

CLAYTON ALBUQUERQUE DE SOUSA

DIVERSIDADE E SELEÇÃO RIZOBIANA PARA LEGUMINOSAS USADAS
COMO ADUBO VERDE EM SOLOS DA REGIÃO CANAVIEIRA NORDESTINA

RECIFE
2014

CLAYTON ALBUQUERQUE DE SOUSA

DIVERSIDADE E SELEÇÃO RIZOBIANA PARA LEGUMINOSAS USADAS
COMO ADUBO VERDE EM SOLOS DA REGIÃO CANAVIEIRA NORDESTINA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência do Solo.

RECIFE
2014

CLAYTON ALBUQUERQUE DE SOUSA

DIVERSIDADE E SELEÇÃO RIZOBIANA PARA LEGUMINOSAS USADAS
COMO ADUBO VERDE EM SOLOS DA REGIÃO CANAVIEIRA NORDESTINA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciência do Solo.

Tese aprovada em 28 de fevereiro de 2014 pela banca examinadora:

ORIENTADOR:

Mario de Andrade Lira Junior

EXAMINADORES:

Ana Dolores Santiago de Freitas – Dra. (DEPA/UFRPE)

Emídio Cantídio Almeida de Oliveira - Dr. (DEPA/UFRPE)

Maria de Fátima Cavalcanti Barros – Dra. (DEPA/UFRPE)

Maria Luiza Ribeiro Bastos da Silva – Dra. (IPA)

A meus pais, Elias Juventino de Sousa e M^a Helena de Albuquerque de Sousa
por nunca desistirem de me educar.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco pela oportunidade de uma realização profissional, apoio e instalações cedidas para a realização do trabalho.

A FACEPE e a CAPES pelas bolsas concedidas durante os quatro anos do curso.

Ao meu orientador professor Mario de Andrade Lira Junior por todo o conhecimento, incentivo, paciência e amizade doada desde minha iniciação científica até agora.

À Dr. Gláucia Alves e Silva, que neste trabalho teve duas funções fundamentais. Na função de co-orientadora, sempre dividiu comigo as discussões sobre o trabalho, a qualquer hora do dia, em qualquer semana. Na função de co-executora do projeto, contribuiu não só intelectualmente, mas também como mão de obra. Sem sua ajuda este trabalho não teria sido o mesmo. Meu obrigado para sempre.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo pelo conhecimento repassado durante o curso.

Aos diretores do Instituto Federal de Educação do Ceará – Campus Crateús, prof^a. Paula Beserra, diretora do campus, e prof. João Henrique Silva Luciano, diretor de ensino, que, sempre que solicitei, me concederam horários alternativos para a execução de minhas atividades como docente da instituição. Suas compreensões foram essenciais para a conclusão do meu curso de doutorado.

A meus pais, Elias e Maria Helena por todo amor, conselho e apoio as minhas decisões.

A meus irmãos Sérgio, Alan e Gisele pela parceria de sempre.

A minha esposa Luciana por toda compreensão e ajuda. Sem você seria muito mais difícil a conclusão deste trabalho.

A meu filho Lucas que apesar da pouca idade não me deixava relaxar, fazendo sempre com que seguisse em frente em busca deste objetivo.

A equipe de pesquisa do prof. Mario, pela colaboração dada em momentos críticos do trabalho, além do convívio de todos os dias.

SUMÁRIO

Lista de figuras.....	viii
Lista de tabelas.....	x
Resumo geral.....	xi
General abstract.....	xii
1. Introdução geral.....	1
2. Revisão de literatura.....	3
2.1. Panorama atual da cana-de-açúcar.....	3
2.2. Microrganismos e sistemas agrícolas.....	4
2.3. A fixação biológica de nitrogênio.....	5
2.4. Otimização da FBN.....	6
2.5. Diversidade rizobiana e a FBN.....	7
2.6. Leguminosas para adubos verdes.....	8
2.7. Adubação verde na cana-de-açúcar.....	9
Referências.....	11
3. Capítulo 1.....	19
Diversidade de isolados bacterianos obtidos de nódulos de adubos verdes e relação com os solos de origem de regiões canavieiras do nordeste	
Introdução.....	19
Material e métodos.....	20
Resultados e discussão.....	27
Conclusões.....	42

Referências.....	43
4. Capítulo 2.....	50
Eficiência de isolados rizobianos para mucuna preta de diferentes áreas produtoras de cana do Nordeste brasileiro	
Introdução.....	50
Material e métodos.....	51
Resultados e discussão.....	57
Conclusões.....	62
Referências.....	63

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1: Localização geográfica das usinas produtoras de cana-de-açúcar onde foram coletadas as amostras de solos..... 21
- Figura 2: Características morfofisiológicas analisadas em isolados de mucuna preta e crotalária *espectabilis* obtidos de solos de 13 áreas canavieiras nos estados de AL, PE e PB, região Nordeste do Brasil..... 30
- Figura 3: Dendrograma das características químicas, de fertilidade, físicas dos solos, e meteorológicas de 13 áreas canavieiras nos estados de AL, PE e PB, região Nordeste do Brasil, agrupadas pelo método das ligações simples usando a distância euclidiana como coeficiente de similaridade..... 41

