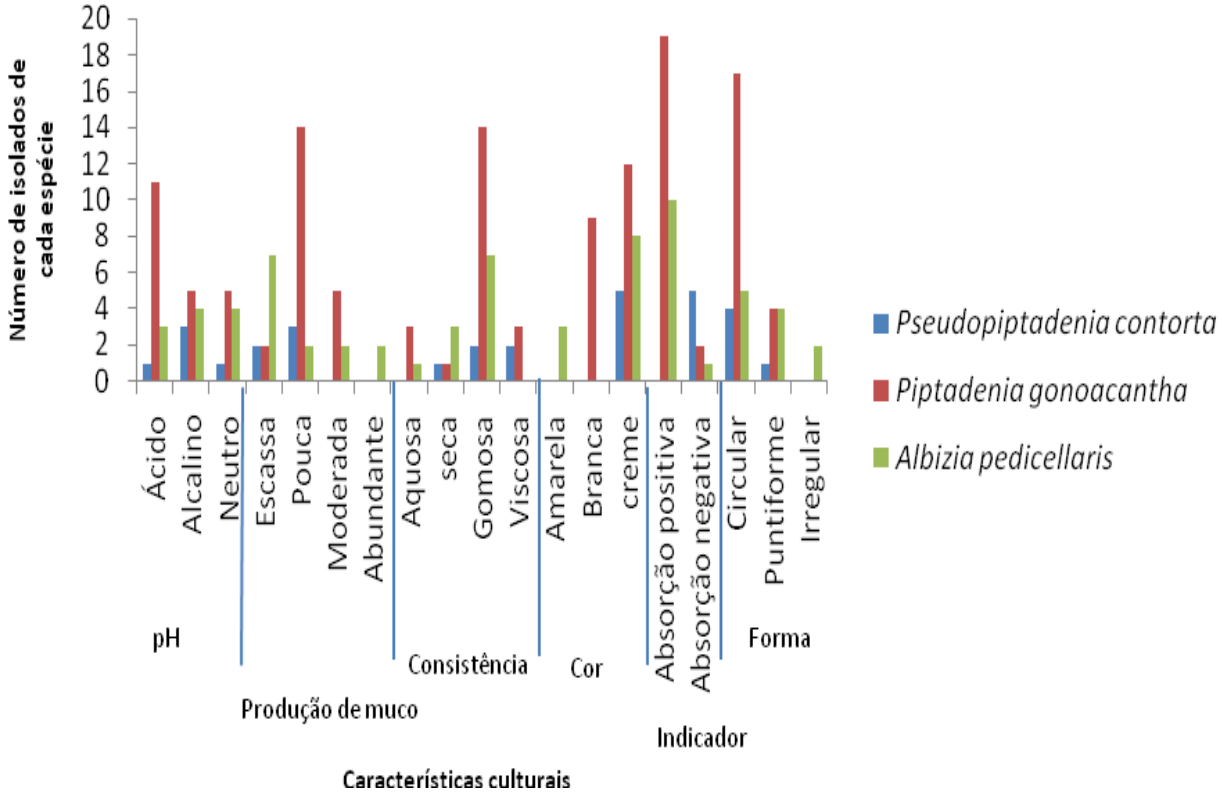


Figura 5. Distribuição das estirpes provenientes das leguminosas: *Pseudopiptadenia contorta*, *Piptadenia gonoacantha* e *Albizia pedicellaris* quanto às principais características morfofisiológicas avaliadas (alteração de pH, produção de muco, consistência da massa, absorção de indicador e forma da colônia).

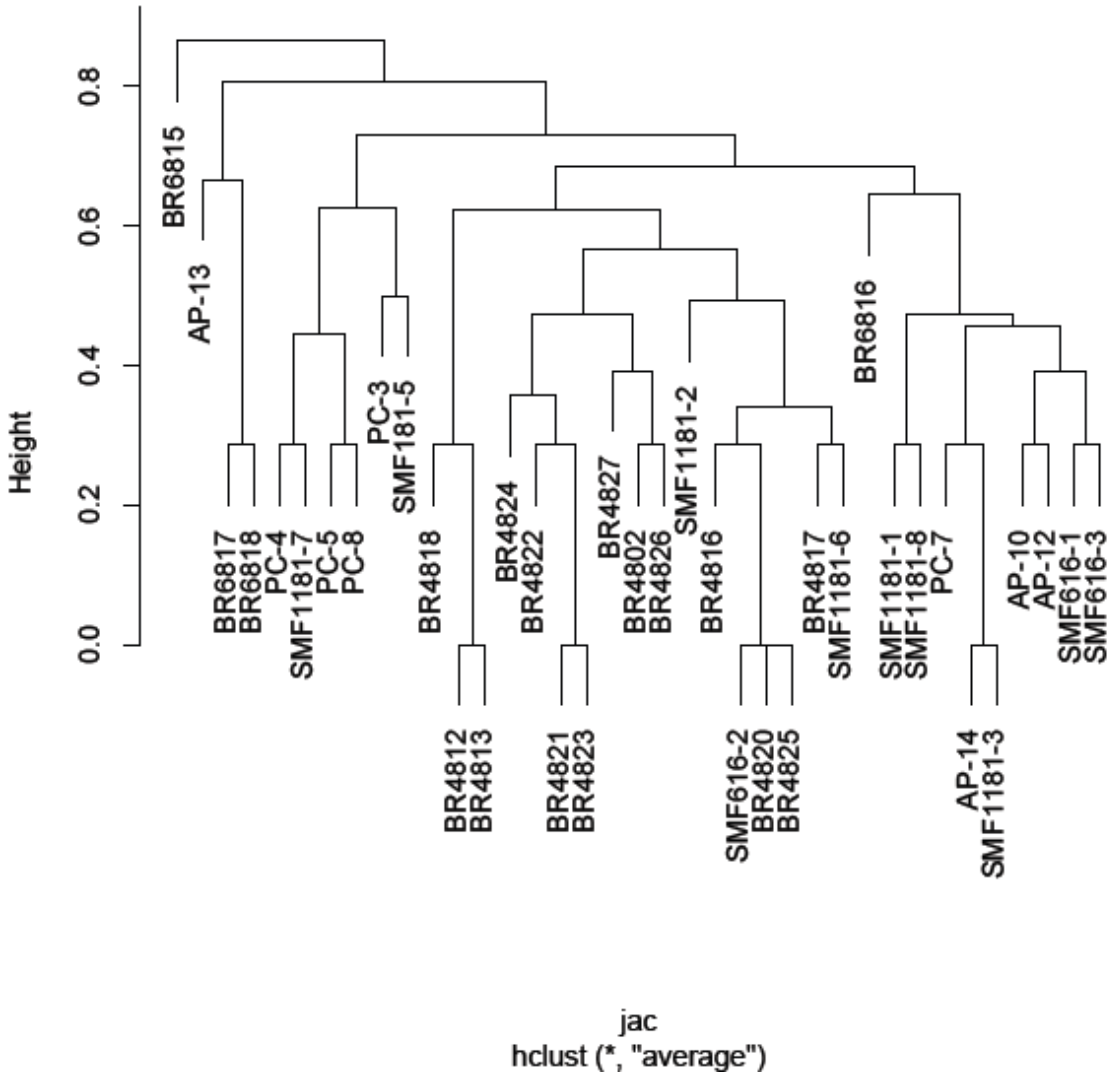


Figura 6. Dendrograma de similaridade construído com o índice Jaccard e algoritimo UPGMA pelo programa R (R Core Team, 2013) das estirpes representativas dos perfis morfofisiológicos, evidenciando a diversidade dos grupos formados.

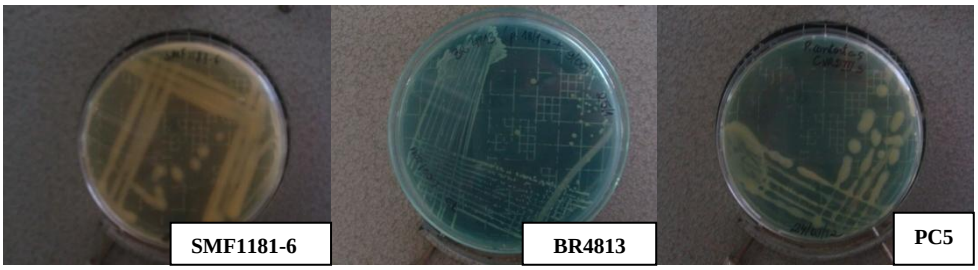


Figura 7. Diversidade morfofisiológica de estirpes de *Albizia pedicellaris, Piptadenia gonoacantha*, e *Pseudopiptadenia contorta*, respectivamente.

4.1.1 Reação de Gram

Todas as 37 bactérias foram identificadas como gram-negativas. É sabido que a coloração de Gram pode ser usada para identificação de bactérias diazotróficas como forma de autenticação, uma vez que todas as espécies de rizóbio são Gram-negativas e absorvem o reagente safranina (Hungria, 1994, Deshwal & Chaubey, 2014). O teste de Gram permite distinguir dois grupos de bactérias: as bactérias gram positivas e as bactérias gram negativas e apresenta-se como um método empírico onde a coloração diferencial reflete diferenças na constituição da parede celular das bactérias (Figura 8).

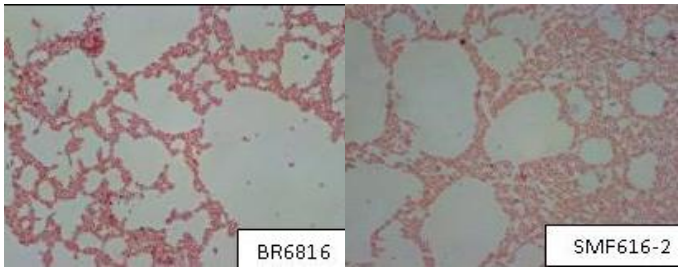


Figura 8. Fotografias capturadas em microscópio ótico de contraste de fase com objetiva de 100x, com óleo de imersão da reação de gram para as bactérias recomendadas para *Albizia pedicellaris.*

4.1.2 Extração do DNA Genômico

O DNA obtido pelo método de extração usando o kit Promega forneceu um DNA genômico de boa qualidade para as análises moleculares realizadas observando-se alguma variação na quantidade de DNA entre as amostras. Isto provavelmente ocorreu em função da diferença do número de células de cada bactéria quando foi feita a extração.

4.1.3 Avaliação da diversidade dos isolados

A) Reação de *Box-PCR*

A amplificação por PCR usando o iniciador *BOX-A1R* para a amplificação de regiões flanqueadas por sequências repetitivas de DNA (BOX-PCR) foi obtida com sucesso com um perfil complexo de bandas de boa reprodutibilidade (Figura 9). Alem disso, foi verificada uma alta diversidade genotípica entre os isolados. Sete grupos principais foram formados e estão indicados por letras alfabéticas no dendrograma de similaridade, juntamente com os perfis de bandas obtidos e os respectivos isolados com seus hospedeiros (Figura 10).

Observou-se a formação de pequenos grupos dominados por isolados de uma mesma espécie, porém não houve um padrão claro de agrupamento de acordo com o hospedeiro. O

grupo A, formado a 50% de similaridade, foi constituído em sua maioria por isolados de *Piptadenia gonoacantha,* assim como ocorreu no grupo C, formado a 57% de similaridade. O grupo D formado a 47% de similaridade foi dominado por isolados de *Albizia pedicellaris.* Já os isolados de *Pseudopiptadenia contorta* ficaram distribuídos nos grupos B, C e E. O grupo B foi constituído por isolados das 3 espécies em questão não havendo predominância dos mesmos em relação aos hospedeiros. Já o grupo E abrangeu apenas três isolados, sendo dois deles de *Pseudopiptadenia contorta e* um de *Piptadenia gonoacantha.* As estirpes BR4817 e BR4802 de *Piptadenia gonoacantha* apresentaram baixa similaridade genotípica quando comparadas às demais, respectivamente, 41 e 31%.

A técnica rep-PCR foi originalmente desenvolvida para o estudo de diversidade e identificação de bactérias (Brujin, 1992; Versalovic et al., 1991,1994). Os elementos repetitivos parecem estar localizados em distintas posições intergênicas do genoma, em ambas orientações, onde supõe-se que, por serem associadas a graus elevados de polimorfismos, essas regiões gênicas tenham uma participação em processos de evolução adaptativa. Existem três famílias principais de elementos repetitivos, incluindo as sequências de consenso palindrômicas (Rep) com 35-40 pb, sequências de consenso intergênicas (ERIC) com 124-127 pb e elementos BOX com 154 pb (Brujin, 1992; Versalovic et al., 1991,1994). Os Elementos repetitivos podem estar presentes em ambas orientações e estão localizados em distintas posições intergênicas ao redor do genoma.

Técnicas moleculares de *fingerprinting,* utilizando *primers* com oligonucleotídeos específicos, como a sequência BOX, têm sido amplamente empregadas em estudos de diversidade genética. Vários autores têm conseguido uma discriminação clara dos isolados pelo uso desta técnica (Mishra et al., 2012). E resultados de rep-PCR têm mostrado concordância com os estudos de homologia DNA-DNA ou pela análise de *cluster* (indireto), ou por uma comparação direta dos valores de similaridade primários (Stackebrandt et al., 2002).

A análise de perfis gerados a partir de genomas distintos tem sido usada para vários propósitos para bactérias fixadoras de nitrogênio (Binde et al., 2009, Stajković-Srbinović et al., 2012,, Cardoso & Hungria, 2012, Hassan & Eissa, 2013).

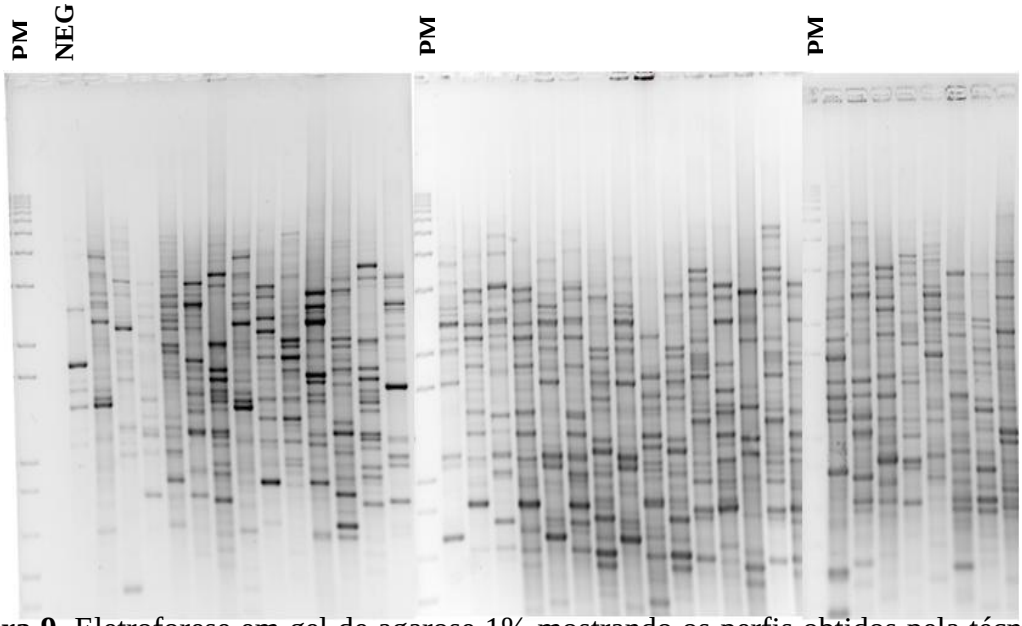


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando os perfis obtidos pela técnica BOX-PCR para as 37 estirpes recomendadas para *Pseudopiptadenia contorta*, *Piptadenia gonoacantha* e *Albizia pedicellaris.*PM: Marcador de Peso Molecular 1Kb DNA ladder- Invitrogen. Neg: controle negativo.

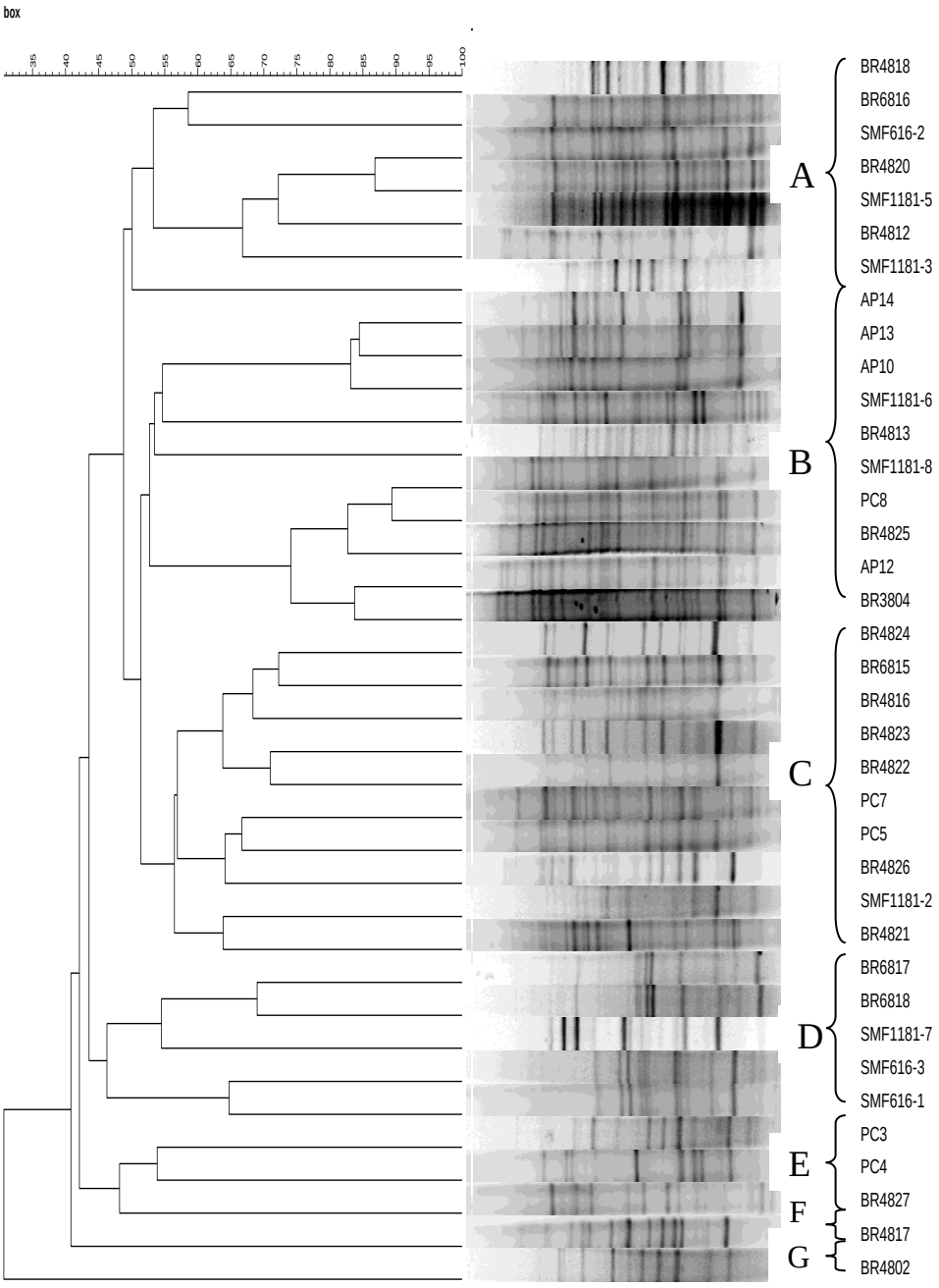


Figura 10. Dendrograma de similaridade genética construído com o índice Dice e método de agrupamento UPGMA, mostrando os agrupamentos formados entre os isolados de *Albizia pedicellaris*, *Piptadenia gonoacantha* e *Pseudopiptadenia contorta* analisados pela técnica de BOX-PCR.

B) Amplificação do gene 16S DNAr

A amplificação por PCR do fragmento (de aproximadamente 1500 pb) correspondente ao gene 16S DNAr usando os dois primers *Amp1* e *Amp2* foi obtida com sucesso para as 37 estirpes (Figura 11), porém o sequenciamento genético foi obtido com sucesso para 27 delas. Mesmo sendo um marcador filogenético eficiente pela sua conservação ao longo dos tempos, ainda se discute o seu uso para classificar espécies de bactérias muito próximas. Sendo assim a recomendação para se usar outras técnicas, como por exemplo, *BOX PCR* procede, uma vez que o 16S pode revelar baixa resolução taxonômica para algumas espécies devido a sua alta conservação (Stackebrandt et al, 2002).

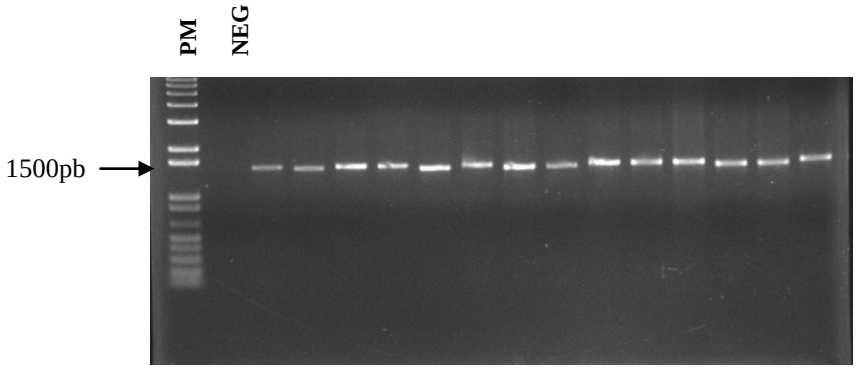


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando a amplificação do gene 16S DNAr PCR para as 14 estirpes (demonstração da amplificação para um número parcial de amostras) .PM: Marcador de Peso Molecular 1Kb DNA ladder- Invitrogen. Neg: controle negativo.

C) Amplificação do gene *nodC*

A amplificação por PCR do fragmento (de aproximadamente 620 pb) correspondente ao gene *nodC* usando os dois primers *NodC540* e *nodC1160* foi obtida com sucesso para 22 estirpes (Figura 12). Dezesseis delas estão em destaque com um símbolo circular vermelho na árvore filogenética (Figura 13). Para as outras 6 amostras foi obtida a amplificação para o gene *nodC*, mas não o sequenciamento genético. São elas: PC4, PC5, PC8, BR4817, BR4821, BR4825, BR4827.

O fato da não amplificação do gene *nodC* para as 15 amostras (do total de 37 amostras) provavelmente tenha ligação com o fato de que os primers utilizados para estas bactérias não sejam específicos para o gene *nod*C nelas presente. Neste caso, seria necessário testar outros primers para o gene em questão ou desenhar novos primers. Outra possibilidade é que elas não possuam genes nod em seus genomas, o que já foi relatado para estirpes de *Bradyrhizobium* fotossintéticas (Giraud et al., 2007).

Observa-se que a maioria dos isolados com a presença do gene *nodC* corresponde ao gênero *Burkholderia* e, em menor frequência, estão relacionados a *Rhizobium, Mesorhizobium e Bradrhizobium.* Os genes simbióticos incluem genes de nodulação (genes *nod*) e genes de fixação de nitrogênio (genes *nif, fix* e *fdx*) que estão localizados em plasmídeos simbióticos (pSym) ou em regiões genômicas chamadas de ilhas simbióticas (Aoki et al., 2013). Muitos genes de nodulação ocorrem em todas as espécies de rizóbio com exceção de estirpes de *Bradrhizobium* que nodulam *Aeschynomene* (Giraud et al, 2007). Alguns estudos recentes têm hipotetizado a transferência horizontal destes genes de α- para β-proteobacteria (Moulin et al., 2001; Angus & Hirsh, 2010; Bontemps et al., 2010; Bournaud et al., 2013).

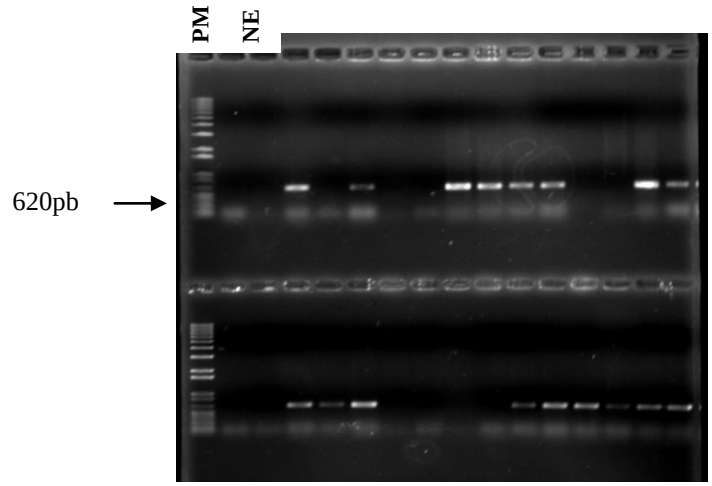


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando a amplificação do gene *nodC* para 17 estirpes (demonstração da amplificação para um número parcial de amostras). PM: Marcador de Peso Molecular 1Kb DNA ladder- Invitrogen. Neg: controle negativo.

4.1.4 Sequenciamento, análise de similaridade e filogenia

a) Produto de PCR do fragmento 16S DNAr

Foi obtido com sucesso seqüenciamento para 27 estirpes. As seqüências obtidas serão depositadas no banco mundial de genes do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

O resultado de análise de similaridade realizada no GenBank pelo programa Blast mostrou similaridade de até 99% com as sequências do banco de dados. Os resultados mostraram uma considerável diversidade genética onde foram encontrados 4 gêneros diferentes nodulando as três espécies florestais: *Burkholderia, Bradyhrhizobium, Rhizobium* e *Mesorhizobium.* As seguintes estirpes puderam ser identificadas ao nível de espécie: AP10, BR6816 e AP13, que se mostraram filogeneticamente relacionadas a *Burkholderia bannensis* e *Burkholderia tropica*; BR4813, como *Burkholderia unamae*; BR4812, como *Burkholderia tuberum*; BR4816, como *Burkholderia nodosa*; BR 4802, como *Burkholderia phymatum*; e BR6817 e BR6818, como *Bradyrhizobium yuanmingense*. Para as demais estirpes, em especial estirpes de *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium*, esta identificação ficou restrita ao nível de gênero, pois o marcador 16S rDNA não foi capaz de distingui-las a nível de espécie. Uma solução para isto seriam análises adicionais, como a amplificação de outros genes para estas estirpes. Os isolados AP10, AP13 e BR6816 ficaram próximos filogeneticamente à *Burkholderia bannensis, B. tropica e B. unamae.* As bactérias SMF616-1 SMF616-3, SMF1181-2, SMF1181-5, SMF1181-6, SMF1181-8 e SMF616-2 foram similares a *Rhizobium rubi, R. miluonense, R. tropici, R. hainanense* e *R.multihospitum.* A BR4826 ficou próxima às espécies *Mesorhizobium septentrionale, M. amorphae, M. huakui, M. opportunistum.* Já a BR6815 ficou evolutivamente próxima a espécies de rizóbio do gênero *Bradrhizobium: B. lablabi, B.elkanii, B. liaoningense, B.iriomontense.*

Dois grupos de isolados, identificados em um circulo vermelho na figura 13 se destacaram dos demais, ressaltando uma grande potencialidade para serem identificados como novas espécies nodulando leguminosas florestais. Observa-se que estas bactérias formaram um clado a parte sem incluir nenhuma espécie já descrita.

Figura 13. Árvore filogenética baseada nas sequências quase completas do gene 16S DNAr das estirpes. A raiz usada para a árvore foi de *Bacillus subtilis*. A porcentagem suporte do *bootstrap* foi de 2000 replicações. O símbolo circular vermelho na árvore filogenética indica a amplificação positiva por PCR do fragmento (de aproximadamente 620 pb) correspondente ao gene *nodC* usando os dois primers *NodC540* e *nodC1160***.**

4.3 Experimento de diversidade de rizóbios e diversidade de plantas da Floresta Atlântica

O resumo das análises de variância realizadas no programa SISVAR se encontram nas tabelas 9,10,11,12,13,14 e 15 e ANEXO E.

4.3.1- Avaliação da altura, matéria seca da parte aérea e raiz

4.3.1-1-Crescimento das plantas (altura média)

Para algumas variáveis, a análise visual da variação de crescimento das plantas (altura das plantas, aos 90 dias de crescimento, foi influenciada pelos tratamentos inoculados, tanto em comunidade como individualizada. Porém, estatisticamente, os dados não corroboraram com as observações (Figura 14).

Em geral, a altura média foi maior no tratamento nitrogenado. O tratamento com o maior nível de riqueza de rizóbios (Nmáx), foi superior à testemunha absoluta, mostrando que a velocidade de crescimento da parte aérea das plantas foi favorecida pela inoculação de uma maior riqueza de rizóbios. O tratamento Nmín apresentou um desempenho intermediário, se igualando, estatisticamente, a ambos os tratamentos Nmáx e testemunha absoluta (Figura 15). Exceção foi verificada para B. pedicellaris no experimento onde as plantas se encontravam individualizadas. Nestas condições, a altura média foi significativa para o tratamento inoculado Nmáx, que foi estatisticamente igual à testemunha nitrogenada e superior à testemunha absoluta e ao tratamento Nmín.. Este efeito pode ter sido causado pela bactéria BR4826 (*Mesorhizobium)* que ocupou 62,02% dos nódulos conforme mostra a Tabela 17. Para as demais espécies, a variação da altura foi superior para a testemunha nitrogenada quando comparada aos demais tratamentos (Figura 18).

Considerando a identidade das espécies nos desdobramentos estatísticos, o efeito dos tratamentos sobre a altura média foi altamente significativo para *Albizia pedicellaris, Colubrina glandulosa, Handroanthus chrysotrichus* ($p<0,000$). O mesmo não foi observado para as espécies. *P.contorta* e *C. vernalise* e *Piptadenia gonoacantha (*Figura 16).

Para o tratamento nitrogenado observou-se uma resposta positiva no crescimento de *Albizia pedicellaris, Colubrina glandulosa* e *Handroanthus chrysotrichus* em relação às demais espécies. A espécie *Piptadenia gonoacantha* foi favorecida na altura média no tratamento Nmin, seguida do tratamento Nmáx que se igualou à testemunha absoluta e, por fim, à testemunha nitrogenada que neste caso, desfavoreceu o crescimento da espécie. Já as espécies *C. vernalis* e *P. contorta* não foram afetadas por nenhum dos tratamentos (Figura 17). Possivelmente as bactérias BR6815 (*Mesorhizobium sp.)* que ocuparam a maioria dos nódulos (38,3%) de *Piptadenia gonoacantha* (conforme Tabela 16) proporcionaram um efeito positivo no crescimento desta espécie, uma vez que as mesmas compuseram o tratamento Nmín.

No experimento onde as plantas se encontravam individualizadas, a altura média foi significativa para o tratamento inoculado Nmáx na espécie *B. pedicellaris,* que foi estatisticamente igual à testemunha nitrogenada e superior à testemunha absoluta e ao tratamento Nmín.. Este efeito pode ter sido causado pela bactéria BR4826 (*Mesorhizobium)* que ocupou 62,02% dos nódulos conforme mostra a Tabela 17. Para as demais espécies, a variação da altura foi superior para a testemunha nitrogenada quando comparada aos demais tratamentos (Figura 18).

Sabe-se que a não disponibilidade de nitrogênio no solo pode ser um fator limitante ao crescimento das plantas, sendo assim tanto a adubação com N como a presença de bactérias

fixadoras de nitrogênio suprem esta deficiência e podem alterar a composição da comunidade e a produtividade do ecossistema (Vitousek & Field, 1999; Bever et al., 2013).

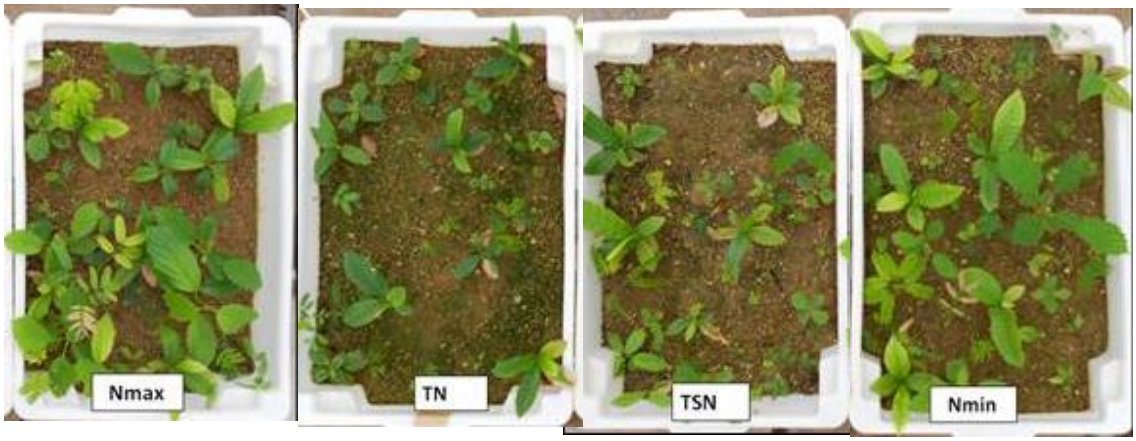


Figura 14. Crescimento das plantas em comunidade após 60 dias de instalação nos tratamentos Nmáx, TN, TSN e Nmín.

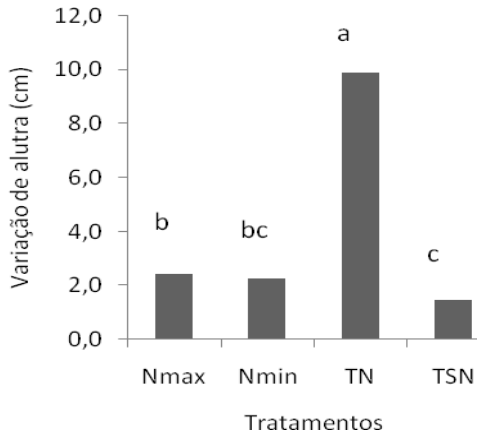


Figura 15. Altura (cm) média para todas as espécies nos diferentes tratamentos (Nmáx, Nmín, TN e TSN) observada após xxx de implantação do experimento de comunidade de plantas, em casa de vegetação, Seropédica (RJ). Inserir legenda (Nmáx, Nmín, TN e TSN).

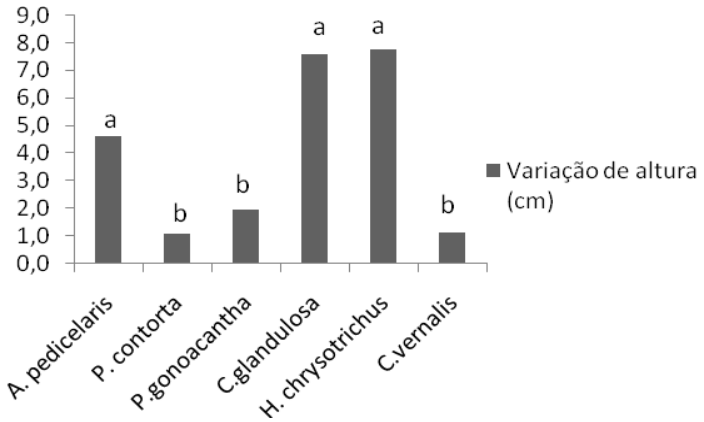


Figura 16. Altura média (cm) das diferentes espécies após xxx dias de observação no experimento de comunidade de plantas realizado em casa de Vegetação, Seropédica (RJ).

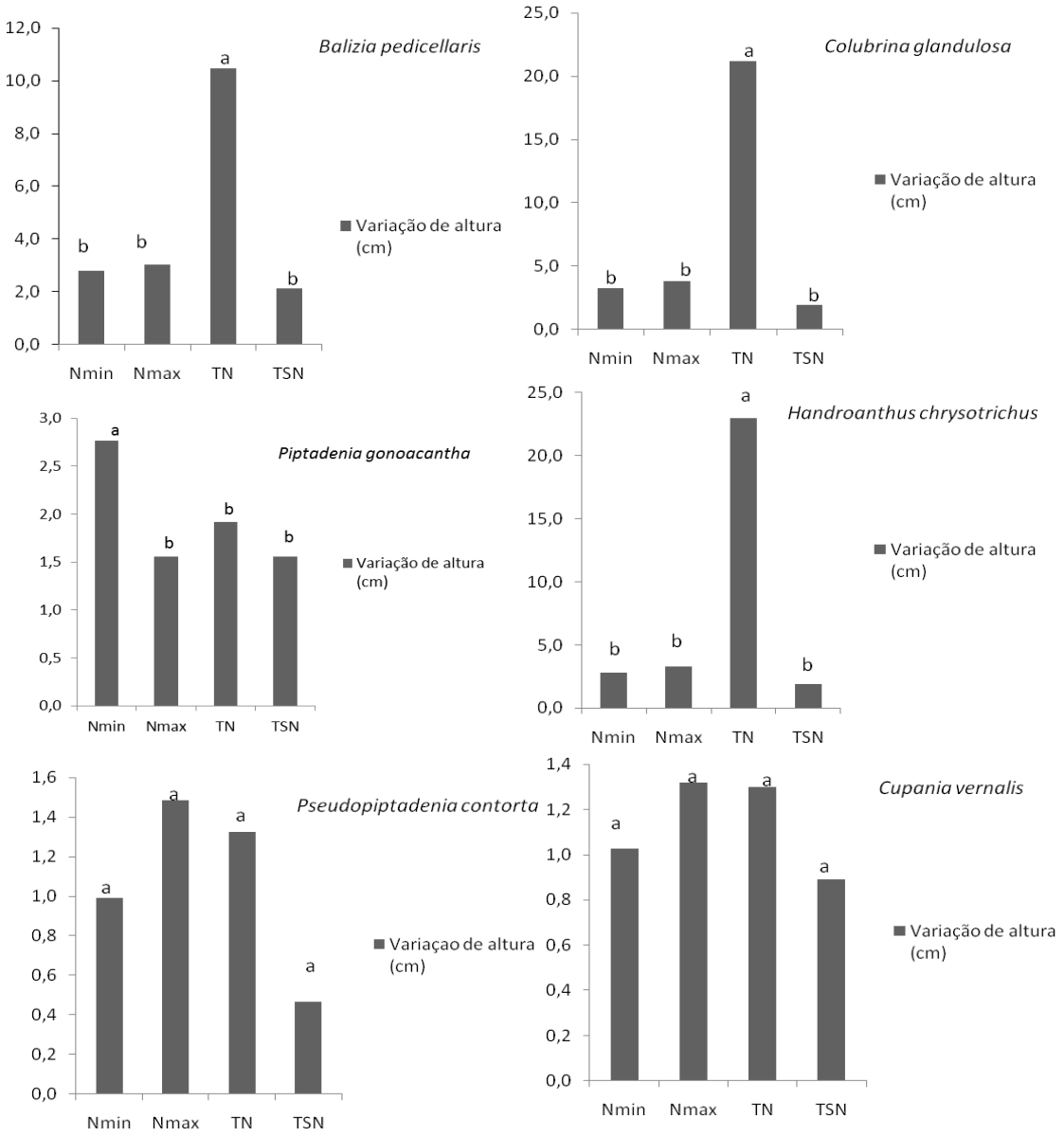


Figura 17. Altura média (cm) das espécies *B. pedicellaris*, *P.gonoacantha*, *P. contorta*, *C. glandulosa*, *H. chrysotrichus*, *C. vernalis* e total (considerando todas as espécies) nos diferentes tratamentos após 180 dias de implantação do experimento de comunidade de plantas em casa de vegetação, Seropédica, RJ.