Capítulo 2

- Figura 1: Massa seca da parte aérea de mucuna preta (*Schizolobium aterrimum*) em função de doses de nitrogênio na forma de uréia..... 61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Gêneros e algumas espécies de bactérias pertencentes às subclasses α e β -proteobactérias formadoras de nódulos em leguminosas.....	5
Tabela 2: Produção de matéria seca, quantidade de nitrogênio presente no tecido vegetal incorporado ao solo e relação C/N de algumas plantas utilizadas como adubo verde.....	8
Capítulo 1	
Tabela 1: Características químicas dos solos das 13 áreas canavieiras nos estados de AL, PE e PB, região Nordeste do Brasil.....	22
Tabela 2: Características físicas e meteorológicas, classificação do solo e posição geográfica das 13 áreas canavieiras nos estados de AL, PE e PB, região Nordeste do Brasil.....	23
Tabela 3: Características morfofisiológicas observadas nos isolados bacterianos obtidos em nódulos de mucuna preta e crotalária spectabilis.....	25
Tabela 4: Números de isolados autenticados em mucuna preta e crotalária spectabilis, de amostras de solo que apresentaram isolados e média de isolados por amostra de solo em 13 áreas canavieiras nos estados de AL, PE e PB, região Nordeste do Brasil.....	28
Tabela 5: Grupos, quantidade de isolados de cada área contido no grupo e quantidade total de isolados em cada grupo formado pelos dendrogramas individuais das características morfológicas de isolados	

de crotalária *espectabilis* e mucuna preta obtidos em solos de 13 áreas canavieiras nos estados de AL, PE e PB, região Nordeste do Brasil, agrupados pelo método UPGMA usando o Índice de Jaccard como coeficiente de similaridade..... 33

Tabela 6: Índices de diversidade de Shannon-Wiener, dominância de Simpson e equitabilidade de Pielou para isolados obtidos em crotalária *espectabilis* e mucuna preta provenientes de solos de 13 áreas canavieiras nos estados de AL, PE e PB, região Nordeste do Brasil..... 35

Tabela 7: Grupos, quantidade de isolados de cada área contido no grupo e quantidade total de isolados em cada grupo formado pelo dendrograma conjunto das características morfológicas de isolados de crotalária *espectabilis* e mucuna preta obtidos em solos de 13 áreas canavieiras nos estados de AL, PE e PB, região Nordeste do Brasil, agrupados pelo método UPGMA usando o Índice de Jaccard como coeficiente de similaridade..... 36

Tabela 8: Autovalor, variância e contribuição das características químicas, físicas e meteorológicas nas componentes principais de solos de 13 áreas canavieiras nos estados de AL, PE e PB, região Nordeste do Brasil..... 39

Capítulo 2

Tabela 1: Qui-quadrado para quantidade de isolados autenticados/não autenticados e razão massa seca da parte aérea (MSPA) de isolados autenticados/não autenticados de plantas de mucuna em experimento de autenticação de isolados obtidos em solos dos estados de AL e PE, região Nordeste do Brasil..... 58

Tabela 2: Massa seca da parte aérea (MSPA) e número de nódulos (NNOD) em plantas de mucuna inoculadas com isolados obtidos em solos de 13 áreas canavieiras nos estados de AL, PE e PB, região

Nordeste do Brasil.....	60
Tabela 3: Estimativa do nitrogênio fixado por isolados de mucuna preta, obtidos de solos de regiões canavieiras de AL, PE e PB.....	62

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1: Dendrograma das características morfológicas dos isolados de crotalária espectabilis (<i>Crotalaria spectabilis</i>) obtidos em solos de 13 áreas canavieiras nos estados de AL, PE e PB, região Nordeste do Brasil, agrupados pelo método UPGMA usando o Índice de Jaccard como coeficiente de similaridade.....	21
Apêndice 2: Dendrograma das características morfológicas dos isolados de mucuna preta (<i>Schizolobium aterrimum</i>) obtidos em solos de 13 áreas canavieiras nos estados de AL, PE e PB, região Nordeste do Brasil, agrupados pelo método UPGMA usando o Índice de Jaccard como coeficiente de similaridade.....	30
Apêndice 3: Dendrograma das características morfológicas dos isolados de mucuna preta (<i>Schizolobium aterrimum</i>) e crotalária espectabilis (<i>Crotalaria spectabilis</i>) obtidos em solos de 13 áreas canavieiras nos estados de AL, PE e PB, região Nordeste do Brasil, agrupados pelo método UPGMA usando o Índice de Jaccard como coeficiente de similaridade.....	41

SOUSA, Clayton Albuquerque; Dr. Ciências do Solo; Universidade Federal Rural de Pernambuco; Fevereiro de 2014; Diversidade e seleção rizobiana para leguminosas usadas como adubo verde em solos da região canavieira nordestina; Orientador: Mario de Andrade Lira Junior; Conselheira: Gláucia Alves e Silva.