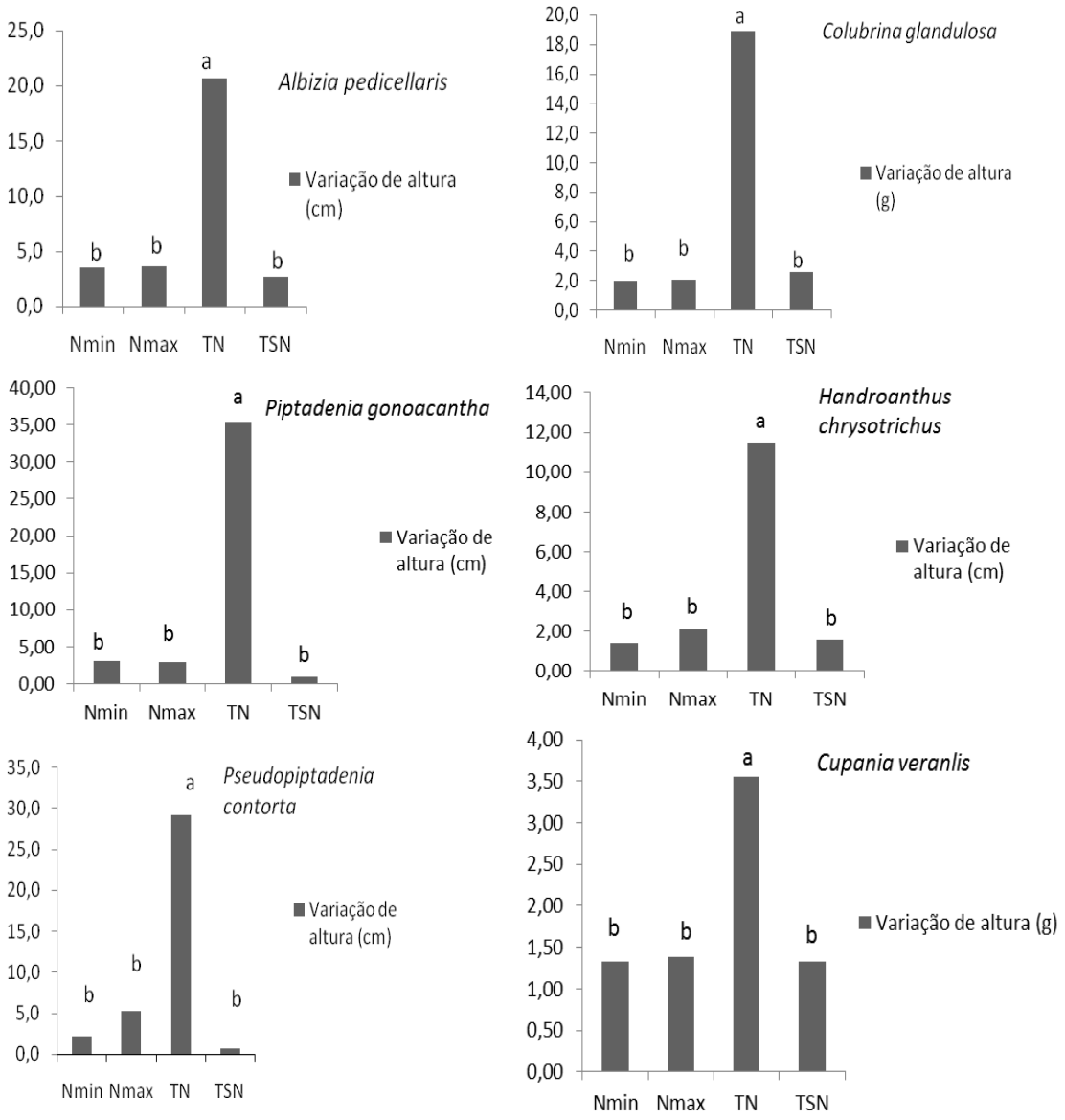


Figura 18. Altura das espécies *B. pedicellaris, P.gonoacantha, P. contorta, C. glandulosa, H. chrysotrichus, C. vernalis* nos diferentes tratamentos no experimento individualizado após 180 dias de observação, em casa de vegetação em Seropédica, RJ.

4.3.1.2- Acúmulo de massa na parte aérea

Para a maioria das espécies, o crescimento está diretamente relacionado ao incremento de massa seca, sendo assim o crescimento e os padrões de distribuição da biomassa nas plantas são regulados por meio do investimento em órgãos buscando minimizar efeitos de um fator limitante, sendo altamente responsáveis por diferenças interespecíficas (Poorter et al., 2011).

Para esta variável, na comunidade de plantas, independente das espécies como um todo, o tratamento nitrogenado superou as demais, onde estatisticamente a inoculação com os níveis mínimo e máximo de diversidade não tiveram efeitos superiores sobre este último, porém visualmente é notável a diferença no crescimento das plantas (Figura 14 e 19)

De forma geral, a espécie que apresentou maior acúmulo de partea aérea foi *H. chrysotrichus*, seguida das espécies, *C.vernalis B. pedicellaris, C. glandulosa* e, por último, apresentando um crescimento inferior, *P. contorta* e *P. gonoacantha (*Figura 20). A literatura relata que *Handroanthus crysotrichus* apresenta um crescimento rápido, consequentemente, um maior acúmulo de massa e é freqüentemente encontrada em formações secundárias, sendo importante em reflorestamentos mistos para a recuperação de áreas degradadas (Lorenzi, 2008).

Considerando a identidade das espécies nos desdobramentos estatísticos para os tratamentos analisados, *P.contorta*, *P.gonoacantha* não foram influenciadas na variação de seu crescimento por nenhum dos tratamentos. *C. vernalis* e *H. chrysotrichus* apresentaram maior acúmulo de massa seca no tratamento nitrogenado, não sendo influenciado pelos demais. Para *B. pedicellaris* a variação de crescimento foram iguais estatisticamente ao tratamento nitrogenado, à testemunha absoluta e ao tratamento com menor nível de riqueza de rizóbios inoculado (Nmín) (Figura 21).

Considerando-se todos os dados em conjunto, observa-se um aumento no acúmulo de biomassa nas comunidades que receberam N mineral para algumas espécies Porém, este crescimento foi acompanhado pela dominância de uma única espécie, o *H. chrysotrichus* em detrimento das demais espécies. Embora a comunidade com as plantas inoculadas não tenha acumulado tanta biomassa na parte aérea quando aquela que recebeu N mineral, o crescimento das espécies, como um todo, foi mais homogêneo, indicando um menor desbalanço entre as espécies vegetais. Isto é relevante, pois pode significar que em condições de campo, a inoculação possa garantir uma maior manutenção da diversidade vegetal por evitar que espécies mais responsivas à adubação mineral dominem os reflorestamentos. A condição de limitação de nutrientes, incluindo o N, é comum em ambientes naturais (Franco & Faria, 1997) e pode ser um fator contribuindo para menor dominância de espécies nesses ambientes. Corroborando essa interpretação, observou-se que pastagens infertéis tendem a ser mais botanicamente diversas que locais férteis (Smith, 1994). Estas pastagens também tendem a ter mais atividades nas comunidades microbianas no solo (Bardgett and Cook , 1998). Deste modo, pode ser que um efeito semelhante possa ocorrer em comunidades florestais, porém isto precisará ser melhor investigado. Mesmo assim é válido considerar que a raiz teve uma resposta positiva em relação a inoculação

Para as plantas individualizadas os tratamentos inoculados não foram significativos, uma vez que foram estatisticamente iguais ao tratamento sem inoculação e adição de nitrogênio. Para esta variável a adição do adubo nitrogenado deu uma resposta satisfatória em acúmulo de matéria na parte aérea.

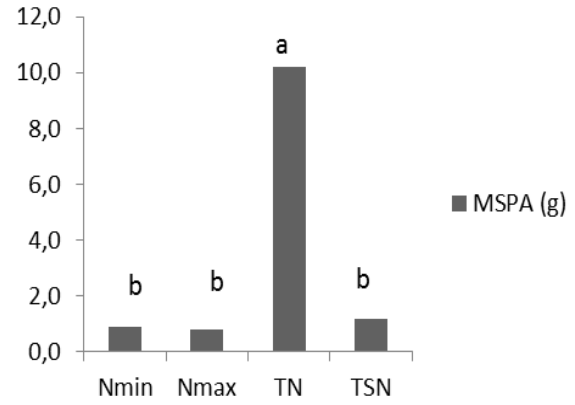


Figura 19. Acúmulo de massa da parte aérea seca para os tratamentos Nmáx, Nmín, TN e TSN para a comunidade de plantas**.**

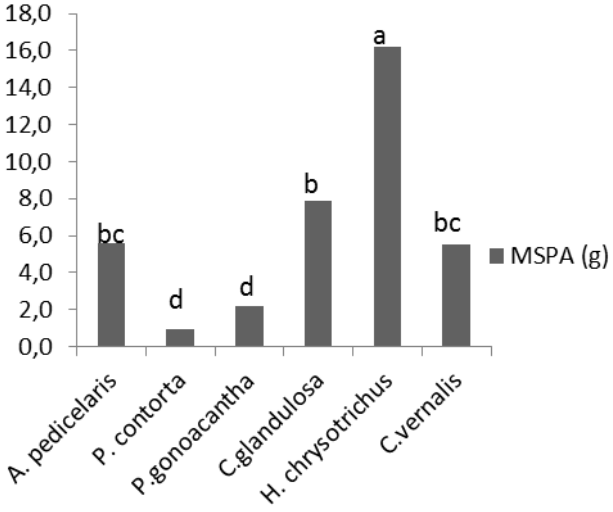


Figura 20. Acúmulo de massa seca da parte aérea para as espécies *A.pedicellaris*, *P.contorta*, *P. gonoacantha, C. glandulosa, H. chrysotrichus, C. vernalis.*

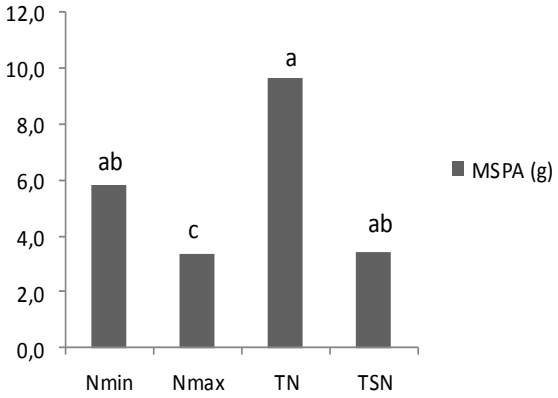


Figura 21. Acúmulo de massa seca da parte aerea para a especie *Albizia pedicellaris.*

4.3.1.3- Acúmulo de massa na raiz

Para o experimento de comunidade de plantas, o tratamento nitrogenado favoreceu o maior acúmulo de massa de raiz, seguidos pelos tratamentos Nmin e Nmáx que foram iguais estatisticamente e superiores ao tratamento sem inoculação e adição de nitrogênio, indicando um efeito positivo da riqueza de rizóbios, independente do nível de diversidade (Figura 23).

De forma geral a espécie que acumulou maior quantidade de raiz ao longo dos 6 meses foi *Handroanthus chrysotrichus* (Figura 24). Talvez, por esta característica, essa espécie é muito utilizada e importante em recuperação de áreas degradadas (Lorenzi, 2008). Esta espécie se destacou no experimento em comunidade pelo volume de raiz produzido (Figura 22).

Considerando a identidade das espécies nos desdobramentos estatísticos, *P.contorta* para os tratamentos inoculados (Nmin e Nmáx) e nitrogenados (que foram estatisticamente iguais) superaram àquele sem inoculação e adição de nitrogênio (Figura 25). Já C. *glandulosa* e *H. chrysotrichus* responderam melhor ao tratamento nitrogenado, que foi superior aos demais tratamentos. Ak espécie *C. glandulosa* não nodulou, mas, possivelmente, um efeito promotor de crescimento das bactérias inoculadas pode ter influenciado este efeito positivo no acúmulo de raiz. A espécie *Albizia pedicellaris* acumulou uma maior quantidade de raiz no tratamento nitrogenado que foi igual estatisticamente ao Nmin. Já o tratamento Nmáx não favoreceu este acúmulo para a espécie em questão. Para as espécies *Cupania vernalis, P. gonoacantha* os tratamentos não influenciaram a variável estudada.

No experimento onde as plantas foram individualizadas, o tratamento nitrogenado superou os demais para a maioria das espécies, indicando que quando as plantas coexistem o acúmulo de massa radicular é maior e o efeito da inoculação é evidente quando comparadas ao experimento de individualização de espécies.

Figura 22. (A) Planta de *H. chrysotrichus* e (B) Raiz de *H. chrysotrichus.*

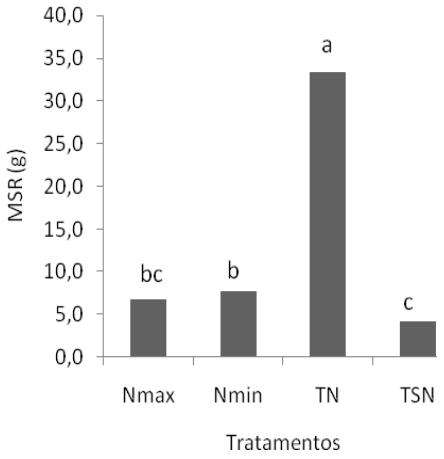


Figura 23. Acúmulo de matéria seca de raiz nos tratamentos Nmáx, Nmín, TN e TSN no experimento de comunidade de plantas.

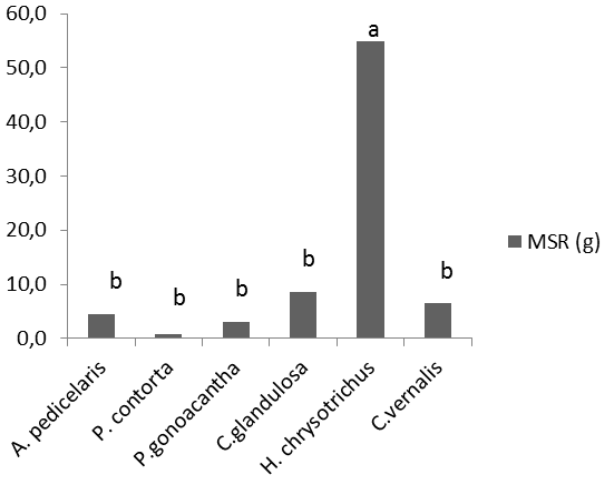


Figura 24. Acúmulo de matéria seca de raiz nas espécies *A. pedicellaris*, *P.contorta*, *P.gonoacantha*, *C. glandulosa*, *H. chrysotrichus*, *C. vernalis* no experimento de comunidade de plantas.

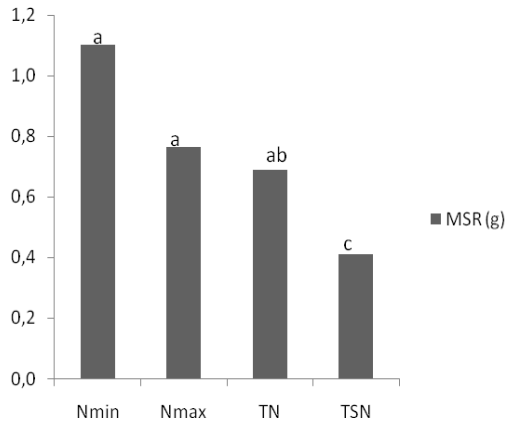


Figura 25. Acúmulo de massa seca de raiz para a espécie *Pseudopiptadenia contorta* nos tratamentos Nmin, Nmáx, TN e TSN.

4.3.2-1 Número de nódulos e peso de nódulos secos

No experimento de comunidade de plantas, tanto para número de nódulos quanto para peso dos nódulos secos não houve diferença significativa para os tratamentos Nmin e Nmáx, o que indica que a diversidade de rizóbios não influenciou a variável em questão.

No experimento das leguminosas individualizadas, que nesse caso nodularam (*B pedicellaris* e *P.gonoacantha)* observou-se que para *B. pedicellaris* os tratamentos inoculados, Nmín e Nmáx, não afetaram um maior número e peso dos nódulos secos. Para *P. gonoacantha* o peso de nódulos secos também não foi influenciado pela riqueza de rizóbios, mas o número de nódulos foi superior no nível mínimo de diversidade (Nmín) quando comparado ao nível máximo de diversidade (Figura 26). Esta variável que foi significativa não esta relacionada diretamente com a fixação de nitrogênio (Dobereiner, 1966).

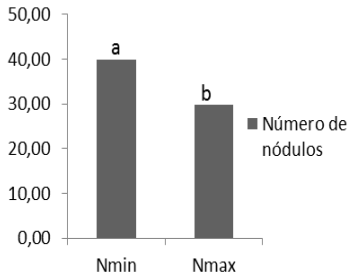


Figura 26. Número de nódulos da espécie *Piptadenia gonoacantha* nos tratamentos Nmín e Nmáx.

Tabela 8. Médias da altura, matéria da parte aérea seca (MSPA) e MSR (matéria de raiz seca considerando as espécies *A. pedicellaris, P.contorta, P.gonoacantha, C. glandulosa, H. chrysotrichus, C. vernalis* no experimento de comunidade de plantas, após 180 dias, em casa de vegetação, Seropédica, RJ. (continua)

Fonte de variação	Altura média	MPAS	MSR
Nmax	2,4 b	2,8 b	6,8 bc
Nmin	2,3 bc	3,6 b	7,7 b
TN	9,9 a	16,8 a	33,4 a
TSN	1,5 c	2,4 b	4,2 c
Medias para todas as espécies da comunidade de plantas			
A. pedicellaris	4,6 a	5,6 bc	4,4 c
P. contorta	1,1 b	1,0 d	0,7 d
P.gonoacantha	1,9 b	2,2 c	3,0 c
C.glandulosa	7,6 a	7,9 c	8,5 bc
H. chrysotrichus	7,7 a	16,2 a	55,0 a
C.vernalis	1,1 b	5,5 ab	6,5 a
Medias para cada espécie nos diferentes tratamentos da comunidade de plantas			
Albizia pedicellaris			
Nmin	2,8 b	5,8ab	4,2 ab
Nmax	3,0 b	3,3 c	3,6 c
TN	10,5 a	9,7 a	6,6 a
TSN	2,1 b	3,4 ab	3,2 ab
Pseudopiptadenia contorta			
Nmin	1,0 a	1,2 a	1,1 a
Nmax	1,5 a	0,9 a	0,8 a
TN	1,3 a	1,1 a	0,7 ab
TSN	0,5 a	0,6 a	0,4 c
Cupania vernalis			
Nmin	1,0 a	0,3 a	0,0 a
Nmax	1,3 a	0,4 a	0,0 a
TN	1,3 a	0,3 a	0,2 a
TSN	0,9 a	0,3 a	0,0 a
Piptadenia gonoacantha			
Nmin	2,8 a	2,9 a	4,1 a
Nmax	1,6 ab	1,7 a	2,2 a
TN	1,9 c	2,0 a	2,6 a

Tabela 8. Continuação

TSN	1,6 ab	2,1 a	3,1 a
Colubrina glandulosa			
Nmin	3,3 b	0,6 b	3,1 b
Nmax	3,8 b	1,2 b	3,2 b
TN	21,2 a	28,4 a	26,3 a
TSN	2,0 b	1,2 b	1,6 b
Handroanthus chrysotrichus			
Nmin	2,8 b	0,9 a	0,1 a
Nmax	3,3 b	1,0 a	0,1 a
TN	23,0 a	6,3 a	2,0 a
TSN	1,9 b	0,5 a	0,1 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna pertencem ao mesmo grupo, de acordo com o teste Tukey, a 10% de probabilidade.