RESUMO GERAL

A cana-de-açúcar é a principal matéria prima para fabricação de açúcar e biocombustíveis no Brasil e são necessárias novas tecnologias no manejo da cultura para aumentos da produtividade. A adubação verde com leguminosas pode fornecer boas quantidades de nitrogênio à cultura subsequente devido à simbiose com rizóbios, mas pouco se conhece sobre as comunidades bacterianas que habitam os solos cultivados com cana-de-açúcar na região Nordeste. O objetivo desse trabalho foi avaliar a diversidade e eficiência de isolados rizobianos de crotalária espectabilis (*Crotalaria spectabilis*) e mucuna preta (*Schizolobium aterrimum*) obtidos em solos de cana-de-açúcar. Foram coletadas 260 amostras de solo em 13 áreas produtoras de cana em Alagoas, Pernambuco e Paraíba. Foi feita a análise química, física e de fertilidade dos solos e obtidos os dados meteorológicos das áreas. Esses dados foram utilizados em análise de componentes principais e agrupamento. Sementes de crotalária espectabilis e mucuna preta foram pré-germinadas em bandejas contendo areia lavada autoclavada e transplantadas para vasos de Leonard contendo mistura areia:vermiculita (1:1) e solução nutritiva de Hoagland e Arnon sem nitrogênio. Um grama de cada amostra de solo serviu como inoculante para formação de nódulos. Aos 60 dias as plantas foram coletadas e os nódulos esmagados em placa de petri contendo meio de cultura YM para isolamento das bactérias. A caracterização morfológica dos isolados foi realizada e construído um dendrograma de similaridade com todos os isolados, e dendrogramas individuais por planta isca para cálculos dos índices de diversidade de Shannon-Wiener, dominância de Simpson e equitabilidade de Pielou. Cada isolado foi autenticado em sua planta de origem pré-germinada e cultivada em vaso de Leonard conforme experimento de obtenção dos nódulos, através da inoculação de 5 mL de cada isolado multiplicado em meio de cultura YM. As plantas foram coletadas aos 45 dias para avaliação da presença e ausência de nódulos, bem como da massa seca da parte aérea. O teste do qui-

quadrado foi utilizado para avaliar as proporções de isolados autenticados e não autenticados e as proporções da massa seca das partes aéreas das plantas autenticadas e não autenticadas. O experimento de eficiência foi conduzido com todos os isolados autenticados na mucuna, multiplicados de mesma forma que no experimento de autenticação, mais sete tratamentos controles formados pela inoculação da mistura das estirpes Semia 6156/6158, ausência de inoculação, e 5 doses de nitrogênio equivalentes a 30, 60, 90, 120 e 150 kg N ha⁻¹, na forma de uréia calculada com base no volume do substrato no vaso. Plântulas de mucuna preta foram pré-germinadas conforme experimento de obtenção dos nódulos e transplantadas para sacos plásticos pretos para muda contendo 2L da mistura areia:vermiculita (1:1) autoclavada. Cada planta recebeu 3 mL do inóculo e 30 dias depois um reforço de mais 2mL. As plantas foram coletadas aos 56 dias após transplântio para avaliação da massa seca da parte aérea, número e massa seca de nódulos. Foi realizada análise de regressão para os tratamentos que receberam nitrogênio mineral e o nitrogênio fixado pelos isolados foi estimado com base na regressão. Foram autenticados 108 isolados em crotalária e 39 em mucuna e a maioria apresentou crescimento rápido e elevada produção de muco. Foi obtida uma alta diversidade com a formação de 87 grupos no dendrograma da crotalária e 30 grupos no dendrograma da mucuna, com a maioria dos grupos formados por um único isolado. O dendrograma com todos os isolados mostrou a maioria deles formados apenas por isolados de mucuna ou por isolados de crotalária. Um mesmo solo conteve diferentes grupos de bactérias que se associaram a crotalária ou a mucuna. As características químicas e de fertilidade dos solos prevaleceram sobre as físicas e meteorológicas para determinar as semelhanças entre eles. O pH, teores de Na, Ca, Mg, K, Al, CO, e teores de areia, silte e argila foram responsáveis por quase 50% da variação nas características dos solos. Não houve relação entre os grupos formados pelas características morfológicas dos isolados e as características dos solos. Dois isolados se destacaram dos demais e proporcionaram fixação de nitrogênio equivalente a 40,25 kg ha⁻¹ e 36,12 kg ha⁻¹ em mucuna preta.

1.Introdução geral

A exploração da cana-de-açúcar é uma das atividades mais importantes do setor agrícola, tanto pela produção de biocombustíveis e açúcar, quanto pela geração de empregos.

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo e parte é destinada a produção de açúcar visando atender a demanda dos mercados interno e externo. Ao mesmo tempo a busca constante por fontes de energias renováveis e menos poluentes, eleva a demanda por biocombustíveis, em particular o etanol proveniente da cana-de-açúcar.

Em função disto, a área de cultivo da cana-de-açúcar tem se expandido muito, sobretudo nas regiões consideradas as novas fronteiras agrícolas do país. Por outro lado, regiões tradicionalmente canavieiras, como as regiões dos Tabuleiros Costeiros e Zona da Mata do Nordeste, não dispõem mais de área para expansão, tornando-se imprescindíveis práticas de manejo da cultura que aumentem sua produtividade (Farias et al., 2008).

Uma das práticas que podem colaborar com o aumento da produtividade da cana-de-açúcar é a utilização de microrganismos associados ao manejo da cultura (Ambrosano, 2010). Como exemplo têm-se as bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCPs), que são aquelas encontradas colonizando de forma interna e externa órgãos de plantas.

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é o processo mais estudado relacionado aos benefícios da utilização de microrganismos nos sistemas agrícolas. As bactérias que fixam o nitrogênio atmosférico são denominadas diazotróficas e apresentam potencial para serem utilizadas dentro do sistema produtivo da cultura da cana-de-açúcar, incrementando o fornecimento de nitrogênio, seja de forma direta, através de associações endofíticas (Han et al., 2005), ou de forma indireta, através da inoculação de rizóbios em espécies de leguminosas utilizadas para adubação verde (Perin et al., 2003; Lima et al., 2012).

A produção industrial de inoculantes com estirpes rizobianas de alta eficiência na FBN permite o uso em larga escala deste processo natural. No Brasil existe um grande número de estirpes de rizóbios que foram isoladas de seus habitats naturais, estudadas e que atualmente são recomendadas para a

produção de inoculantes para diversas culturas de interesse agrícola (MAPA, 2011).

No entanto, o sucesso da inoculação depende de fatores que vão desde as condições edafoclimáticas até as relações entre planta (macro-simbionte) e microrganismo (micro-simbionte). Diversos estudos já relataram que o micro-simbionte apresenta grande variabilidade com relação a sua capacidade de FBN; quanto à sua capacidade de sobrevivência no solo; e quanto à competitividade (Fagerli & Svenning, 2005; Jesus et al., 2005; Alexandre et al., 2006; Langer et al., 2008).

A pesquisa em busca de novas estirpes de rizóbios tem seu fundamento tecnológico, mas também tem grande importância científica, já que possibilita novos entendimentos sobre a biodiversidade microbiana, que apesar de ser estudada já há muito tempo, ainda possui vários aspectos não compreendidos (Odee et al., 2002; Matsuda et al., 2002; Ballard et al., 2004; Sebbane et al., 2006).

Para a avaliação da diversidade rizobiana existem diversos meios. Os métodos mais tradicionais, que são baseados na caracterização cultural e morfológica do rizóbio, fornecem informações importantes para sua identificação e agrupamento (Pelczar et al., 1997), porém são limitados para identificação no nível de espécies.

Dentro do sistema produtivo da cana-de-açúcar, pesquisas já indicam benefícios no uso de espécies leguminosas como adubo verde, a exemplo das crotalárias juncea e spectabilis (*Crotalaria juncea* e *C. spectabilis*) e da mucuna preta (*Schizolobium aterrimum*). No entanto, estas leguminosas foram utilizadas sem inoculação, portanto nodularam com espécies de rizóbios nativas das áreas em estudo ou, em trabalhos distintos, foram inoculadas com estirpes recomendadas provenientes de regiões com condição edafoclimática diferente do estudo (Saraiva et al., 2008; Costa, 2009; Ambrosano et al., 2010).

Para aumentar o potencial de uso das leguminosas crotalária spectabilis e mucuna preta, se faz necessário buscar novas estirpes de rizóbios que sejam eficientes na fixação biológica de nitrogênio para adubação verde na cultura da cana-de-açúcar, reduzindo o uso de fertilizantes nitrogenados.

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar a diversidade de isolados bacterianos de nódulos de mucuna preta e crotalária spectabilis

obtidos em solos cultivados com cana-de-açúcar e verificar a eficiência dos isolados de mucuna preta na fixação biológica de nitrogênio.

2.Revisão de literatura

2.1.Panorama atual da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma *Gramineae*, pertencente ao gênero *Saccharum*. A partir do ano de 2001, o Grass Phylogeny Working Group (GPWG) realizou estudos de filogenia da família baseados nos relacionamentos evolucionários dos capins e nas estruturas dos seus genomas, e modificou o nome da família para *Poaceae* (Gaut, 2002).

O Brasil está entre os maiores produtores do mundo, com produção de cana-de-açúcar prevista para a safra 2014/2015 de 671,69 milhões de toneladas, mas ainda não alcança as maiores produtividades. Estas são obtidas no Peru, Egito e Senegal, com produtividades maiores que 100 t ha^{-1} , enquanto no Brasil encontra-se em torno de 70 t ha^{-1} (CONAB, 2014). Esta baixa média nacional é, em grande parte, decorrente das baixas produtividades da cultura na região Nordeste do país, enquanto que outras regiões como a Sudeste e Centro Oeste, obtêm produtividades bem maiores.

A área cultivada na safra 2014/15 com cana-de-açúcar no Brasil está estimada em 9.130,1 mil hectares (CONAB, 2014). 75% de todo açúcar produzido mundialmente utiliza a cana-de-açúcar como matéria prima (Lakshmanan et al., 2005), e no Brasil, a estimativa é que a produção de açúcar seja de aproximadamente 39,46 milhões de toneladas. Já para a produção de etanol será direcionada aproximadamente metade da produção de cana, o que resultará em aproximadamente 28,37 bilhões de litros.

A demanda desse biocombustível vem crescendo nos últimos anos, principalmente devido ao aumento das vendas dos veículos flex, que utilizam álcool e/ou gasolina como combustível (Milanez et al., 2012). O Brasil tem atualmente 17,7 milhões de veículos leves que possuem motorização do tipo flex, o que representa 50% do total de veículos leves (Brasil, 2012) e, além disso, a gasolina Brasileira possui 20 a 25 % de etanol. Toda essa necessidade para produzir elevadas quantidades de cana-de-açúcar ocasiona uma também elevada dependência de insumos pela cultura, fazendo com que ela consuma

mais de 240.000 toneladas de nitrogênio fertilizante por ano, gerando para o setor produtivo, um custo em torno de US\$ 150 milhões.

Uma alternativa para minimizar a dependência dos fertilizantes nitrogenados seria a utilização de insumos de origem biológica, como o uso de microrganismos associados a cultura, e práticas culturais que adicionem nitrogênio ao solo, como por exemplo a adubação verde.

2.2.Microrganismos e sistemas agrícolas

A utilização de microrganismos na agricultura pode ser uma das formas de manter a produtividade dos sistemas, com redução dos custos de produção. Segundo Bottomley (2005), os microrganismos do solo influenciam diretamente na fertilidade e produtividade vegetal por meio da ciclagem de nutrientes, supressão de fitopatógenos, produção de fitormônios e, ainda, pela capacidade de metabolização de agrotóxicos. Das et al. (2003) e Tótola & Chaer (2002) enfatizaram que as atividades dos microrganismos estão envolvidas nos ciclos biogeoquímicos, visto que influenciam diretamente a disponibilidade dos nutrientes e elucidam as mudanças do funcionamento do ecossistema solo.