Tabela 9. Número e peso seco de nódulos para as espécies *P.gonoacantha* e *B. pedicellaris* para o experimento de comunidade de plantas nos tratamentos Nmin e Nmax.

Fonte de variação	PSN	NN
Nmin	0,68 a	236,97 a
Nmax	0,38 a	241,32 a

Médias seguidas de mesma letra na coluna pertencem ao mesmo grupo, de acordo com o teste Tukey, a 10% de probabilidade.

Tabela 10. Médias da altura média, matéria da parte aérea seca (MSPA), MSR (matéria de raiz seca) para o experimento individual nos diferentes tratamentos considerando as espécies *A. pedicellaris, P.contorta, P.gonoacantha, C. glandulosa, H. chrysotrichus, C. vernalis*, numero e peso seco de nodulos (NN e PSN) para as espécies *P.gonoacantha* e *B. pedicellaris.*

Fonte de variação	**Altura média**	**MPAS**	**MSR**	**NN**	**PSN**
Albizia pedicellaris					
Nmin	3,5 b	0,9 b	0,7 b	84,5 a	0,1 a
Nmax	3,6 b	0,8 b	0,9 b	173,5 a	0,1 a
TN	20,7 a	10,2 a	4,5 a	-	-
TSN	2,7 b	1,2 b	1,3 ab	-	-
Cupania vernalis					
Nmin	1,32 ab	0,90 b	1,03 b	-	-
Nmax	1,38 b	0,70 b	0,70 b	-	-
TN	3,55 a	5,23 a	3,76 a	-	-
TSN	1,33 b	0,87 b	1,19 ab	-	-
Colubrina glandulosa					
Nmin	2,0 b	0,1 b	0,2 a	-	-
Nmax	2,1 b	0,2 b	0,4 a	-	-
TN	18,9 a	6,9 a	5,8 b	-	-
TSN	2,6 b	0,3 b	0,5 b	-	-
Pseudopiptadenia contorta					
Nmin	2,1 b	0,4 b	0,3 b	-	-
Nmax	5,2 b	0,8 b	0,5 b	-	-
TN	29,2 a	4,4 a	2,4 a	-	-
TSN	0,7 b	0,4 b	0,3 b	-	-
Piptadenia gonoacantha					
Nmin	3,13 a	0,59 a	0,59 a	47,8 a	0,12 a
Nmax	2,92 a	0,52 a	0,59 a	29,83 b	0,05 a
TN	35,38 a	5,22 a	2,71 a	-	-
TSN	0,88 a	0,30 a	0,36 a	-	-
Handroanthus crysotrichus					
Nmin	1,42 a	0,19 a	0,54 a	-	-
Nmax	2,12 a	0,41 a	1,40 a	-	-
TN	11,50 a	5,29 a	7,39 a	-	-
TSN	1,58 a	0,21 a	0,60 a	-	-

Médias seguidas de mesma letra na coluna pertencem ao mesmo grupo, de acordo com o teste Tukey, a 10% de probabilidade.

4.3.4 Avaliação do nitrogênio foliar

O teor de nitrogênio foliar das espécies vegetais estudadas, tanto em comunidade como no experimento individual, foram influenciados pelos tratamentos.

No experimento de comunidade, o teor de nitrogênio nos tratamentos inoculados para a maioria das espécies foi superior à testemunha nitrogenada (Tabela 14), mostrando que a presença das bactérias fixadoras de nitrogênio promoveu um aumento na quantidade deste nutriente nas plantas.

Para a espécie *Albizia pedicellaris*, o tratamento inoculado Nmin se igualou ao tratamento nitrogenado sendo estatisticamente diferente do tratamento que não recebeu o inóculo nem adição de nitrogênio. Para a espécie *Cupania vernalis*, ambos níveis de diversidade (Nmin e Nmáx) se igualaram a testemunha nitrogenada e foram superiores a testemunha absoluta. Para *Colubrina glandulosa*, *P. gonoacantha* e *H. crysotrichus* os tratamentos inoculados superaram os controles positivo e negativo. A espécie *P. contorta* foi a única em que o tratamento inoculado Nmin respondeu parcialmente ao aumento de nitrogênio em suas folhas. Possivelmente isto ocorreu pelo fato desta espécie não ter nodulado em nenhum dos níveis de diversidade de rizóbios.

O fato das espécies não leguminosas terem apresentarem um teor de nitrogênio foliar igual ou superior na testemunha nitrogenada pode ter ocorrido em função de processos de transferência de nitrogênio no sistema, uma vez que as leguminosas e não leguminosas no microcosmo estavam coexistindo nesta condição. Já para as leguminosas isto possivelmente ocorreu pelo processo de fixação biológica de nitrogênio realizado pelas bactérias inoculadas nos 2 níveis de diversidade. A espécie *P. contorta* além do fato de não ter nodulado nesta condição experimental e, assim, acumulado nitrogênio foliar, também não apresentou um indicativo de que a transferência do nitrogênio tivesse ocorrido como ocorreu para as outras espécies. Estudos mais detalhados precisariam ser feitos para uma avaliação criteriosa do comportamento desta espécie.

Cabe destacar que algumas espécies apresentaram maior teor de N foliar, incluindo uma espécie leguminosa (*P. gonoacantha*) e duas espécies não leguminosas (*C. glandulosa* e *H. chrysotrichus*), nas comunidades inoculadas com rizóbios. Esse maior teor de N nas folhas, incluindo não leguminosas, pode facilitar a entrada via serapilheira e N no sistema. O maior teor de N contribui para redução da relação C/N, tornando a degradação e disponibilidade de nutrientes mais fácil (Moreira & Siqueira, 2006). Esta é uma característica desejável em reflorestamentos em áreas degradadas, pois auxilia no enriquecimento do solo com matéria orgânica e nutrientes.

Van der heidjen et al. (2006) inoculando uma mistura de rizóbios em microcosmos de pastagens verificou o aumento da produtividade das plantas e do teor de nitrogênio quando comparados aos tratamentos sem rizóbios. A nível de microcosmo, a presença de bactérias fixadoras de nitrogênio promoveu a equitabilidade, a produtividade e a captura de nitrogênio (van der Heijden et al., 2006), em sistemas ricos em espécies leguminosas. Como as leguminosas incrementam a disponibilidade de nitrogênio no solo, possibilitando que plantas vizinhas se beneficiem do nitrogênio fixado (Martensoon et al., 1998), sugere-se que a presença de um diverso grupo de bactérias nodulíferas seja requerida para que estas plantas cresçam e coexistam.

Tabela 11. Teor de nitrogênio foliar para as espécies *A. pedicellaris, C. vernalis, C. glandulosa, P. contorta, P. gonoacantha, H. crysotrichus* no experimento comunidade.

Fonte de variação	Teor de nitrogênio foliar (%)
Albizia pedicellaris	
Nmin	1,10 a
Nmax	0,94 ab
TN	1,25 a
TSN	0,74 b
Cupania vernalis	
Nmin	0,72 a
Nmax	0,74 a
TN	0,94 a
TSN	0,50 b
Colubrina glandulosa	
Nmin	0,64 a
Nmax	0,62 a
TN	0,52 b
TSN	0,40 c
Pseudopiptadenia contorta	
Nmin	1,08 ab
Nmax	0,88 bc
TN	1,21 a
TSN	0,77 d
Piptadenia gonoacantha	
Nmin	1,78 a
Nmax	1,73 a
TN	1,45 b
TSN	1,38 b
Handroanthus chrysotrichus	
Nmin	1,08 a
Nmax	1,06 a
TN	0,89 b
TSN	0,83 b

Médias seguidas de mesma letra na coluna pertencem ao mesmo grupo, de acordo com o teste Tukey, a 10% de probabilidade

No experimento individual, foi observado um comportamento diferente nas espécies quanto ao teor de nitrogênio. Para *A. pedicellaris*, *C.vernalis* e *H. crysotrichus* a testemunha nitrogenada superou os demais tratamentos, mas ainda assim os tratamentos inoculados mostraram-se melhores que a testemunha absoluta.

Para as espécies *C. glandulosa, P. contorta, P. gonoacantha* a inoculação de bactérias do tratamento Nmín respondeu com um teor de nitrogênio significativo comparado a testemunha absoluta.

Todas estas informações sustentam o ponto de vista que as interações planta micro-organismos são parte integral dos ecossistemas (Zak et al., 2003) e que a redução de biodiversidade dos microssimbiontes observada em áreas de floresta atlântica pode levar a um decréscimo na biodiversidade de plantas e na produtividade dos ecossistemas. Conhecer a diversidade abaixo e acima do solo é um fator crucial para entender a dinâmica de um ecossistema equilibrado.

Tabela 12. Teor de nitrogênio foliar para as espécies *A. pedicellaris, C. vernalis, C. glandulosa, P. contorta, P. gonoacantha, H. crysotrichus* no experimento de individual de plantas.

Fonte de variação	Teor de nitrogênio foliar (%)
Albizia pedicellaris	
Nmin	1,01 b
Nmax	0,82 bc
TN	1,97 a
TSN	0,72 c
Cupania vernalis	
Nmin	0,96 b
Nmax	0,94 b
TN	1,83 a
TSN	0,92 b
Colubrina glandulosa	
Nmin	1,06 ab
Nmax	0,96 b
TN	1,19 a
TSN	0,98 b
Pseudopiptadenia contorta	
Nmin	1,39 ab
Nmax	1,22 c
TN	1,95 a
TSN	1,31 c
Piptadenia gonoacantha	
Nmin	1,85 ab
Nmax	1,69 b
TN	2,20 a
TSN	1,62 b
Handroanthus crysotrichus	
Nmin	1,42 b
Nmax	1,13 b
TN	2,64 a
TSN	1,53 b

Médias seguidas de mesma letra na coluna pertencem ao mesmo grupo, de acordo com o teste Tukey, a 10% de probabilidade

4.3.4- Avaliação da ocupação nodular

A espécie *Pseudopiptadenia contorta* não nodulou em nenhum tratamento e repetição. Já para *Albizia pedicellaris* e *Piptadenia gonoacantha* nodularam nos dois tratamentos. De forma geral, as estirpes do presente trabalho se mostraram mais competitivas para ocupar os nódulos no tratamento Nmáx.

Para a ocupação nodular utilizando a técnica *BOX-PCR, (*Figuras 27 e 28) a sua avaliação foi bem sucedida em 98 nódulos do experimento de comunidade de plantas e para 50 nódulos do experimento individualizado. O sucesso não atingido para todos os nódulos decorreu da perda por contaminação das bactérias obtidas a partir dos nódulos e outros pela amplificação de baixa qualidade na *BOX-PCR.* A maioria deles foi provenientes do tratamento Nmáx tanto para *A. pedicellaris* quanto *P. gonoacantha.*

Analisando as tabelas 16 e figura 27, referentes à avaliação da ocupação dos nódulos pelas estirpes inoculadas na comunidade de plantas, observa-se que a maioria dos nódulos de *B. pedicellaris* foram ocupados pela BR6815, filogeneticamente identificado como *Bradyrhizobium sp.*, seguida da bactéria PC7 (27,4%) identificada como *Burkholderia sp.* Em menores percentagens os nódulos para esta espécie foram ocupados pelas estirpes PC3 (3,9%) e SMF616-1 (14,9%) idenficadas como *Burkholderia sp.* e *Rhizobium sp*, respectivamente. As estirpes BR4802, BR4812, BR6816 e PC5 não ocuparam os nódulos de *B. pedicellaris.*

Para *P. gonoacantha*, observa-se que a ocupação *nodular* também ocorreu em maior percentagem pela estirpe BR6815 (*Bradrhizobium sp.)* seguidas das estirpes SMF616-1 (*Rhizobium sp.),* PC3 (*Burkholderia sp.)* e BR6816 (*Burkholderia sp.).* A BR4802 que é

recomendada como inoculante para esta espécie ocupou em baixa percentagem os nódulos desta planta. Possivelmente houve uma maior competição da estirpe BR6815 pelo sítio de infeção da espécie em relação a BR4802. Esta é uma observação relevante, já que espécies do grupo *Piptadenia* foram relatadas como tendo alta especificidade para β-proteobactérias (Bournaud et al., 2013). Apesar dessa preferência, o *Bradyrhizobium*, nas condições experimentais deste trabalho, foi o que ocupou mais nódulos de *P. gonoacantha*.

Observa-se que algumas das estirpes inoculadas foram altamente competitivas, induzindo à formação de uma grande proporção dos nódulos avaliados. O fato delas serem mais competitivas não significa que elas sejam as mais eficientes, e isto pode ter contribuído para o menor desenvolvimento das plantas inoculadas, tanto no tratamento com maior ou menor diversidade. Pelo menos no caso da *P. gonoacantha*, sabe-se que essa espécie nodula preferencialmente com β-proteobactérias, e o fato de *Bradyrhizobium* ter sido mais competitivo na condição do experimento de comunidades, pode ter contribuído para uma menor eficiência da simbiose. Portanto, a especificidade hospedeira e as características de competição e eficiência tornam a avaliação da contribuição da diversidade de rizóbios muito mais complexa.

Tabela 13. Percentagem de ocupação nodular pelas estirpes inoculadas no experimento de comunidade de plantas para as espécies *A. pedicellaris, P. gonoacantha.*

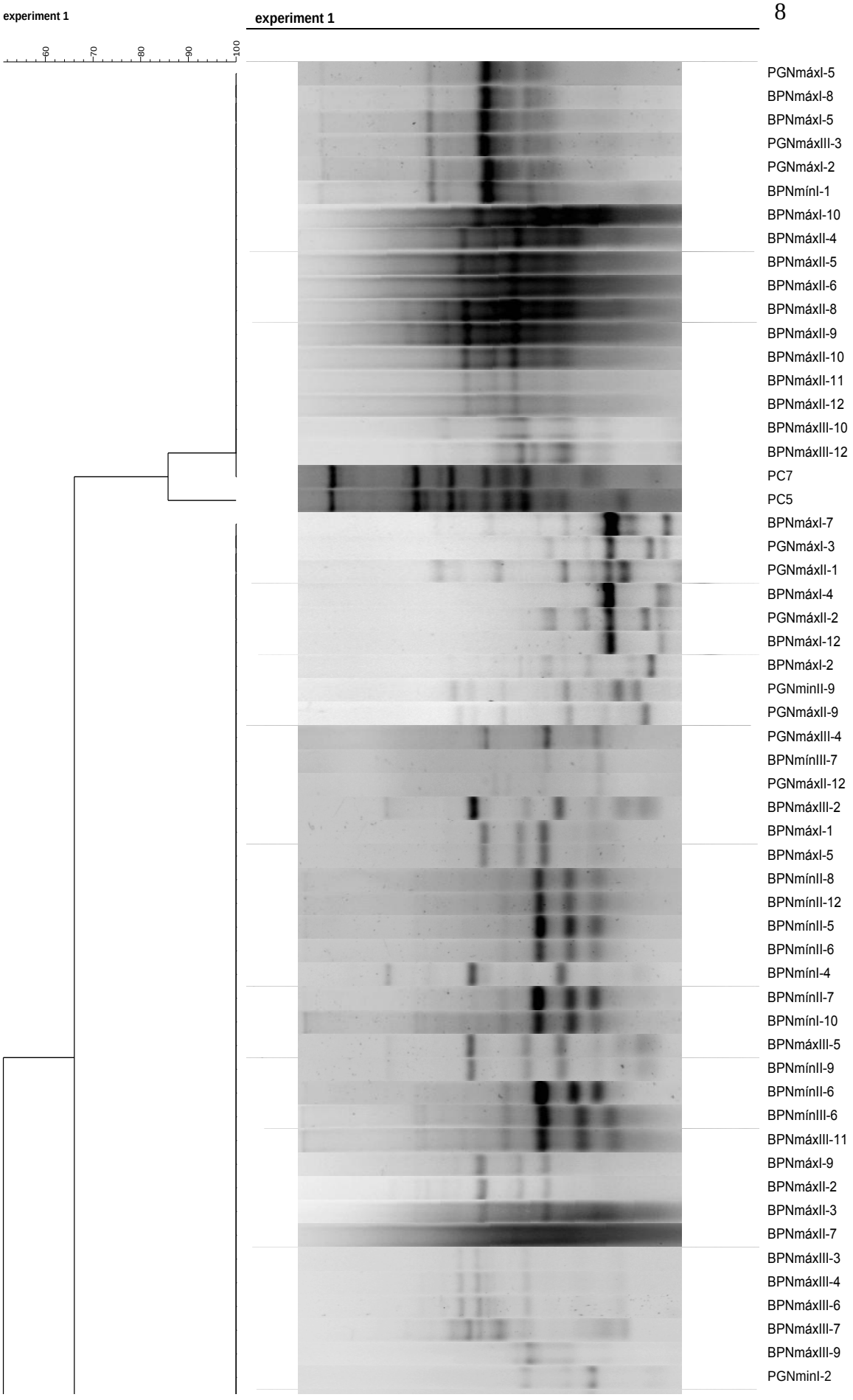
Estirpes inoculadas	**Taxonomia**	**Percentagem da ocupação nodular em *B. pedicellaris***	**Percentagem da ocupação nodular em *P.gonoacantha***
BR4802	*Burkholderia phymatum*		
BR4812	*Burkholderia tuberum*		4,2%
BR4826	*Mesorhizobium sp.,*		8,5%
BR6815	*Bradyrhizobium sp.*	62,7%	38,3%
BR6816	*Burkholderia sp.*		12,7%
SMF 616-1	*Rhizobium sp*	5,9%	14,9%
PC-7	*Burkholderia sp.*	27,4%	6,4%
PC-3	*Burkholderia sp.*	3,9%	14,9%
PC-5	*Burkholderia sp.*		

*A ausência de valores percentuais se refere a não ocupação da bactéria referente à inoculação

Tabela 14. Percentagem de ocupação nodular pelas estirpes inoculadas no experimento individual de plantas para as espécies *B. pedicellaris, P. gonoacantha.*

Estirpes inoculadas	**Taxonomia**	**Percentagem da ocupação nodular em *B. pedicellaris***	**Percentagem da ocupação nodular em *P.gonoacantha***
BR4802	*Burkholderia phymatum*		
BR4812	*Burkholderia tuberum*	27,6%	14,3%
BR4826	*Mesorhizobium sp.,*	62,06%	14,3%
BR6815	*Bradyrhizobium sp.*	3,4%	23,8%
BR6816	*Burkholderia sp.*		4,7%
SMF 616-1	*Rhizobium sp*	6,9%	42,9%
PC-7	*Burkholderia sp.*		
PC-3	*Burkholderia sp.*		
PC-5	*Burkholderia sp.*		

*A ausência de valores percentuais se refere a não ocupação da bactéria referente à inoculação.