Um dos grupos de microrganismos mais estudados atualmente e com maior potencial de uso nos cultivos são as bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP). As BPCPs são capazes de incrementar a produção agrícola por meio de diversos mecanismos, atuando diretamente na produção ou alteração da concentração de fitohormônios de crescimento como giberelinas, auxinas e citocininas (Melo, 1998); oxidação de sulfatos; aumento de permeabilidade das raízes e produção de sideróforos (Cattelan, 1999; Mariano & Kloepper, 2000), produção de enzimas e ácido cianídrico (HCN), eliminação, alteração da microbiota deletéria e produção de antibióticos extracelulares (Enebak et al., 1998) além da solubilização de fosfatos minerais e promoverem a FBN (Rodriguez & Fraga, 1999).

2.3.A fixação biológica de nitrogênio

A FBN é o processo pelo qual o nitrogênio (N_2) presente em elevada quantidade na atmosfera, e numa forma indisponível para a maioria dos organismos, se torna fisiologicamente e metabolicamente disponível sob a forma de amônia (NH_3). Apenas um pequeno número de microrganismos na

natureza, denominados diazotróficos ou fixadores de nitrogênio, é capaz de reduzir N_2 a NH_3 , através do complexo enzimático da nitrogenase .

Dentre os processos de FBN existentes, destaca-se a associação simbiótica entre algumas bactérias que vivem no solo, chamadas normalmente de rizóbios e plantas pertencentes à família das leguminosas.

Os rizóbios são bactérias gram-negativas, aeróbicas, e que atualmente possuem 98 espécies e diversas biovars, classificadas em 10 famílias e 18 gêneros (Weir, 2012), pertencentes às classes α , β e γ proteobactérias (Tabela 1).

Tabela 1: Gêneros e algumas espécies de bactérias pertencentes às subclasses α , β e γ -proteobactérias formadoras de nódulos em leguminosas.

Subclasse: α-proteobactérias			
Família	Gênero	Espécies	Referências
<i>Rhizobiaceae</i>	<i>Rhizobium</i>	<i>R. galegae</i> ; <i>R. tropici</i>	Frank, 1889
	<i>Ensifer</i>	<i>E. fredii</i> ; <i>E. meliloti</i>	Casida Junior, 1982 Chen et al., 1988
	<i>Allorhizobium</i>		De Lajudie et al., 1998
	<i>Shinella</i>		Lin et al., 2008
<i>Phyllobacteriaceae</i>	<i>Mesorhizobium</i>	<i>M. ciceri</i> ; <i>M. loti</i>	Jarvis et al., 1997
	<i>Phyllobacterium</i>	<i>P. trifolii</i>	Valverde et al., 2005
<i>Bradyrhizobiaceae</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. japonicum</i> ; <i>B. canariense</i>	Jordan, 1982
	<i>Blastobacter</i>	<i>B. denitrificans</i>	Van Berkum & Eardly, 2002
<i>Xanthobacteriaceae</i>	<i>Azorhizobium</i>	<i>A. caulinodans</i> ; <i>A. doebereineriae</i>	Dreyfus et al., 1988
<i>Hyphomicrobiaceae</i>	<i>Devosia</i>	<i>D. neptuniae</i>	Rivas et al., 2003
<i>Brucellaceae</i>	<i>Ochrobactrum</i>	<i>O. lupinus</i> ; <i>O. cytisi</i>	Trujillo et al., 2005
<i>Methylobacteriaceae</i>	<i>Methylobacterium</i>	<i>M. nodulans</i>	Jourand et al., 2004
	<i>Microvirga</i>		Ardley et al., 2012
Subclasse: β-proteobactérias			
<i>Burkholderiaceae</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>B. mimosarum</i>	Moulin et al., 2001
	<i>Cupriavidus</i>	<i>C. taiwanensis</i>	Vandamme & Coenye, 2004
	<i>Herbaspirillum</i>		Valverde et al., 2003
Subclasse: γ-proteobactérias			
<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>		Shiraishi et al., 2010
<i>Micrococcaceae</i>	<i>Kocuria</i>		Mahdhi et al., 2012

Na simbiose rizóbio-leguminosa, normalmente as bactérias infectam os tecidos do sistema radicular das plantas e formam estruturas altamente especializadas denominadas nódulos. Com o estabelecimento de um nódulo

funcional, ocorre a fixação do nitrogênio atmosférico em seu interior transferindo-o para a planta, que em troca cede fotoassimilados . Esta associação destaca-se das demais devido à sua importância econômica e pela maior eficiência do processo de fixação, decorrente de uma parceria mais evoluída entre macro e microsimbionte . A simbiose entre leguminosas e rizóbios é considerada a fonte mais importante de nitrogênio fixado biologicamente em sistemas agrícolas (Graham & Vance, 2003).

Estima-se que 110 milhões de toneladas de N₂ são fixados anualmente por leguminosas de importância agrícola e em ecossistemas naturais, fornecendo mais da metade de todo o N usado na agricultura (Canfield et al., 2010). Quando comparada ao uso de fertilizantes nitrogenados, a fixação biológica apresenta vantagens como baixo custo, ausência de problemas ambientais e abundância do nitrogênio na atmosfera.

2.4.Otimização da FBN

As taxas da FBN por microrganismos variam bastante em decorrência de diversos fatores como, por exemplo, a espécie de microrganismo (Runjanek et al., 2005), presença de nutrientes no solo (Zilli et al., 2006) e condições climáticas (Fernandes et al., 2003).

O aumento das taxas de FBN nos sistemas agrícolas comerciais passa pela seleção de bactérias que sejam mais eficientes neste processo, para então, serem inoculadas na cultura de interesse. Vários estudos já foram realizados na busca de estirpes com alta capacidade de fixar nitrogênio, e existe a necessidade desse processo ser constante, com sucessivos processos de seleção, e assim obter algumas estirpes com maior capacidade na FBN (Martins et al., 2003; Yates et al., 2005; Uchôas & Faria, 2006; Silva et al., 2007).

Estes estudos, que envolvem também a análise da diversidade rizobiana, podem ser realizados através da amostragem de nódulos formados em leguminosas diretamente em campo ou, então, através da coleta de amostras de solo e inoculação delas em plantas de interesse agrônomo, sob condições controladas, para posterior retirada dos nódulos e isolamento dos rizóbios presentes (Santos et al., 2007; Chagas Junior et al., 2010).

Um fator limitante para a utilização das estirpes selecionadas sob condições controladas, é a possibilidade da não adaptação dessas ao solo,

após sua inoculação. A baixa sobrevivência e a baixa competitividade com os rizóbios nativos do solo são fatores que prejudicam a eficiência do processo. Uma alternativa para melhorar a eficiência da inoculação é a utilização de estirpes selecionadas do local onde elas serão inseridas.

2.5.Diversidade rizobiana e a FBN

O estudo da diversidade e a seleção de rizóbios nativos eficientes adaptados em cada região é essencial para o sucesso da FBN nas condições onde se pretende cultivar a leguminosa (Elboutahiri et al., 2010; Lorite et al., 2010; Chang et al., 2011; Fontoura et al., 2011; Martins et al., 2011). O tamanho e a diversidade da população bacteriana pode variar muito em função do tipo de solo, condição edafoclimática, sistema de cultivo e cobertura vegetal (Jesus et al., 2005; Santos et al., 2007).

A avaliação da diversidade pode ser medida por alguns índices calculados à partir da formação de grupos de bactérias que possuam características em comum. Entre esses índices, os mais utilizados são o índice de diversidade de Shannon-Wiener (H), que considera a diversidade das espécies e sua abundância relativa, o índice de dominância de Simpson (C), que representa a probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso na comunidade pertencerem à mesma espécie ou ao mesmo grupo, e o índice de equitabilidade de Pielou (J), que considera a quantidade de indivíduos distribuídos entre as espécies, e é diretamente proporcional a diversidade e inversamente proporcional a dominância.

Em um estudo conduzido com 433 isolados obtidos de sete solos das regiões da Zona da Mata, do Agreste e do Sertão Pernambucano sob diferentes coberturas vegetais, Santos et al. (2007) observaram uma elevada diversidade de rizóbios nodulantes de espécies leguminosas pertencentes aos gêneros, *Arachis*, *Stylosanthes* e *Aeschynomene*. Os índices de diversidade de Shannon-Wiener variaram de 2,12, em solo da Zona da Mata cultivado com amendoim, até 3,78 em solo do Sertão sob caatinga nativa. Os autores concluíram que a cobertura vegetal é um dos fatores que influencia na composição das comunidades rizobianas.

Relação entre o sistema de uso da terra interferindo na comunidade rizobiana também foi encontrada por Jesus et al. (2005). Os autores avaliaram 257 isolados de siratro em solos da Amazônia Ocidental e obtiveram índices de

diversidade de 2,64 em solo sob floresta, 2,73 em solo sob cultivo de pupunheira e 3,11 em solo sob cultivo de mandioca.

Algumas das características utilizadas para agrupar os rizóbios e calcular os índices de diversidade são de origem morfofisiológica e podem ser extremamente desejáveis na seleção de rizóbios mais adaptados a determinadas condições.

Elboutahiri et al. (2011) estudaram isolados do gênero *Sinorhizobium*, sendo 136 isolados de *Sinorhizobium meliloti* e 21 isolados de *Sinorhizobium medicae*, obtidos de áreas secas e quentes do Marrocos, e verificaram resistência a temperatura e alcalinidade elevadas. De 157 isolados estudados, 57% resistiram à temperatura de 40°C e todos cresceram bem em pH 9.

Lorite et al. (2010) avaliaram isolados obtidos de solos cultivados e não cultivados de uma região semiárida da Espanha. Eles encontraram mais de 50% dos isolados provenientes do solo não cultivado altamente resistentes a salinidade. Enquanto que menos de 10% dos isolados do solo cultivado foram resistentes às mesmas condições de salinidade.

Li et al. (2011) avaliaram uma coleção de 215 isolados de rizóbios da província de Hebei, China. Destes, 214 isolados foram identificados como pertencentes aos gêneros *Bradyrhizobium* e *Sinorhizobium*. A análise da distribuição regional destes isolados mostrou que estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* foram encontradas apenas em solos com pH neutro ou levemente alcalino. Já as estirpes de *Bradyrhizobium yuanmingense*, *Bradyrhizobium liaoningense* e cinco espécies de *Sinorhizobium* só ocorriam em solos alcalinos salinos. Algumas preferências podem ser detectadas entre a espécie ou gênero de rizóbio e as características do solo do local de origem (Lafay & Burdon, 1998).