experiment 1
experiment 1
60
70
80
90
100
PGNmáxI-5
BPNmáxI-8
BPNmáxI-5
PGNmáxIII-3
PGNmáxI-2
BPNmínI-1
BPNmáxI-10
BPNmáxII-4
BPNmáxII-5
BPNmáxII-6
BPNmáxII-8
BPNmáxII-9
BPNmáxII-10
BPNmáxII-11
BPNmáxII-12
BPNmáxIII-10
BPNmáxIII-12
PC7
PC5
BPNmáxI-7
PGNmáxI-3
PGNmáxII-1
BPNmáxI-4
PGNmáxII-2
BPNmáxI-12
BPNmáxI-2
PGNminII-9
PGNmáxII-9
PGNmáxIII-4
BPNmínIII-7
PGNmáxII-12
BPNmáxIII-2
BPNmáxI-1
BPNmáxI-5
BPNmínII-8
BPNmínII-12
BPNmínII-5
BPNmínII-6
BPNmínI-4
BPNmínII-7
BPNmínI-10
BPNmáxIII-5
BPNmínII-9
BPNmínII-6
BPNmínIII-6
BPNmáxIII-11
BPNmáxI-9
BPNmáxII-2
BPNmáxII-3
BPNmáxII-7
BPNmáxIII-3
BPNmáxIII-4
BPNmáxIII-6
BPNmáxIII-7
BPNmáxIII-9
PGNminI-2

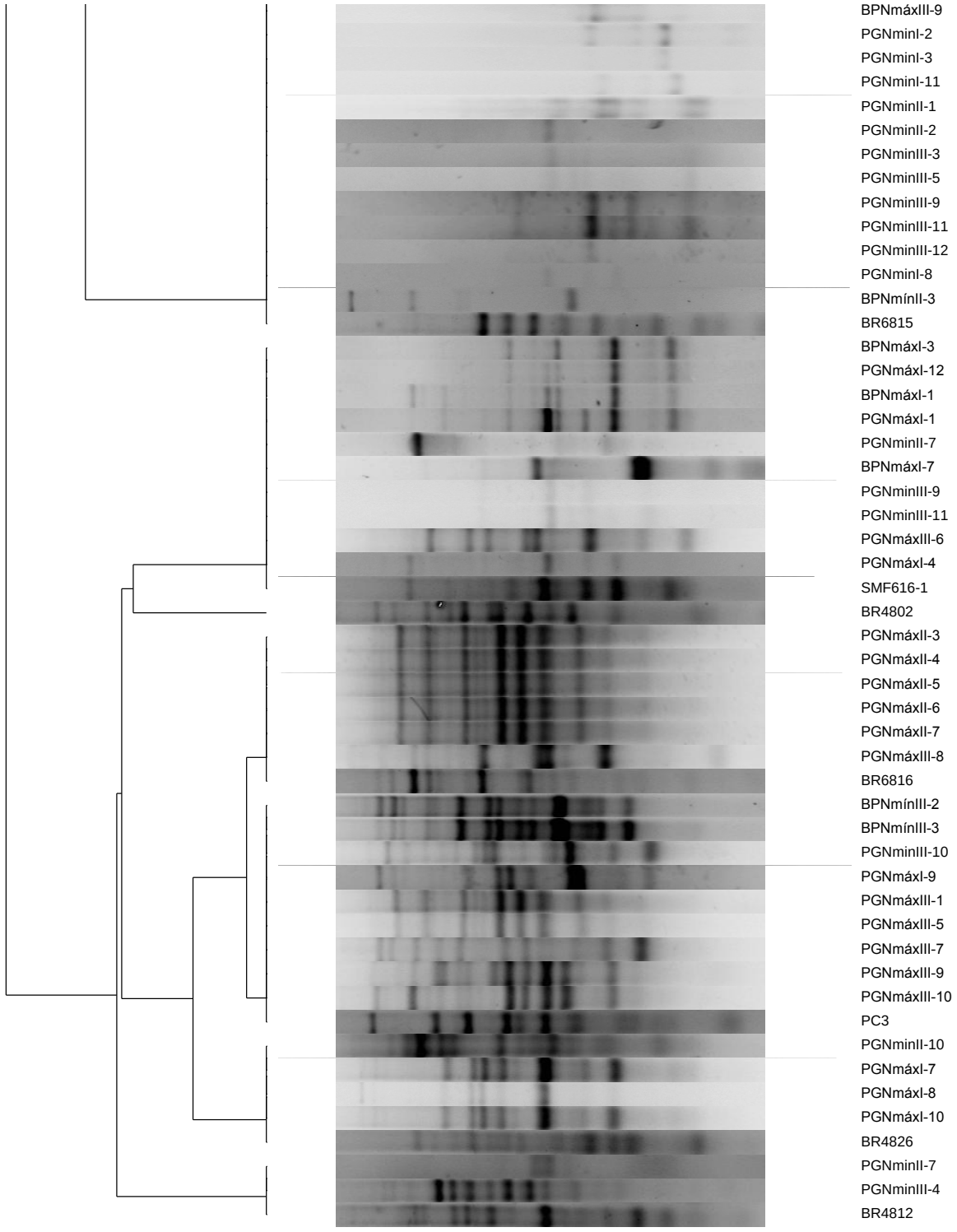


Figura 27. Dendrograma de similaridade genética construído com programa Bionumerics utilizando o método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean) baseado no índice de similaridade de Jaccard , mostrando os agrupamentos formados entre os isolados de *Albizia pedicellaris*, *Piptadenia gonoacantha* na comunidade de plantas analisados pela técnica de BOX-PCR e as estirpes inoculadas.

Conforme mostram as tabela 17 e Figura 28 referentes à avaliação da ocupação dos nódulos pelas estirpes inoculadas no experimento individual de plantas observa-se que a maioria dos nódulos de *A. pedicellaris* foram ocupados pela BR4826 identificada como *Mesorhizobium sp.* e, em menor proporção, por *Bradrhizobium sp.*

Para a espécie *P. gonoacantha* a estirpe que se destacou na ocupação nodular foi SMF616-1 identificada como *Rhizobium.* Em percentagens similares, os nódulos desta espécie foram ocupados pelas estirpes BR6815, BR4812, BR4826, identificadas como *Bradrhizobium sp., Burkholderia tuberum* e *Mersorhizobium sp.*, respectivamente. A estirpe BR6816, *Burkholderia sp.* ocupou a minoria dos nódulos desta espécie.

Tabela 15. Percentagem de ocupação nodular pelas estirpes inoculadas no experimento individual de plantas para as espécies *A. pedicellaris, P. gonoacantha.*

Estirpes inoculadas	**Taxonomia**	**Percentagem da ocupação nodular em *B. pedicellaris***	**Percentagem da ocupação nodular em *P.gonoacantha***
BR4802	*Burkholderia phymatum*		
BR4812	*Burkholderia tuberum*	27,6%	14,3%
BR4826	*Mesorhizobium sp.,*	62,06%	14,3%
BR6815	*Bradyrhizobium sp.*	3,4%	23,8%
BR6816	*Burkholderia sp.*		4,7%
SMF 616-1	*Rhizobium sp*	6,9%	42,9%
PC-7	*Burkholderia sp.*		
PC-3	*Burkholderia sp.*		
PC-5	*Burkholderia sp.*		

*A ausência de valores percentuais se refere a não ocupação da bactéria referente à inoculação.

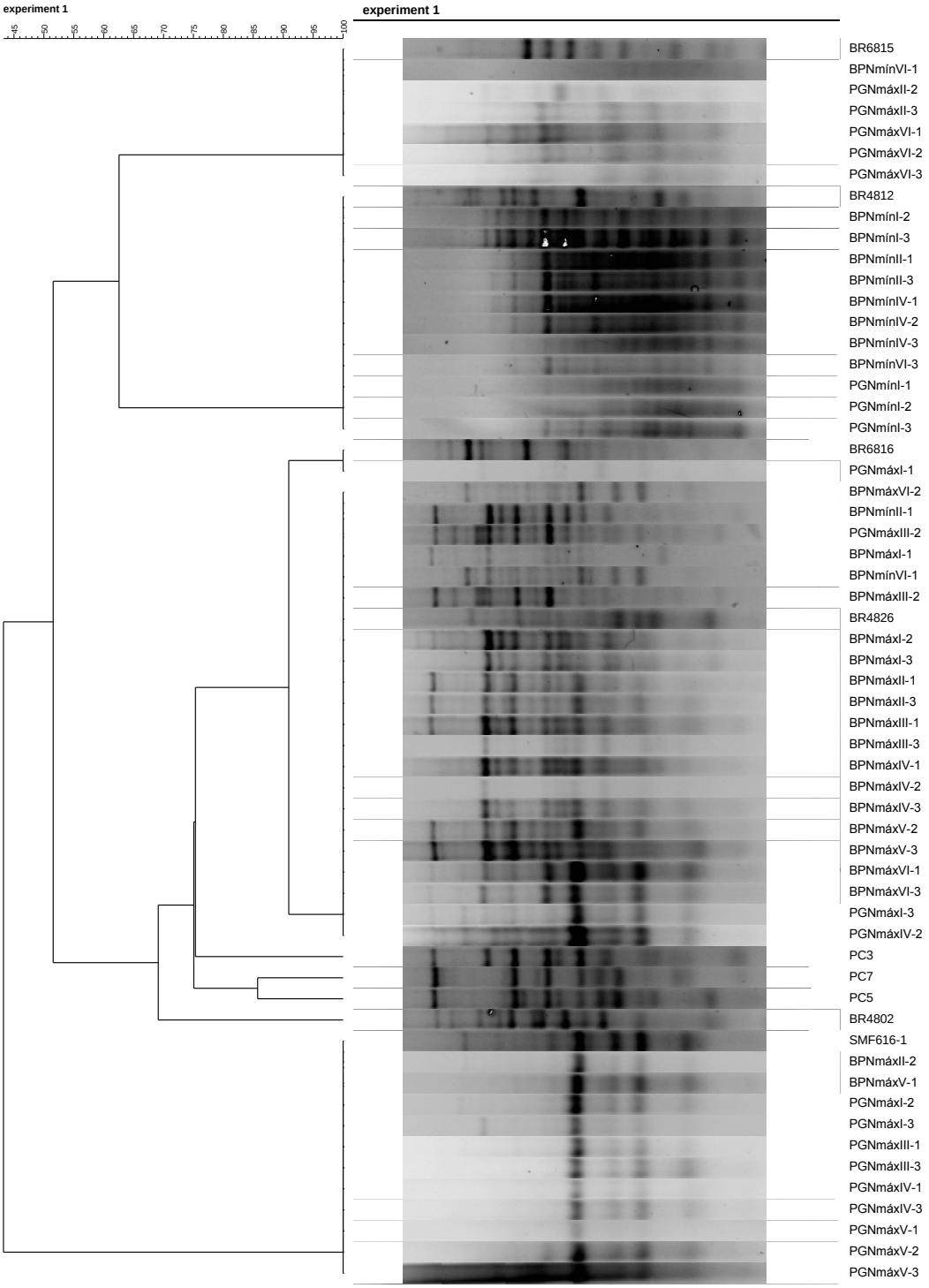


Figura 28. Dendrograma de similaridade genética construído com programa Bionumerics utilizando o método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean) baseado no índice de similaridade de Jaccard , mostrando os agrupamentos formados entre os isolados de *Albizia pedicellaris, Piptadenia gonoacantha* no experimento individual analisados pela técnica de BOX-PCR.

5 CONCLUSÕES

A caracterização morfofisiológica e molecular demonstraram uma considerável diversidade entre os isolados, incluindo alguns com potencial para descrição de novas espécies;

A presença de N mineral promoveu maior acúmulo de biomassa da comunidade, porém esta se deveu ao crescimento exagerado de apenas uma espécie;

A inoculação promoveu uma maior equitabilidade no crescimento das espécies e uma maior porcentagem de N foliar de espécies leguminosas (*P. gonoacantha*) e não leguminosas (*C. glandulosa* e *H. chrysotrichus*);

Os níveis de diversidade de bactérias fixadoras de nitrogênio para algumas espécies de leguminosas causou um efeito positivo na altura média, acúmulo de massa de raiz e teor de nitrogênio foliar.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARSSEN, W. L. Ecological combining ability and competitive combining ability in plants: towards a general evolutionary theory of coexistence in systems of competition. **Am. Nat**. 122, 707–731, 1983.

ANGUS A.A, Hirsch AM. Insights into the history of the legume-betaproteobacterial symbiosis. **Molecular Ecology**. 19:28-30, 2010.

AOKY, S.; ITO, M.; I. , W. From β- to α-proteobacteria: the origin and evolution of rhizobial nodulation genes *nodIJ***. MBE Advance Access,** published September 11, 2013.

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

Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros. Brasília: **MMA/SBF**, 2002. 404 p.

AZEVEDO, J.L. Biodiversidade microbiana e potencial biotecnológico. In: **Ecologia Microbiana**. Eds: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. Jaguariúna: Embrapa- CNPMA, 1998.488p.

BALVANERA, P.; PFISTERER, A.B.; BUCHMANN, N.; HE, J.S.; NAKASHIZUKA, T.; RAFFAELLI, D.; SCHMID, B. Quantifying the evidence for biodiversity effects on ecosystem functioning and services. **Ecology Letters**, 9:1146–1156, 2006.

BARCELLOS, F.G.; HUNGRIA, M. Técnicas moleculares aplicadas ao estudo de diversidade e à identificação de bactérias e fungos de interesse agrícola. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; OLIVEIRA, J.P.; SANTOS, C.E.R.S.; STAMFORD, N.P. (Ed.). **Biotecnologia aplicada à agricultura**. Brasília, DF. Embrapa Informação Tecnológica, Recife, PE: Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA), p.191-221, 2010.

BEVER, J.D.; BROADHURST, L.M.; THRALL, P. H. Microbial phylotype composition and diversity predicts plant productivity and plant–soil feedbacks**. Ecology Letters**, 16: 167–174, 2013.

BOURNAUD, C.; de FARIA, S.M.; dos SANTOS, J.M.F.; TISSEYRE, P; SILVA,M.; CHAINTREUIL, C.GROSS, E.; JAMES, E.K.; PRIN, Y.; MOULIN, L. Burkholderia Species Are the Most Common and Preferred Nodulating Symbionts of the Piptadenia Group (Tribe Mimoseae). **Plos One**, v. 8, 1-13, 2013.

BARDGETT, R.D., COOK, R. Soil animal diversity and ecosystem maintenance in agricultural grasslands**. Applied Soil Ecology (in press),** 1998.

BÉCARD,G & FORTIN, J.A. Early events of vesicular-arbuscular mycorriza formation on Ri T-DNA transformed roots. **New Phytologist**, Oxford, v.108, p. 211-218, 1998.

BEGON, M.; HARPER, J.L.; TOWNSEND, C.R. Ecology: individuals, populations and communities. 3 ed. Oxford, Blewell Science. 1996. 1068p.

BEVER, J. D.; WESTOVER, K. M. ANTONOVICS, J. Incorporating the soil community into plant population dynamics: the utility of the feedback Approach. **Journal Ecology**. **85**, 561, 1997.

BINDE, D.R.; MENNA, P.; BANGEL, E.V.; BARCELLOS, F.G.; HUNGRIA, M. rep-PCR fingerprinting and taxonomy based on the sequencing of the 16S rRNA gene of fifty-four elite commercial rhizobial strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.83, 897-908. 2009.

BONKOWSKI, M. & ROY, J. 2005. Soil microbial diversity and soil functioning affect competition among grasses in experimental microcosms. **Oecologia**, 143, 232–240.

BONTEMPS C, ELLIOTT GN, SIMO MF, et al. (12 co-authors).. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. **Molecular Ecology**. 19:44-52, 2010.

BRUIJN, F.J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied Environmental Microbiology** 58: 2180-2187, 1992.

CARDOSO, J.D., HUNGRIA, M. Polyphasic approach for the characterization of rhizobial symbionts effective in fixing N2 with common bean (Phaseolus vulgaris L.) **Appl Microbiol Biotechnol** ,93:2035–2049, 2012.

CHEN, W. X. et al. *Rasltonia taiwanensis* sp. nov. isolated from nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.1729-1735, 2001.

CLAY, K. AND J. HOLAH. Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. **Science** 285:1742–1744, 1999.

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

COUTINHO, H.L.C., OLIVEIRA, V.M., MANFIO, G.P.; ROSADO, A.S. Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodologicall innovations. **Anais Academia Brasileira de Ciências**. v71: 491- 503, 1999.

COWAN, S.T. **A dictionary of microbial taxonomic usage**. Edinburgh: Oliver & Boyd, 118p, 1968.

DANIELS, B.A.; SKIPPPER, H.D. Methods fot the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. In: SHENK, N.C. (Ed.). Methods and principles of mycorrhizal research. St. Paul: **The American Phytopathological Society**, p.29-35, 1982.

DESHWAL, V.K., CHAUBEY, A. Isolation and Characterization of *Rhizobium leguminosarum* from Root nodule of *Pisum sativum* L. **Journal of Academia and Industrial Research (JAIR)** Volume 2, Issue 8 January 2014.

DÖBEREINER, J. Evaluation of nitrogen fixation in legumes by the regression of total plant nitrogen with nodule weight. **Nature**, 210:850-852, 1966.

EISENHAUER, N.; BEBLER, H.; ENGELS, C.; GLEIXNER,G.; HABEKOST,M.; MILCU, A.; PARTSCH, S.; SABAIS, A.C.W.; SCHERBER, C.; STEINBEISS, S.; WEIGELT, A.; WEISSER, W.W.; SCHEU, S. Plant diversity effects on soil microorganisms support the singular hypothesis. **Ecology**, 91(2), 2010, pp. 485–496.

EKSCHMITT, K., GRIFFITHS, B.S. Soil biodiversity and its implications for ecosystems functioning in a heterogeneous and variable environment. **Apllied Soil Ecology**, v.10, 201-215, 1998.

ESTRADA-LUNA, A.A, DAVIES JR., F.T., EGILLA, J.N. Mycorrhizal fungi enhacement of growth and gas exchange of micropropagated guava plantlets (*Psidium guajava)* during ex vitro acclimatization and plant establishment. **Mycorrhiza**, 10,1-8, 2000.

FARIA, S. M.; LIMA, H. C.; OLIVARES, F. L.; MELO, R. B.; XAVIER, R. P. Nodulação em espécies florestais: especificidade hospedeira e implicações na sistemática de Leguminosae. 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/UFLA/DCS, 1999. p.667-686.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows 4. 0. In: Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, 45., 2000, São Carlos. **Programas e resumos...** São Carlos, SP: UFSCAR, 2000. p. 255-258.

FRANCO, A.A.; de FARIA, S.M. The contribution of N_2- fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. **Soil Biology Biochemestry**, v.29, 897-903, 1997.

FRASER, L. H. The use of microcosms as an experimental approach to understanding terrestrial ecosystem functioning. **Adv. Space Res**. Vol. 24, No. 3, pp.2 91-3021, 1999.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology:** with special reference to the microorganisms of the soil. New York: McGraw-Hill, 1928. 145p.

FUNGARO, M.H.P.; VIEIRA, M.L.C. Aplicações de PCR em ecologia molecular. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Eds.). **Ecologia microbiana.** Jaguariuna: Embrapa-CNPMA, 205-228, 1998.

GAUNT, M.W.; TURNER, S.L.; RIGOTTIER-GOIS, L; LLOYD-MACGILP, S.A.; YOUNG, J.P. Phylogenies of atpD and recA support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. Washington, D.C., V.56, 217-229, 2006.

GERDEMANN, J. N., NICOLSON, T. H. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from spyl by wet-sieving and decanting. **Transactions of British Mycorrhizal Society**. Cambridge, v. 46, p.235-244, 1963.

GEVERS, D., COHAN, F.M., LAWRENCE, J.G., SPRATT, B.G., COENYE, T., FEIL, E.J., STACKEBRANDT, E., VAN DE PEER, Y., VANDAMME, P., THOMPSON, F.L., SWINGS, J., Opinion: re-evaluating prokaryotic species. **Nature Review Microbiology** 3, 733 e 739, 2005.

GIOVANNETTI, M. & MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist,** v.84, p.489-500, 1980.