2.6. Leguminosas para adubos verdes

A técnica de adubação verde consiste no manejo de plantas, geralmente leguminosas e gramíneas, visando à melhoria e a manutenção da capacidade produtiva do solo. Essas plantas podem ser cultivadas em rotação, sucessão ou consorciação para atuarem como cobertura viva do solo ou serem adicionadas ao solo como resíduo orgânico, nesse caso, podendo ser incorporado ou não ao solo (Capeche et al., 2008).

A utilização de leguminosas para adubação verde se torna interessante, pelo potencial para FBN dessas plantas, resultando em maior teor de nitrogênio no tecido vegetal que outras espécies não leguminosas, portanto uma relação C/N mais estreita, favorecendo a mineralização de nitrogênio. Desta forma, a adubação verde pode contribuir para aumentar as quantidades de nitrogênio disponível no solo, visando suprir boa parte da demanda de nitrogênio da cultura subsequente. A tabela 2 apresenta algumas das culturas leguminosas e não leguminosas mais recomendadas no Brasil para utilização como adubo verde, sua produção de matéria seca, quantidade de nitrogênio presente no tecido vegetal e relações C/N.

Tabela 2. Produção de matéria seca, quantidade de nitrogênio presente no tecido vegetal incorporado ao solo e relação C/N de algumas plantas utilizadas como adubo verde.

Adubo verde	Matéria seca	N incorporado ao solo	Relação C/N
	----- kg ha ⁻¹ -----		
Não leguminosas			
Aveia preta	6.863	55	43
Nabo forrageiro	4.379	101	18
Leguminosas			
Crotalaria juncea	6.000-10.500	100-300	28
Crotalaria spectabilis	6.000	137	20
Ervilha forrageira	3.154	79	16
Ervilhaca comum	8.516	86	16
Feijão-de-porco	5.527-15.000	100-300	17
Guandu anão	4.807	103	23
Mucuna cinza	7.243	179	21
Mucuna preta	6.801-7.062	161-214	23
Tremoço-azul	4.890	111	15

Fonte: Oliveira et al. (2002) e Silva (2008)

Os resultados indicam algumas espécies leguminosas que se destacam na produção de matéria seca e quantidade de nitrogênio adicionado ao solo, como as crotalárias juncea e spectabilis, feijão de porco e as mucunas cinza e preta.

2.7. Adubação verde na cana-de-açúcar

A adubação verde pode proporcionar melhorias nas características físicas, químicas e biológicas dos solos, além de prover alterações que podem reduzir o manejo e o custo de manutenção da produção (Carvalho et al., 2008; Garrido et al., 2008; Inomoto et al., 2008; Lange et al., 2009; Delarmelinda et al., 2010; Longo et al., 2011).

A cultura da cana-de-açúcar pode ser beneficiada pelo nitrogênio proveniente da adubação verde, porém estudos sobre taxa de liberação de nitrogênio por esses adubos e sua absorção pela cultura da cana-de-açúcar nas regiões produtoras do Estado de Pernambuco nunca foram realizados.

Em outras regiões do Brasil alguns trabalhos já foram conduzidos, como o de Resende et al. (2003) que observaram dois ciclos de crescimento da cana-de-açúcar, plantada após cultivo dos adubos verdes *Crotalaria juncea* e *C. spectabilis*. Os adubos verdes produziram uma biomassa de 2,6 e 0,7 t ha⁻¹ respectivamente, e acumularam 64 e 16 kg ha⁻¹ de nitrogênio respectivamente. Deste total de nitrogênio acumulado na *C. juncea*, 45 kg foi proveniente da FBN, enquanto, na *C. spectabilis*, essa quantidade foi de 15 kg. No segundo ciclo, o plantio dos adubos verdes foi realizado sobre a soqueira, e resultou em uma produção de biomassa seca de 0,99 e 1,42 t ha⁻¹ para *C. juncea* e *C. spectabilis* respectivamente, com nitrogênio acumulado de 24 e 43 kg ha⁻¹. Após 300 dias de cultivo, o teor de nitrogênio presente nas folhas da cana-de-açúcar cultivadas nas áreas com adubação verde foi semelhante ao da cana que recebeu 100 kg ha⁻¹ de nitrogênio na forma de ureia.

Os resultados, apesar de serem bastante variáveis, demonstram o potencial existente na adubação verde com leguminosas para a cultura da cana-de-açúcar, especialmente com a utilização de crotalaria juncea, mas ainda existem vários mecanismos que precisam ser esclarecidos para a maximização dos benefícios desta prática.

Ambrosano et al., (2009) avaliaram o desempenho da cana-de-açúcar IAC-87-3396 cultivada em rotação com leguminosas adubos verdes e amendoins em Argissolo Vermelho Amarelo distrófico. A leguminosa que mais produziu massa seca foi a crotalaria juncea (10,2 t ha⁻¹), seguida da mucuna-preta (4,4 t ha⁻¹) e dos amendoins, IAC-Caipó (3,2 t ha⁻¹) e Tatu (1,9 t ha⁻¹). Após cinco cortes o melhor desempenho da cana-de-açúcar foi medido no

tratamento com crotalária juncea, resultando em maior rendimento de colmos de cana e maior produção de açúcar.

Trabalhos utilizando a cultura da cana-de-açúcar como beneficiária da adubação verde, e as medições das contribuições do nitrogênio proveniente do adubo verde na nutrição da cana são realizados por poucos grupos de pesquisa no Brasil. As metodologias mais apropriadas para isto, como a utilização de técnicas isotópicas, exigem conhecimento técnico avançado e instrumentos laboratoriais refinados, o que limita a utilização da técnica.