GRAHAM, P.H. Identification and classification os root nodule bactéria. In: NUTMAN, P.S. (ed) **Simbiotic nitrogen fixation in plants**. Cambridge:Cambridge University, 1976

GRIME, J. P., MACKEY, J. M. L., HILLIER, S. H., AND READ, D. J. Floristic diversity in a model system using experimental microcosms. **Nature,** 328,420-422, 1987.

GURTLER, V.; MAYALL, B.C. Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates**. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51**, 3–16, 2001.

HAMILTON, E. W. ;. FRANK, D. W**.** Can plants stimulate soil microbes and their own nutrient supply? Evidence from a grazing tolerant grass**. Ecology,** 82, 2397-2402, 2001.

HASSAN, M.M, EISSA, R.A. Molecular Characterization of Salt Tolerant Rhizobial Strains Induced by Gamma Rays Using RAPD Markers. **New York Science Journal**,V 6(4), 2013.

HECTOR, A.; SCHMID, C.; BEIERKUHNLEIN, M.C.; CALDEIRA, M.C.; DIEMER, M.; DIMITRAKOPOULOS, J.A.; FREITAS, H; GILLER, P.S et al. Plant Diversity and Productivity Experiments in European Grasslands**. Science,** VOL 286 5, 1123-1127, 1999.

HUGENHOLTZ, P. & PACE, N.R. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach. **TIBTECH** 14: 190- 197, 1996.

HUNGRIA, M., ANDRADE, D.S., CHUEIRE, L.M.O., PROBANZA, A., GUTIERREZ-MANERO,F.J., MEGIAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (Phaseolus vulgaris L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology & Biochemistry** 32, 1515±1528, 2000.

HUNGRIA, M. Coleta de nódulos e isolamento de rizóbio. In: Hungria, M.; Araújo, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa, 1994.

HUNGRIA, M.; CAMPOS, R.J.; MENDES, I.C. Benefits of inoculation of the common bean (Phaseolus vulgaris) crop with efficient and competitive Rhizobium tropici strains. **Biol Fertil Soils**, 39:88–93, 2003.

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

IGANCI, J.R.V. 2012. **Albizia** *in* **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do

Rio de Janeiro. (*http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB082618*). Acesso em 21 de jan. 2013.

JACCARD, P. The distribution of flora in the alpine one. **New Phytologist**, v.11, p.37–50, 1912.

Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>. Acesso em: 20 Mai. 2013.

JESUS, E.C., SCHIAVO, J.A., de FARIA, S.M. Dependência de micorrizas para a nodulação de leguminosas arbóreas tropicais. **Revista Arvore**, v.29, n.4, p.545-552, 2005.

JESUS, E.C.; MOREIRA, F.M.S. Métodos Moleculares para o Estudo de Comunidades de Bactérias do Solo. In: **Biodiversidade do Solo em Ecossistemas Brasileiros**. MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O.; BRUSSAARD, L. Lavras- MG, Ed. UFLA, 2008, 768 p.

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

KLIRONOMOS, J.N. Feedback with soil biota contributes to plant rarity and invasiveness in communities. **Nature,** v. 417, n. 2, p. 67-70, May 2002.

KLIRONOMOS, J.N.; MCCUNE, J.; HART, M.; NEVILLE, J. The influence of arbuscular mycorrhizae on the relationship between plant diversity and productivity. **Ecology Letters**, 3:137– 141, 2000.

Koske, R. E & Gemma, J. N. 1989. A modified procedure for staining roots to detect VA mycorrhizas**. Mycological Research** 92**:** 488-505, 1989.

LAPAGE, S. P., SNEATH, P. H. A., LESSEL, E. F., SKERMAN, V. B. D., SEELIGER, H. P. R. & CLARK, W. A. (editors) (1992**). International Code of Nomenclature of Bacteria** (1990 Revision). Bacterio- logical Code. Washington, DC: American Society for Micro-biology**.**

LEVIN, S.A. Ecosystems and the biosphere as complex adaptive systems. **Ecosystems**, 1, 431-436, 1998.

LEWIS, G. P.; Schrire, B.; Mackinder, B. & Lock, M. (eds.). Legumes of the world. Royal Botanic Gardens, Kew, 577p. 2005.

LOREAU, M. Biodiversity and ecosystem functioning: recent theoretical. **Oikos**, 91: 3–17. Copenhagen, 2000.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa-SP: Instituto Plantarum, 2008.

MAB – Unesco. 2001. www.unesco.org.uy

MAGURRAN, A. E., 2004, **Measuring biological diversity**, Blackwell Publishing: Oxford, UK.256 p

MAHERALI, H. & KLIRONOMOS, J.N. Influence of phylogeny on fungal community assembly and ecosystem functioning. **Science**, 316, 1746–1748, 2007.

MAIDEN MCJ, BYGRAVES JA, FEIL ET AL. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences,** 95: 3140–3145, 1998.

MAYNAUD G, WILLEMS A, SOUSSOU S, VIDAL C, MAURE´ L, et al. Molecular and phenotypic characterization of strains nodulating Anthyllis vulneraria in mine tailings, and proposal of Aminobacter anthyllidis sp. nov., the first definition of Aminobacter as legume-nodulating bacteria**. Systematic and Applied Microbiology** 35: 65–72, 2012.

MARON, J.L.; MARLER, M.; KLIRONOMOS, J.N.;CLEVELAND, C.C .Soil fungal pathogens and the relationship between plant diversity and productivity. **Ecology Letters**, 14:36–41, 2011.

MARTENSSON A.M.; RYDBERG I.; VESTBERG M. Potential to improve transfer of N in intercropped systems by optimizing host-endophyte combinations. **Plant Soil,** 205: 57–66, 1998

MIKI ,T.; USHIDO, M.; FUKUI, S.; KONDOH, M. Functional diversity of microbial decomposers facilitates plant coexistence in a plant-microbe-soil feedback model. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA 107:14251–14256, 2010.

MISHRA, R.P.N., TISSEYRE, P., MELKONIAN, R., CHENTREUIL, C., MICHE, L., KLONOWSKA, A., GONZALEZ, S., BENA, G., LAGUERRE, G., MOULIN, L. Genetic diversity of Mimosa pudica rhizobial symbionts in soils of French Guiana: investigating the origin and diversity of *Burkholderia phymatum* and other beta-rhizobia **FEMS Microbiology Ecolology,** 487–503, 2012.

MITTERMEIER, R.A.; FONSECA, G.A.B.; RYLANDS, A.B.; MITTERMEIER, C.G. Atlantic Forest. In: **Hotspots: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions**. CEMEX S.A. México, 137-144, 1999.

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

MOREIRA, F. M. S. ; CRUZ, L. M. ; FARIA, S. M. ; MARSH, Terence ; MARTINEZ-ROMERO, E. ; PEDROSA, F. O. ; R.M.Pitard ; YOUNG, J. P. W. ; GONÇALVES, M. . Azorhizobium johannae sp.nov. microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers.. **In: XXII Latin American Conference of Rhizobiology & I Reunião Nacional de Fixação Biológica de Nitrogênio-Programme and abstracts, 2004, Miguel Pereira. XXII Latin American Conference of Rhizobiology & I Reunião Nacional de Fixação Biológica de Nitrogênio**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2004. v. 1. p. 76-76.

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

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSAARD, L. **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros.** Lavras: Ed. UFLA, 2008. 768 p.

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

MOREIRA, F.M.S ; CRUZ, L ; MIANADEFARIA, S ; MARSH, T ; MARTINEZROMERO, E ; DEOLIVEIRAPEDROSA, F ; MARIAPITARD, R ; PETERWYOUNG, J . Azorhizobium doebereinerae sp. Nov. Microsymbiont of Sesbania virgata (Caz.) Pers.?. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 29, n.3, p. 197-206, 2006.

MORI, S.A., BOOM, B.M. & FRANCE, E.T. Distribution patterns and conservation of East Brazilian Coastal Forest Species, **Brittonia,** 33(2): 233-245, 1981.

MORIM & BARROSO, G. M. Leguminosae arbustivas e arbóreas da Floresta Atlântica do Parque Nacional do Itatiaia, sudeste do Brasil: subfamílias Caesalpinioideae e Mimosoideae. **Rodriguesia** 58(2): 423-468,2007.

MORIM, M.P. 2012. ***Piptadenia*** *in* **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (*http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB031387*). Acesso em 21 de jan. 2013.

MORIM, M.P. 2012. ***Pseudopiptadenia*** *in* **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (*http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB018996*). Acesso em 21 de jan. 2013.

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

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the β-subclass of Proteobacteria. **Nature**. 411: 948-950, 2001.

MPEPEREKI, S., AND WOLLUM, A. G. Diversity of indigenous *Bradyrhizobium japonicum* in North Carolina soils. **Biology Fertility Soils**. 11:121- 127, 1991.

MULDER ,C.P.H,; KORICHEVA, J.; HUSS-DANELL, K.; HÖGBERG, P.; JOSHI, J. Insects affect relationships between plant species richness and ecosystem processes. **Ecology Letters**, 2:237–246, 1999

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C.G.; DA FONSECA, G. A.B.; KENT; J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p.853-858, 2000.

OLIVEIRA, P.P. **Ecologia alimentar, dieta e área de uso de micos-leões-dourados (Leontopithecus rosalia) translocados e sua relação com a distribuição espacial e temporal de recursos alimentares na Reserva Biológica União**. Tese (Doutorado em Ecologia, Conservação e Manejo de Vida Silvestre) – Universidade Federal de Minas Gerais, 2002.

OLIVEIRA-FILHO, A.T.; TAMEIRÃO-NETO, E.; CARVALHO, W.A.C.; WERNECK, M.; BRINA, A.E VIDAL, C. V.; REZENDE, S.C. & PEREIRA, J.A.A. **Análise florística do compartimento arbóreo de áreas de floresta Atlântica *sensu lato* na região das bacias do**

leste (Bahia, Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro). Rodriguésia 56: 185-235, 2005.

ON, S.L.W & HOLMES, B. Reproducibility of tolerance tests that are useful in the identification of campylobacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, p.1785-1788, 1991.

PACE, N.R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, 276, 734-740, 1997.

PACOVSKY, R.S., FULLER, G., STAFFORD, A.E. & PAUL, E.A. Nutrient and growth interactions in soybeans colonized with Glomus versiforme and Rhizobium japonicum. **Plant Soil**, 92, 37–45, 1986.

PAYNE, G.W.; VANDAMME, P.; MORGAN, S.H.; LIPUMA, J.J.; COENYE, T.; WEIGHTMAN, A.J.; JONES, T.H.; MAHENTHIRALINGAM, E. Development of a *recA* Gene-Based Identification Approach for the Entire *Burkholderia* Genus. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 3917–3927, 2005.

POORTER, H.; NIKLAS, K. J.; REICH, P. B.; OLEKSYN, J.; POOT, P.; MOMMER, L. Biomass allocation to leaves, stems and roots: meta-analyses of interspecific variation and environmental control. **New Phytologist**, p. 1-21, 2011.

RADEMAKER, J. L. W., ARTS, H. J. M., VINUESA, P. Molecular typing of environmental isolates: **Molecular Microbial ecology**. Osborn: M. Smith, p. 97-134, 2005

RAPOSEIRAS, R.Ç MARRIEL, I.E., MUZZI,M.R.S., PAIVA, E., FILHO, I.A.P., CARVALHAIS, L.C.C., PASSOS, R.V.M., PINTO, P.P., SA, N.M.H. *Rhizobium* strains competitiveness on bean nodulation in Cerrado soils**. Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, v.41, n.3, p.439-447, mar. 2006.

R COR TEAM. R: **A language and environmntal for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing**, Viena, Áustria. URL http www.R-project.org, 2013.

RIBEIRO, A.C., GUIMARÃES, P.T., ALVAREZ, V.H. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais. Comissão de Fertilidade do Solo de Minas Gerais**-CFSEMG. Viçosa. 360p. 1999.

RIBEIRO, R.D.; LIMA, H.C. Riqueza e distribuição geográfica de espécies arbóreas da família leguminosae e implicações para conservação no centro de diversidade vegetal de cabo frio, rio de janeiro, Brasil, **Rodriguésia** 60:111-127. 2009.

RICKLEFS, R. Environmental heterogeneity and plant species diversity: a hypothesis. The American Naturalist, v.111, 376–381, 1977.

ROSSELÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Review**, Delft, v.25, n. p. 39-67, jan. 2001.

RZANNY, M.; VOIGT, W. Complexity of multitrophic interactions in a grassland ecosystem depends on plant species diversity. **Journal Animal Ecology**, v.81(3): 614-27, 2012.

SAAR, A.; LESUER, E.D. Influence of soil fertility on the rhizobial competitiveness for nodulation of Acacia senegal and Acacia nilotica provenances in nursery and field conditions **World J Microbiol Biotechnol** ,23:705–711, 2007.

SAIKI, R. K.;GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, p. 487-, 1988.

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci,** v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, J.G.D. dos. **Riqueza de fungos micorrízicos arbusculares no solo e crescimento inicial de espécies arbóreas nativas**. 2008. 80f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo). Departamento de Solos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SARITA, S.; SHARMA, P.K.; PRIEFER, U.B.; PRELL, J. Direct amplification of rhizobial nodC sequences from soil total DNA and comparison to nodC diversity of root nodule isolates. **FEMS Microbiology Ecology** 54, 1-11, 2005.

SCHEUBLIN, T.R. & VAN DER HEIDJE, M.G.A. Arbuscular mycorrhizal fungi colonize nonfixing root nodules of several legume species**. New Phytologist**, 172 *:*732–738, 2006.

SCHEUBLIN, T.R., RIDGWAY, K.P., YOUNG, J.P.W. & Van der Heijden, M.G.A. Nonlegumes, legumes, and root nodules harbor different arbuscular mycorrhizal fungal communities. **Applied Enviromental Microbiology**, 70, 6240–6246, 2004.

SCHEUBLIN, T.R.; VAN LOGSTESTIJN, R.P.; VAN DER HEIDJE, M.G.A. BPresence and identity of arbuscular mycorrhizal fungi influence competitive interactions between plant species. **Journal of Ecology**, 95, 631–638, 2007.

SHIRAISHI, A.; MATSUSHITA, **N.;** HOUGETSU, T. Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp. and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. **Systematic and Applied Microbiology**, v.33, 269–274, 2010.

SCHNITZER, S.; KLIRONOMOS, J.; HILLE RIS LAMBERS, J.; KINKLE L.; REICH, P.B; XIAO, K; RILLIG, M.; SIKES, B.; CALLAWAY, R.; MANGAN, S.; VAN NES, E.; SCHEFFER, M. Soil microbes drive the classic plant diversity-productivity pattern. **Ecology**, 92:296–303, 2011.

SIKES, B.A., POWELL, J.R., AND RILLIG, M.C. Deciphering the relative contributions of multiple functions within plant-microbe symbioses. **Ecology**, 91, 1591–1597, 2010.

SIMON, T.; SALAVA, J. New *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii isolates: Evaluation of competitiveness for clover nodule occupancy. **Plant Soil Environment**., 52, (10): 441–448, 2006.

SMITH, R.S. The e€ects of fertilizer on the plant species com- position and wildlife conservation interest of UK grassland. In: Haggar, R.J., Peel, S. (Eds.), **Grassland Management and Nature Conservation**. British Grassland Society Occasional Symposium No. 28. British Grassland Society, pp. 64±73, 1994.

SMITH, S.E. & READ, D.J.**Mycorrhizal Symbiosis**, 2nd edn. Academic Press, London, UK, 1994.

SNEATH, P. H. A., and R. R. SOKAL. 1973. **Numerical taxonomy**. W. H. Freeman and Company, San Francisco.

SOS Mata Atlantica. Flora. Disponivel em : http://www.sosmatatlantica.org.br. Acesso em: 8 de agosto de 2013.

SPRENT, J.I. **Nodulation in Legumes**. Royal Bot. Gardens, Kew, UK, 2001.

STACKEBRANDT, E., FREDERIKSEN, W., GARRITY, G. M. & 10 other authors. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology** 52, 1043–1047, 2002.

STAJKOVIĆ-SRBINOVIĆ, O., MEYER, S.E.D., MILIEIE,B., DELIE, D., WILLEMS, A. Genetic diversity of rhizobia associated with alfalfa in Serbian soils. **Biology Fertility Soils** 48:531–545, 2012.

TAKIZAWA, F.H. 1995. **Levantamento pedológico e zoneamento ambiental da Reserva Biológica de Poço das Antas**. Monografia de graduação. Escola Superior de Agricultura Luis de Queiroz/USP.

TAYEB, L. A., LEFEVRE, M., PASSET, V., DIANCOURT, L., BRISSE, S. & GRIMONT, P. AComparative phylogenies of *Burkholderia, Ralstonia, Comamonas, Brevundimonas* and related organisms derived from rpoB, gyrB and rrs gene sequences. **Research in Microbiology,** 159, 169–177, 2008.

TILMAN, D. AND DOWNING, J. Biodiversity and stability in grasslands. **Nature**, 367, 363–365, 1994.

TRUPER, H.G.; SCHLEIFER, K.H. Prokaryote characterization and identification. In: BALOWS, A.; TRUPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K.H (Ed.), **The Prokaryotes.** 2nd ed. New York: Springer, p.126-148, 1996.

VAN BERKUM, P., ELIA, P., SONG, Q., EARDLY, B.D. Development and Application of a Multilocus Sequence Analysis Method for the Identification of Genotypes Within Genus *Bradyrhizobium* and for Establishing Nodule Occupancy of Soybean (*Glycine max* L. Merr**). MPMI** Vol. 25, No. 3, pp. 321–330, 2012.

VAN DER HEIJDEN, M.G.A., STREITWOLF-ENGEL, R., RIEDL, R., SIEGRIST, S., NEUDECKER, A., INEICHEN, K. et al. The mycorrhizal contribution to plant productivity, plant nutrition and soil structure in experimental grassland. **New Phytology**., 172, 739–752, 2006b.

VAN DER HEIJDEN, M.G.A.; Bakker, R., Verwaal, J.; Scheublin, T.R.; Rutten, M.; van Logtestijn, R.; Staehelin, C. Symbiotic bacteria as a determinant of plant community structure and plant productivity um dune grassland. **FEMS Microbiological Ecology**, v.56, p.178-187, 2006a.

VAN DER HEIJDEN, M.G.A.; KLIRONOMOS, J.N.; URSIC, M.; MOUTOGLIS, P.; STREITWOLF, E.R.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A.; SANDERS, I.R. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. Nature, v.396, p.69-72, 1998.

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

WAGG, C.; JANSA ,J.; SCHMID B.; VAN DER HEIJDEN, M.G.A. Belowground biodiversity effects of plant symbionts support aboveground productivity. **Ecology Letters**, v.14, 1001-1009, 2011

WANG, R.; CAO, W.; CERNIGLIA, G.E. Phylogenetic Analysis of *Fusobacterium prausnitzii* Based uponthe 16s rRNA Gene Sequence and PCR Confirmation. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 341-343, 1996.

WARDLE, D.A.; BARDGETT, R.D.; KLIRONOMOS, J.N. et al. Ecological linkages between aboveground and belowground biota. **Science,** v. 304, June, p. 509-513, 2004.

WILSON, K.J. Molecular techniques for the study of rhizobial ecology in the field. **Soil Biology Biochemistry**. Vol. 27, No. 415, ma. 501-514, 1995

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

WOO PC, LAU CC, CHONG KT, ET AL. MP1 homologue-based multilocus sequence system for typing the pathogenic fungus Penicillium marneffei: a novel approach using lineage-specific genes. **Journal Clinical Microbiology**, 45:3647-54, 2007.

WUYTS, J.; PEER, Y. VAN DE; WACHTER,R.DE**. Distribuition of substituition rates and location of insertion sites in the tertiary structure of ribosomal RNA Nucleic Acids Research**, **Oxford,** v.29,n.24, p. 5017-5028, 2001.

YANO, D.M.Y.; ATTILI, D.S.; GATTI, M.S.V.; EGUCHI, S.Y.; OLIVEIRA, U.M. **Técnicas de microbiologia em controle de qualidade.** Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosselo", 1991.

YATES, R.J.; HOWIESON, J.G.; REEVE, W.G.; O'HARA, G.W. A re-appraisal of the biology and terminologydescribing r hizobial strain success in nodule occupancy of legumes in agriculture. **Plant Soil** , 348:255–267, 2011.

ZAK, D. R.; HOLMES, W.E.;WHITE, D.C.; PEACOCK, A.D.; TILMAN, D. Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: are there any links? **Ecology**, 84(8), pp. 2042–2050, 2003.

ZAROSKY, R.J.; BURAU, R.G. A rapid nitric perchloric acid digestion method for multi element tissue analysis. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 8, n. 5, p. 425-436, 1977.

ZEIGLER, D.R. Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** v.53, 1893-1900, 2003.

ANEXOS

A. Meio 79 ou YMA (FRED & WAKSMAN, **Laboratory manual of general microbiology**. New York : McGraw Hill, 1928. 145p.

Manitol		10g
K_2HPO_4	Sol. 10%	1mL
KH_2PO_4	Sol. 10%	4mL
$MgSO_4.7H_2O$	Sol. 10%	2mL
NaCl	Sol. 10%	1mL
Extrato de levedura		0,4g
Azul de bromotimol	Sol. 0,5% em 0,2N de KOH	5mL

Ajustar pH para 6,8-7,0 com solução de KOH a 10%
Completar para 1000mL com H_2O
Adicionar 1,0g.l^{-1} de Agar para semi-sólido e 15g.l^{-1} para sólido

B.Meio TY

Meio de cultura TY

Tryptona	5g
Extrato de levedura	0,75g
KH_2PO_4	0,454g
$Na_2HPO_4.7\ H_2O$	1,79g
H_2O destilada	completar para 1000 mL
pH 6,8-7,8	
Observação:	Solução de $CaCl_2$ (autoclavar em frasco individual) 20g $CaCl_2$ .2 H_2O. No momento da inoculação, acrescentar 0,25 mL para cada 50 mL de meio de cultura (TY)

C-Solução nutritiva da França

Macronutrientes	PM	Solução Final (mM)	Solução estoque (g/l)	ml de Solução estoque/l de solução final
KH2PO4	136,09	0,1	13,609	1
KCl	74,55	3	223,65	1
CaCl2,(H2O)2	147,02	2	294,04	1
MgSO4,(H2O)7	246,48	1	246,48	1
Micro nutrientes		µM		
H3BO3	61,8	4	6,25	0,04 ml/l
MnSO4, H2O	169	6	25	
ZnSO4, (H2O)7	287,54	0,9	6,25	
CuSO4, (H2O)5	249,68	1	6,25	
Na2MoO4, (H2O)2	241,95	0,1	0,625	

Séquestrène de fer

d- Caracterização morfofisiológica das culturas das 37 estirpes recomendadas que nodulam com *Pseudopiptadenia contorta, Albizia pedicellaris* e *Piptadenia contorta.*

Estirpe	T	D	pH	F	E	B	S	M	C	DO	COR	AI
PC3	R	2	AC	C	C	I	L	E	V	O	Cr	N
PC4	R	1,5	N	C	C	I	L	P	V	O	Cr	N
PC5	R	1,5	AL	C	L	I	L	P	S	O	Cr	N
PC7	R	0,5	AL	C	P	I	L	E	G	O	Cr	N
PC8	R	1	AL	C	C	I	L	P	G	O	Cr	N
BR6815	L	0,5	AC	C	C	I	L	A	A	O	Cr	N
BR6816	R	1,5	N	C	P	I	L	M	G	O	Cr	S
BR6817	L	<0,5	AL	C	C	I	L	M	S	T	Am	S
BR6818	L	<0,5	AL	C	C	I	L	M	S	T	Am	S
AP10	R	0,5	N	C	P	I	L	E	G	O	Cr	S
AP12	R	0,5	N	C	DP	I	L	E	G	O	Cr	S
AP13	R	1	N	C	L	I	L	E	S	O	Am	S
AP14	R	0,5	AL	C	L	I	L	E	G	O	Cr	S
SMF616-1	R	1	AC	C	L	I	L	E	G	T	Cr	S
SMF616-2	R	1	AC	C	L	I	L	P	G	T	Cr	S
SMF616-3	R	1	AL	C	L	I	L	E	G	T	Cr	S
BR4802	R	0,5	N	C	C	I	L	M	G	O	Cr	S
BR4812	R	0,5	AL	C	PL	O	L	P	A	O	Br	S
BR4813	R	0,5	AL	C	PL	I	L	P	A	O	Br	S
BR4816	R	1	AL	C	PL	I	L	P	G	O	Cr	S
BR4817	R	1	AC	C	PL	I	L	P	S	O	Cr	S
BR4818	I	0,5	N	C	C	I	L	P	A	O	Br	S
BR4820	R	1	AC	C	C	I	L	P	G	O	Cr	S
BR4821	R	0,5	AC	C	C	I	L	P	G	O	Br	S
BR4822	R	0,5	AC	C	C	I	L	M	G	O	Br	S
BR4823	R	<0,5	AC	C	C	I	L	P	G	T	Br	S
BR4824	R	0,5	AC	C	C	I	L	P	G	O	Br	S
BR4825	R	0,5	AC	C	L	I	L	P	G	O	Cr	S
BR4826	R	1,5	N	C	C	I	L	M	G	O	Br	S
BR4827	R	1	AL	C	PL	I	L	M	G	O	Br	S
SMF1181-1	R	0,1	AC	C	PL	I	L	E	G	O	Cr	S
SMF1181-2	R	1	AC	C	C	I	L	M	V	O	Cr	S
SMF1181-3	R	0,5	AL	C	PL	I	L	E	G	O	Cr	S
SMF1181-5	R	0,5	AC	C	PL	I	L	P	V	O	Cr	N
SMF1181-6	R	1	AC	C	PL	I	L	P	V	O	Cr	S
SMF1181-7	R	1	N	C	C	I	L	P	G	O	Cr	N
SMF1181-8	R	0,5	AC	C	PL	I	L	P	G	O	Cr	S

As letras referem- T: tempo, dias para o aparecimento de colônias isoladas; R: rápido; I: intermediário, L: lento;D: diâmetro das colônias (cm); pH: modificação do pH do meio de cultivo: N: neutro; AL: alcalino; AC: ácido; F: forma das colônias isoladas: C: circular; I: irregular; P: puntiforme; E: elevação das colônias: C: convexo; L: lente; P: plano; DP: drop-like. B: bordo; I: inteiro; O: ondulado; S: superfície das colônias; L: liso, R: rugosa. M: muco produzido- A: abundante, M: moderado, P: pouco, E: escasso. C: consistência- G: gomosa, A: aquosa, E: elástica, S: seca, D.O: detalhes ópticos: B: brilhante, TL: translúcido, O: opaco. Cor: A: am, C: cr, B: br, A I: absorção de indicador- S: sim, N: não.

E. Análises estatísticas das variáveis delta de altura, matéria seca da parte aérea, matéria seca de raiz, numero de nódulos, peso seco de nódulos, fertilidade do solo após 6 meses do experimento em comunidade e individual.

E.1- COMUNIDADE

Variável analisada: Altura média

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BLOCO	5	0.635762	0.127152	0.730	0.6118
Tratamento	3	13.229924	4.409975	25.325	0.0000
erro 1	15	2.611980	0.174132		
ESPECIE	5	24.181503	4.836301	26.694	0.0000
Especie*tratamentos	15	19.636605	1.309107	7.226	0.0000
erro 2	100	18.117608	0.181176		
Total corrigido	143	78.413383			

CV 1 (%) = 30.34
CV 2 (%) = 30.95
Média geral: 1.3753472 Número de observações: 144

Análise do desdobramento de tratamento dentro de cada nível de espécie

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
A. pedicellaris	3	4.769912	1.589971	8.776	0.0000
C.vernalis	3	0.114279	0.038093	0.210	0.8890
C.glandulosa	3	11.472367	3.824122	21.107	0.0000
P. contorta	3	0.572713	0.190904	1.054	0.3710
P.gonoacantha	3	1.724446	0.574815	3.173	0.0272
H. crysotrichus	3	14.212813	4.737604	26.149	0.0000
Erro	100	18.117608	0.181176		

Análise do desdobramento de ESPECIE dentro de cada nível de tratamento

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Nmax	5	2.382356	0.476471	2.647	0.0264
Nmin	5	2.441047	0.488209	2.712	0.0235
TN	5	37.287347	7.457469	41.430	0.0000
TSN	5	1.707358	0.341472	1.897	0.1000
Erro	114	20.520236	0.180002		

Análise do desdobramento de ESPECIE dentro de cada nível de tratamento

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Nmax	5	3.725922	0.745184	2.838	0.0186
Nmin	5	2.453181	0.490636	1.869	0.1049
TN	5	36.422089	7.284418	27.742	0.0000
TSN	5	1.532392	0.306478	1.167	0.3292
Erro	115	30.196258	0.262576		

Análise do desdobramento de DIVERSIDAD dentro de cada nível de espécie

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
A.pedicellaris	3	7.418083	2.472694	9.515	0.0000
C. vernalis	3	0.541083	0.180361	0.694	0.5567
C. glandulosa	3	9.532013	3.177338	12.227	0.0000
P. contorta	3	0.079417	0.026472	0.102	0.9589
P. gonoacantha	3	2.899633	0.966544	3.719	0.0137
H. crysotrichus	3	11.743212	3.914404	15.063	0.0000
Erro	100	25.987050	0.259871		

Análise do desdobramento de ESPECIE dentro de cada nível de:

DIVERSIDAD

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Nmax	5	5.520867	1.104173	3.450	0.0068
Nmin	5	6.187447	1.237489	3.867	0.0032
TN	5	35.162222	7.032444	21.975	0.0000
TSN	5	5.246714	1.049343	3.279	0.0092
Erro	87	27.841578	0.320018		

Variável analisada: MSPA

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BLOCO	5	2.170981	0.434196	0.604	0.6981
Tratamentos	3	38.428511	12.809504	17.815	0.0000
erro 1	15	10.785197	0.719013		
ESPECIE	5	74.109681	14.821936	23.105	0.0000
ESPECIE*TRATAMENTOS	15	57.378197	3.825213	5.963	0.0000
erro 2	100	64.149289	0.641493		
Total corrigido	143	247.021856			

CV 1 (%) = 88.97
CV 2 (%) = 84.04
Média geral: 0.9530556 Número de observações: 144

Análise do desdobramento de DIVERSIDAD dentro de cada nível de espécie

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc

A.pedicellaris	3	9.005833	3.001944	4.680	0.0042
C.vernalis	3	0.501833	0.167278	0.261	0.8533
C. glandulosa	3	48.184412	16.061471	25.038	0.0000
P. contorta	3	3.405350	1.135117	1.769	0.1568
P. gonoacantha	3	1.370633	0.456878	0.712	0.5458
H. crysotrichus	3	33.338646	11.112882	17.323	0.0000
Erro	100	64.149289	0.641493		

Análise do desdobramento de ESPECIE dentro de cada nível de tratamento

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Nmax	5	16.916247	3.383249	5.170	0.0003
Nmin	5	22.884692	4.576938	6.994	0.0000
TN	5	70.219492	14.043898	21.460	0.0000
TSN	5	21.467447	4.293489	6.561	0.0000
Erro	112	73.294248	0.654413		

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
BLOCO	5	3.184120	0.636824	1.024	0.4381
TRATAMENTOS	3	25.251891	8.417297	13.541	0.0001
erro 1	15	9.324322	0.621621		
ESPECIE	5	195.545328	39.109066	66.488	0.0000
ESPECIE*tratamentos	15	40.189880	2.679325	4.555	0.0000
erro 2	100	58.821442	0.588214		
Total corrigido	143	332.316983			

CV 1 (%) = 60.23
CV 2 (%) = 58.59
Média geral: 1.3090972 Número de observações: 144

Análise do desdobramento de DIVERSIDAD dentro de cada nível de especie

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
A.pedicellaris	3	3.990013	1.330004	2.261	0.0852
C. vernalis	3	1.424512	0.474837	0.807	0.4915
C.glandulosa	3	27.709217	9.236406	15.702	0.0000
P. contorta	3	5.825283	1.941761	3.301	0.0232
P.gonoacantha	3	1.864033	0.621344	1.056	0.3699
H. crysotrichus	3	24.628712	8.209571	13.957	0.0000
Erro	100	58.821442	0.588214		

Análise do desdobramento de ESPECIE dentro de cada nível de tratamento.

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Nmax	5	44.577092	8.915418	15.015	0.0000
Nmin	5	34.666122	6.933224	11.676	0.0000
TN	5	112.115814	22.423163	37.763	0.0000
TSN	5	44.376181	8.875236	14.947	0.0000
Erro	113	67.097395	0.593782		

Variável analisada: **Peso seco de nódulos**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	1	0.004964	0.004964	0.553	0.4684
REP	5	0.024854	0.004971	0.554	0.7331
erro	15	0.134528	0.008969		
Total corrigido	21	0.164345			

CV (%) = 48.45
Média geral: 0.1954545 Número de observações: 22

Variável analisada: **Numero de nódulos**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	1	0.368727	0.368727	0.210	0.6535
REP	5	1.699411	0.339882	0.193	0.9604
erro	15	26.361789	1.757453		
Total corrigido	21	28.429927			

CV (%) = 20.17
Média geral: 6.5718182 Número de observações: 22

Variável analisada: **Fertilidade do substrato**

Variável analisada: Ca

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.001546	0.000515	1.522	0.2496
REP	5	0.000571	0.000114	0.337	0.8825
erro	15	0.005079	0.000339		
Total corrigido	23	0.007196			

CV (%) = 7.42
Média geral: 0.2479167 Número de observações: 24

Variável analisada: **HAL**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.031250	0.010417	25.000	0.0000
REP	5	0.002083	0.000417	1.000	0.4509
erro	15	0.006250	0.000417		
Total corrigido	23	0.039583			

CV (%) = 97.98

Média geral: 0.0208333 Número de observações: 24

Variável analisada: **K**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	15.543150	5.181050	29.171	0.0000
REP	5	0.215800	0.043160	0.243	0.9369
erro	15	2.664100	0.177607		
Total corrigido	23	18.423050			

CV (%) = 9.32
Média geral: 4.5225000 Número de observações: 24

Variável analisada: **MG**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	18.418900	6.139633	9.874	0.0008
REP	5	7.170633	1.434127	2.306	0.0963
erro	15	9.327200	0.621813		
Total corrigido	23	34.916733			

CV (%) = 12.79
Média geral: 6.1633333 Número de observações: 24

Variável analisada: **N**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.007613	0.002538	0.701	0.5657
REP	5	0.013688	0.002738	0.757	0.5944
erro	15	0.054263	0.003618		
Total corrigido	23	0.075563			

CV (%) = -2.62
Média geral: -2.2962500 Número de observações: 24

Variável analisada: **P**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.000000000E+0000	0.00000000E+0000	1.0E+0009	0.0000
REP	5	0.000000000E+0000	0.00000000E+0000	1.0E+0009	0.0000
erro	15	0.000000000E+0000	0.00000000E+0000		
Total corrigido	23	0.000000			

CV (%) = 0.00
Média geral: 0.6700000 Número de observações: 24

Variável analisada: **pH**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	2.040701308E+0014	6.80233769E+0013	78.734	0.0000
REP	5	1.042434747E+0013	2.08486949E+0012	2.413	0.0853
erro	15	1.295950323E+0013	8.63966882E+0011		
Total corrigido	23	2.274539815E+0014			

CV (%) = 11.56
Média geral: 8038566.6075000 Número de observações: 24

Variável analisada Nitrogênio foliar:

a- *Albizia pedicellaris*

Variável analisada: N

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.866746	0.288915	5.563	0.0090
REP	5	0.278238	0.055648	1.071	0.4146
erro	15	0.779079	0.051939		
Total corrigido	23	1.924063			

CV (%) = 22.54
Média geral: 1.0112500 Número de observações: 24

b- *Cupania vernalis*

Variável analisada: N

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.575113	0.191704	9.628	0.0009
REP	5	0.157288	0.031458	1.580	0.2255
erro	15	0.298663	0.019911		
Total corrigido	23	1.031063			

CV (%) = 19.36
Média geral: 0.7287500 Número de observações: 24

c- *Colubrina glandulosa*

Variável analisada: N

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.222300	0.074100	20.227	0.0000
REP	5	0.011883	0.002377	0.649	0.6669
erro	15	0.054950	0.003663		
Total corrigido	23	0.289133			
CV (%) =	11.07				
Média geral:	0.5466667	Número de observações:		24	

d- *Pseudopiptadenia contorta*

Variável analisada: N

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.704046	0.234682	8.151	0.0019
REP	5	0.065637	0.013128	0.456	0.8027
erro	15	0.431879	0.028792		
Total corrigido	23	1.201563			
CV (%) =	17.20				
Média geral:	0.9862500	Número de observações:		24	

e- *Piptadenia gonoacantha*

Variável analisada: N

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.698413	0.232804	10.923	0.0005
REP	5	0.166271	0.033254	1.560	0.2309
erro	15	0.319713	0.021314		
Total corrigido	23	1.184396			

CV (%) = 9.19
Média geral: 1.5879167 Número de observações: 24

f- *Handroanthus crysotrichus*

Variável analisada: N

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.278646	0.092882	10.505	0.0006
REP	5	0.077021	0.015404	1.742	0.1857
erro	15	0.132629	0.008842		
Total corrigido	23	0.488296			

CV (%) = 9.70
Média geral: 0.9695833 Número de observações: 24

E.2. INDIVIDUAL

E.2.1- *Albizia pedicellaris*

Variável analisada: **altura média**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	9.714412	3.238137	4.755	0.0159
REP	5	0.855438	0.171088	0.251	0.9326
erro	15	10.214412	0.680961		
Total corrigido	23	20.784262			

CV (%) = 58.89
Média geral: 1.4012500 Número de observações: 24

Variável analisada: **MSPA**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	17.085213	5.695071	10.804	0.0005
REP	5	1.499171	0.299834	0.569	0.7228
erro	15	7.906613	0.527108		
Total corrigido	23	26.490996			

CV (%) = 214.85
Média geral: 0.3379167 Número de observações: 24

Variável analisada: **MSR**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	7.018746	2.339582	5.396	0.0101
REP	5	0.987471	0.197494	0.455	0.8030
erro	15	6.503979	0.433599		
Total corrigido	23	14.510196			

CV (%) = 400.09
Média geral: 0.1645833 Número de observações: 24

E.2.2- *Cupania vernalis*

Variável analisada: **altura média**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	4.359679	1.453226	8.951	0.0012
REP	5	0.857871	0.171574	1.057	0.4218
erro	15	2.435246	0.162350		
Total corrigido	23	7.652796			

CV (%) = 84.75
Média geral: 0.4754167 Número de observações: 24

Variável analisada: **MSPA**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	13.611746	4.537249	16.007	0.0000
REP	5	1.344671	0.268934	0.949	0.4785
erro	15	4.251679	0.283445		
Total corrigido	23	19.208096			

CV (%) = 353.95
Média geral: 0.1504167 Número de observações: 24

Variável analisada: **MSR**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	7.513713	2.504571	4.962	0.0137
REP	5	1.188571	0.237714	0.471	0.7921
erro	15	7.571213	0.504748		
Total corrigido	23	16.273496			

CV (%) = 578.00
Média geral: 0.1229167 Número de observações: 24

E.2.3- *Colubrina glandulosa*

Variável analisada: altura média

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	17.151235	5.717078	62.420	0.0000
REP	5	0.620500	0.124100	1.355	0.3255
erro	9	0.824315	0.091591		
Total corrigido	17	18.596050			

CV (%) = 22.34
Média geral: 1.3550000 Número de observações: 18

Variável analisada: **MSPA**

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	47.079115	15.693038	50.035	0.0000
REP	5	0.787942	0.157588	0.502	0.7679
erro	9	2.822793	0.313644		
Total corrigido	17	50.689850			

CV (%) = -82.97
Média geral: -0.6750000 Número de observações: 18

Variável analisada: **MSR**

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	30.561698	10.187233	23.133	0.0001
REP	5	0.367628	0.073526	0.167	0.9685
erro	9	3.963452	0.440384		
Total corrigido	17	34.892778			

CV (%) = -208.10
Média geral: -0.3188889 Número de observações: 18

E.2.4- *Pseudopiptadenia contorta*

Variável analisada: **Variacao de atura**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	39.956017	13.318672	17.541	0.0000
REP	5	2.124833	0.424967	0.560	0.7293
erro	15	11.389133	0.759276		
Total corrigido	23	53.469983			

CV (%) = 71.77
Média geral: 1.2141667 Número de observações: 24

Variável analisada: **MSPA**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	28.473950	9.491317	15.616	0.0001

REP	5	2.447933	0.489587	0.806	0.5632
erro	15	9.116900	0.607793		
Total corrigido	23	40.038783			

CV (%) = -228.74
Média geral: -0.3408333 Número de observações: 24

Variável analisada: **MSR**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	23.654900	7.884967	8.130	0.0019
REP	5	4.375733	0.875147	0.902	0.5048
erro	15	14.548100	0.969873		
Total corrigido	23	42.578733			

CV (%) = -104.03
Média geral: -0.9466667 Número de observações: 24

E.2.5- Piptadenia gonoacantha

Variável analisada: **Variacao de altura**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	17.235012	5.745004	4.836	0.0150
REP	5	6.484771	1.296954	1.092	0.4047
erro	15	17.818012	1.187867		
Total corrigido	23	41.537796			

CV (%) = 67.78
Média geral: 1.6079167 Número de observações: 24

Variável analisada: **MSPA**

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	27.072746	9.024249	12.016	0.0003
REP	5	6.511037	1.302207	1.734	0.1876
erro	15	11.265579	0.751039		
Total corrigido	23	44.849362			

Média geral: -0.4562500 Número de observações: 24

Variável analisada: **MSR**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	12.467683	4.155894	8.438	0.0016
REP	5	3.420033	0.684007	1.389	0.2836
erro	15	7.387467	0.492498		
Total corrigido	23	23.275183			

CV (%) = -145.95
Média geral: -0.4808333 Número de observações: 24

E.2.6- *Handroanthus crysotrichus*

Variável analisada: **altura média**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	12.536700	4.178900	15.465	0.0001
REP	5	2.326150	0.465230	1.722	0.1903
erro	15	4.053150	0.270210		
Total corrigido	23	18.916000			

CV (%) = 59.75
Média geral: 0.8700000 Número de observações: 24

Variável analisada: MSPA

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	44.755513	14.918504	32.213	0.0000
REP	5	6.909788	1.381958	2.984	0.0458
erro	15	6.946863	0.463124		
Total corrigido	23	58.612163			

CV (%) = -76.79
Média geral: -0.8862500 Número de observações: 24

Variável analisada: **MSR**

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	26.023946	8.674649	11.857	0.0003

REP	5	8.593921	1.718784	2.349	0.0917
erro	15	10.973929	0.731595		
Total corrigido	23	45.591796			

CV (%) = -1324.39
Média geral: -0.0645833 Número de observações: 24

Variável analisada: **Peso seco de nódulos de *Albizia pedicellaris***

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	1	0.003383	0.003383	0.440	0.5546
REP	5	0.022655	0.004531	0.589	0.7179
erro	3	0.023069	0.007690		
Total corrigido	9	0.049107			

CV (%) = 85.72
Média geral: 0.1023000 Número de observações: 10

Variável analisada: Numero de nódulos de *Albizia pedicellaris*

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	1	5245.350000	5245.350000	0.285	0.6305
REP	5	62205.600000	12441.120000	0.676	0.6732
erro	3	55212.650000	18404.216667		
Total corrigido	9	122663.600000			

CV (%) = 87.64
Média geral: 154.8000000 Número de observações: 10

Variável analisada: Peso seco de nódulos de *Piptadenia gonoacantha*

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	1	0.011148	0.011148	0.842	0.4107
REP	5	0.034801	0.006960	0.526	0.7514
erro	4	0.052935	0.013234		
Total corrigido	10	0.098883			

CV (%) = 139.22
Média geral: 0.0826273 Número de observações: 11

Variável analisada: Numero de nódulos de *Piptadenia gonoacantha*

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	1	880.366667	880.366667	8.671	0.0422
REP	5	973.500000	194.700000	1.918	0.2739
erro	4	406.133333	101.533333		
Total corrigido	10	2260.000000			

CV (%) = 26.52
Média geral: 38.0000000 Número de observações: 11

E.2.1.1- Colubrina glandulosa

Variável analisada: CA

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.193895	0.064632	1.733	0.2061
REP	5	0.094341	0.018868	0.506	0.7672
erro	14	0.522155	0.037297		
Total corrigido	22	0.810391			

CV (%) = 14.33
Média geral: 1.3478261 Número de observações: 23

Variável analisada: **HAL**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.590824	0.196941	4.545	0.0200
REP	5	0.190649	0.038130	0.880	0.5195
erro	14	0.606701	0.043336		
Total corrigido	22	1.388174			

CV (%) = 218.63
Média geral: 0.0952174 Número de observações: 23

Variável analisada: **K**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	4478.569565	1492.856522	4.016	0.0296
REP	5	2156.119565	431.223913	1.160	0.3760
erro	14	5204.180435	371.727174		
Total corrigido	22	11838.869565			

CV (%) = 38.33
Média geral: 50.3043478 Número de observações: 23

Variável analisada: **MG**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc

TRAT	3	6.669850	2.223283	14.557	0.0001
REP	5	0.772933	0.154587	1.012	0.4467
erro	14	2.138217	0.152730		
Total corrigido	22	9.581000			

CV (%) = 11.07
Média geral: 3.5300000 Número de observações: 23

Variável analisada: N

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.000037	0.000012	0.546	0.6588
REP	5	0.000050	0.000010	0.447	0.8087
erro	14	0.000313	0.000022		
Total corrigido	22	0.000400			

CV (%) = 15.77
Média geral: 0.0300000 Número de observações: 23

Variável analisada: **P**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	10726.545130	3575.515043	2.952	0.0691
REP	5	764.075533	152.815107	0.126	0.9840
erro	14	16956.741737	1211.195838		
Total corrigido	22	28447.362400			

CV (%) = 16.94
Média geral: 205.4500000 Número de observações: 23

Variável analisada: pH

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	3.493629	1.164543	19.161	0.0000
REP	5	0.225074	0.045015	0.741	0.6057
erro	14	0.850863	0.060776		
Total corrigido	22	4.569565			

CV (%) = 3.61
Média geral: 6.8256522 Número de observações: 23

E.2.1.2- Pseudopiptadenia contorta

Variável analisada: Ca

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.052754	0.017585	3.448	0.0485

REP	5	0.044827	0.008965	1.758	0.1909
erro	13	0.066296	0.005100		
Total corrigido	21	0.163877			

CV (%) = 4.69
Média geral: 1.5231818 Número de observações: 22

Variável analisada: **HAL**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	1.134982	0.378327	6.678	0.0057
REP	5	0.272915	0.054583	0.963	0.4746
erro	13	0.736485	0.056653		
Total corrigido	21	2.144382			

CV (%) = 171.12
Média geral: 0.1390909 Número de observações: 22

Variável analisada: **K**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	6334.957576	2111.652525	21.295	0.0000
REP	5	496.507576	99.301515	1.001	0.4547
erro	13	1289.125758	99.163520		
Total corrigido	21	8120.590909			

CV (%) = 15.29
Média geral: 65.1363636 Número de observações: 22

Variável analisada: **MG**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	243.456482	81.152161	1.114	0.3791
REP	5	343.545767	68.709153	0.943	0.4857
erro	13	947.234209	72.864170		
Total corrigido	21	1534.236459			

CV (%) = 144.89
Média geral: 5.8913636 Número de observações: 22

Variável analisada: **N**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.000260	0.000087	2.883	0.0762
REP	5	0.000186	0.000037	1.241	0.3453
erro	13	0.000390	0.000030		
Total corrigido	21	0.000836			

CV (%) = 16.74

Média geral: 0.0327273 Número de observações: 22

Variável analisada: **P**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	16501.917136	5500.639045	11.032	0.0007
REP	5	11732.897045	2346.579409	4.706	0.0113
erro	13	6482.147855	498.626758		
Total corrigido	21	34716.962036			

CV (%) = 14.45
Média geral: 154.5527273 Número de observações: 22

Variável analisada: **pH**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	5.939471	1.979824	110.114	0.0000
REP	5	0.061319	0.012264	0.682	0.6451
erro	13	0.233738	0.017980		
Total corrigido	21	6.234527			

CV (%) = 1.98
Média geral: 6.7681818 Número de observações: 22

E.2.1.3- Piptadenia gonoacantha

Variável analisada:**Ca**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.002691	0.000897	0.985	0.4282
REP	5	0.008132	0.001626	1.786	0.1804
erro	14	0.012751	0.000911		
Total corrigido	22	0.023574			

CV (%) = 13.43
Média geral: 0.2247826 Número de observações: 23

Variável analisada: **HAL**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	1.526354	0.508785	25.354	0.0000
REP	5	0.065595	0.013119	0.654	0.6638
erro	14	0.280938	0.020067		
Total corrigido	22	1.872887			

CV (%) = 12.29
Média geral: 1.1530435 Número de observações: 23

Variável analisada: **K**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.261174	0.087058	12.000	0.0004
REP	5	0.048319	0.009664	1.332	0.3071
erro	14	0.101567	0.007255		
Total corrigido	22	0.411061			

CV (%) = 3.80
Média geral: 2.2386957 Número de observações: 23

Variável analisada: **Mg**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	2.613319	0.871106	1.934	0.1705
REP	5	4.623899	0.924780	2.053	0.1328
erro	14	6.305948	0.450425		
Total corrigido	22	13.543165			

CV (%) = 15.27
Média geral: 4.3956522 Número de observações: 23

Variável analisada: **N**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	175432.468450	58477.489483	1.038	0.4062
REP	5	259231.040164	51846.208033	0.920	0.4965
erro	14	788999.808916	56357.129208		
Total corrigido	22	1223663.317530			

CV (%) = -32.83
Média geral: -723.0682609 Número de observações: 23

Variável analisada: **P**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.000016	0.000005	1.231	0.3355
REP	5	0.000021	0.000004	0.974	0.4666
erro	14	0.000059	0.000004		
Total corrigido	22	0.000096			

CV (%) = 0.19
Média geral: 1.1104348 Número de observações: 23

Variável analisada: **pH**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	598689775.825892	199563258.608631	210.790	0.0000
REP	5	4454837.725630	890967.545126	0.941	0.4847
erro	14	13254349.476400	946739.248314		
Total corrigido	22	616398963.027922			

CV (%) = 7.06
Média geral: 13782.5965217 Número de observações: 23

E.2.1.4- Albizia pedicellaris

Variável analisada: **Ca**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.057841	0.019280	2.270	0.1252
REP	5	0.044111	0.008822	1.039	0.4332
erro	14	0.118909	0.008494		
Total corrigido	22	0.220861			

CV (%) = 35.27
Média geral: 0.2613043 Número de observações: 23

Variável analisada: **HAl**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.439775	0.146592	79.187	0.0000
REP	5	0.041300	0.008260	4.462	0.0122
erro	14	0.025917	0.001851		
Total corrigido	22	0.506991			

CV (%) = 43.98
Média geral: 0.0978261 Número de observações: 23

Variável analisada: **K**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	494603.589757	164867.863252	26.952	0.0000

REP	5	31920.078770	6384.015754	1.044	0.4307
erro	14	85639.386560	6117.099040		
Total corrigido	22	612163.055087			

CV (%) = 23.28
Média geral: 335.9769565 Número de observações: 23

Variável analisada: **Mg**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	1.726931	0.575644	5.423	0.0110
REP	5	0.193306	0.038661	0.364	0.8646
erro	14	1.486111	0.106151		
Total corrigido	22	3.406348			

CV (%) = 12.70
Média geral: 2.5660870 Número de observações: 23

Variável analisada: **N**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.000311	0.000104	3.190	0.0566
REP	5	0.000025	0.000005	0.151	0.9762
erro	14	0.000455	0.000033		
Total corrigido	22	0.000791			

CV (%) = -0.57
Média geral: -1.0021739 Número de observações: 23

Variável analisada: **P**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	1.734723476E-0018	5.78241159E-0019	2.333	0.1183
REP	5	0.000000000E+0000	0.00000000E+0000	0.000	1.0000
erro	14	3.469446952E-0018	2.47817639E-0019		
Total corrigido	22	0.000000			

CV (%) = 0.00
Média geral: 0.9800000 Número de observações: 23

Variável analisada: pH

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	11329.046695	3776.348898	129.994	0.0000
REP	5	575.663425	115.132685	3.963	0.0189
erro	14	406.702472	29.050177		
Total corrigido	22	12311.412591			

CV (%) = 4.90
Média geral: 110.0978261 Número de observações: 23

E.2.1.5- Cupania vernalis

Variável analisada: **Ca**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.108040	0.036013	1.078	0.3903
REP	5	0.096745	0.019349	0.579	0.7155
erro	14	0.467701	0.033407		
Total corrigido	22	0.672487			

CV (%) = 55.90
Média geral: 0.3269565 Número de observações: 23

Variável analisada: **HAL**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.328331	0.109444	25.928	0.0000
REP	5	0.014723	0.002945	0.698	0.6341
erro	14	0.059094	0.004221		
Total corrigido	22	0.402148			

CV (%) = 69.18
Média geral: 0.0939130 Número de observações: 23

Variável analisada: **K**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	238.342377	79.447459	33.841	0.0000
REP	5	19.680557	3.936111	1.677	0.2048
erro	14	32.867839	2.347703		
Total corrigido	22	290.890774			

CV (%) = 8.91
Média geral: 17.1947826 Número de observações: 23

Variável analisada: **Mg**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	162.379995	54.126665	3.595	0.0409
REP	5	14.472675	2.894535	0.192	0.9605
erro	14	210.810922	15.057923		
Total corrigido	22	387.663591			

CV (%) = 30.03
Média geral: 12.9221739 Número de observações: 23

Variável analisada: **N**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.000235	0.000078	0.856	0.4865
REP	5	0.000405	0.000081	0.885	0.5165
erro	14	0.001282	0.000092		
Total corrigido	22	0.001922			

CV (%) = -0.89
Média geral: -1.0765217 Número de observações: 23

Variável analisada: **P**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	6.431525	2.143842	3.829	0.0341
REP	5	3.101622	0.620324	1.108	0.3997
erro	14	7.839175	0.559941		
Total corrigido	22	17.372322			

CV (%) = 8.09
Média geral: 9.2465217 Número de observações: 23

Variável analisada: pH

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.311027	0.103676	75.704	0.0000
REP	5	0.001374	0.000275	0.201	0.9569
erro	14	0.019173	0.001369		
Total corrigido	22	0.331574			

CV (%) = 1.59
Média geral: 2.3252174 Número de observações: 23

E.2.1.5- Handroanthus crysotrichus

Variável analisada: **Ca**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCI

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.443763	0.147921	8.672	0.0017
REP	5	0.067216	0.013443	0.788	0.5753
erro	14	0.238804	0.017057		
Total corrigido	22	0.749783			

CV (%) = 36.19
Média geral: 0.3608696 Número de observações: 23

Variável analisada: **HAl**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.028774	0.009591	8.892	0.0015
REP	5	0.007699	0.001540	1.428	0.2744
erro	14	0.015101	0.001079		
Total corrigido	22	0.051574			

CV (%) = 132.52
Média geral: 0.0247826 Número de observações: 23

Variável analisada: **K**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	5984520.082898	1994840.027633	16.850	0.0001
REP	5	961514.596744	192302.919349	1.624	0.2177
erro	14	1657398.974819	118385.641059		
Total corrigido	22	8603433.654461			

CV (%) = 30.50
Média geral: 1128.0386957 Número de observações: 23

Variável analisada: **Mg**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.007787	0.002596	8.642	0.0017
REP	5	0.000095	0.000019	0.063	0.9967
erro	14	0.004205	0.000300		
Total corrigido	22	0.012087			

CV (%) = 2.76
Média geral: 0.6269565 Número de observações: 23

Variável analisada: **N**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.000344	0.000115	0.989	0.4265
REP	5	0.000364	0.000073	0.628	0.6818
erro	14	0.001623	0.000116		
Total corrigido	22	0.002330			

CV (%) = -0.91
Média geral: -1.1882609 Número de observações: 23

Variável analisada: **P**

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	12635.252938	4211.750979	2.966	0.0683
REP	5	6387.036475	1277.407295	0.899	0.5081
erro	14	19881.918979	1420.137070		
Total corrigido	22	38904.208391			

CV (%) = 21.28
Média geral: 177.0778261 Número de observações: 23

Variável analisada: **pH**

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	78651772.202774	26217257.400925	150.365	0.0000
REP	5	1606724.201494	321344.840299	1.843	0.1689
erro	14	2440996.781992	174356.912999		
Total corrigido	22	82699493.186261			

CV (%) = 6.93
Média geral: 6029.6013043 Número de observações: 23

E.2.2- Variável analisada Nitrogênio foliar

a- *Albizia pedicellaris*

Variável analisada: N

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	5.946212	1.982071	39.104	0.0000
REP	5	0.306871	0.061374	1.211	0.3512
erro	15	0.760312	0.050687		
Total corrigido	23	7.013396			

CV (%) = 19.84
Média geral: 1.1345833 Número de observações: 24

b- *Cupania vernalis*

Variável analisada: N

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	3.575112	1.191704	25.162	0.0000
REP	5	0.174671	0.034934	0.738	0.6069
erro	15	0.710412	0.047361		
Total corrigido	23	4.460196			

CV (%) = 18.67
Média geral: 1.1654167 Número de observações: 24

c- *Colubrina glandulosa*

Variável analisada: N

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	0.184850	0.061617	6.002	0.0068
REP	5	0.059133	0.011827	1.152	0.3768
erro	15	0.154000	0.010267		
Total corrigido	23	0.397983			

CV (%) = 9.61
Média geral: 1.0541667 Número de observações: 24

d- *Pseudopiptadenia contorta*

Variável analisada: N

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc

TRAT	3	1.965813	0.655271	4.818	0.0152
REP	5	0.238621	0.047724	0.351	0.8737
erro	15	2.039962	0.135997		
Total corrigido	23	4.244396			

CV (%) = 25.05
Média geral: 1.4720833 Número de observações: 24

e- *Piptadenia gonoacantha*

Variável analisada: N

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	1.198312	0.399437	4.935	0.0140
REP	5	0.194421	0.038884	0.480	0.7855
erro	15	1.214163	0.080944		
Total corrigido	23	2.606896			

CV (%) = 15.46
Média geral: 1.8404167 Número de observações: 24

f- *Handroanthus crysotrichus*

Variável analisada: N

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

a

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TRAT	3	7.830146	2.610049	12.127	0.0003
REP	5	0.895971	0.179194	0.833	0.5464
erro	15	3.228379	0.215225		
Total corrigido	23	11.954496			

CV (%) = 27.57
Média geral: 1.6829167 Número de observações: 24