Ambrosano et al., (2011) avaliou o uso de nitrogênio proveniente de crotalária juncea pela cultura da cana de açúcar. Dos 197 kg ha⁻¹ de nitrogênio adicionados ao solo na forma de adubo verde, as duas primeiras safras da cana-de-açúcar absorveram de 19 a 21%, o que representaria aproximadamente 40 kg ha⁻¹ de nitrogênio. Apesar de parecer uma quantidade modesta, isto pode representar de 20 a 40% da necessidade da cultura, que acumula em sua parte aérea de 180 a 250 kg ha⁻¹ de nitrogênio no primeiro ciclo, e de 120 a 180 kg ha⁻¹ de nitrogênio nos ciclos seguintes (Otto et al., 2007).

Contribuindo para a variabilidade das respostas dos adubos verdes no fornecimento de nitrogênio para a cultura da cana-de-açúcar, a produção de biomassa da crotalária juncea pode variar bastante, em torno de 4 a 10 t ha⁻¹ (Torres et al., 2008; Ambrosano et al., 2009), já a mucuna preta produz menos biomassa, em torno de 4 a 5 t ha⁻¹ (Ambrosano et al., 2009; Ambrosano et al., 2010). O acúmulo de nitrogênio na parte aérea destas plantas também varia de 76 a 234 kg ha⁻¹ para a crotalária (Torres et al., 2008; Mascarenhas et al., 1994), e 105 a 215 kg ha⁻¹ para a mucuna preta (Torres et al., 2008; Mascarenhas et al., 1994).

A quantidade do nitrogênio presente nos adubos verdes proveniente da FBN poderia suprir boa parte da demanda nutricional da cana-de-açúcar pelo nutriente. Parte desse nitrogênio acumulado pelo adubo verde pode ser aproveitado pela cana-de-açúcar, mas as pesquisas indicam que estas quantidades podem variar bastante. Em crotalária e mucuna preta, a porcentagem de N derivado da fixação nessas espécies foi respectivamente de 69 e 62 % respectivamente (Ambrosano et al., 2010), portanto, do acúmulo de nitrogênio de 97 kg ha⁻¹ e 109 kg ha⁻¹ por cada espécie respectivamente, 67 e 67,5 kg ha⁻¹ foram provenientes da fixação.

Referências

ALEXANDRE, A.; LARANJO, M.; OLIVEIRA, S. Natural populations of chickpea rhizobia evaluated by antibiotic resistance profiles and molecular methods. **Microbial Ecology**, v. 51, p. 128-136, 2006.

AMBROSANO, E. J.; AZCÓN, R.; CANTARELLA, H.; AMBROSANO, G. M. B.; SCHAMMASS, E. A.; MURAOKA, T.; TRIVELIN, P. C. O.; ROSSI, F.; GUIRADO, N.; UNGARO, M. R. G.; TERAMOTO, J. R. S. Crop rotation biomass and arbuscular mycorrhizal fungi effects on sugarcane yield. **Scientia Agricola**, v. 67, p. 692-701, 2010.

AMBROSANO, E.J.; TRIVELIN, P.C.O.; CANTARELLA, H.; AMBROSANO, G.M.B.; SCHAMMASS, E.A.; MURAOKA, T.; GUIRADO, N.; ROSSI, F. Nitrogen supply to corn from sunn hemp and velvet bean green manures. **Scientia Agricola**, v.66, n.3, p.386-394, 2009.

AMBROSANO, E.J.; TRIVELIN, P.C.O.; CANTARELLA, H.; AMBROSANO, G.M.B.; SCHAMMASS, E.A.; MURAOKA, T.; GUIRADO, N.; ROSSI, F. ¹⁵N-labeled nitrogen from green manure and ammonium sulfate utilization by the sugarcane ratoon. **Scientia Agricola**, v.68, n.3, p.361-368, 2011.

BALLARD, R. A.; CHARMAN, N.; MCINNES, A.; DAVIDSON, J. A. Size, symbiotic effectiveness and genetic diversity of field pea rhizobia (*Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*) populations in South Australian soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, p. 1347-1355, 2004.

BOTTOMLEY, P. J. Microbial ecology. In: SYLVIA, D. M. et al. **Principles and applications of soil microbiology**. 2.ed. New Jersey: Upper Saddle River, 2005. p. 463-488.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia (MME) e Empresa de Pesquisa Energética (EPE). Secretaria de Petróleo, Gás Natural e Combustíveis Renováveis. **Boletim Mensal dos Combustíveis Renováveis**, nº 57, 2012. Disponível em: http://www.mme.gov.br/spg/galerias/arquivos/publicacoes/boletim_mensal_com

[bustiveis renovaveis/Boletim DCR nx 057 - outubro de 2012.pdf](#). Acesso em 14/11/2012.

CANFIELD, D. E.; GLAZER, A. N.; FALKOWSKI, P. G. The Evolution and Future of Earth's Nitrogen Cycle. **Science**, v. 330, n. 6001, p. 192-196, 2010.

CAPECHE, C. L.; MACEDO, J. R.; MELO, A. S. **Estratégias de Recuperação de Áreas Degradadas**. In: TAVARES, S. R. L.; MELO, A. S.; ANDRADE, A. G.; ROSSI, C. L.; CAPECHE, C. L. (Eds.). Curso de recuperação de áreas degradadas: a visão da Ciência do Solo no contexto do diagnóstico, manejo, indicadores de monitoramento e estratégias de recuperação. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2008. p.134-173.

CARVALHO, A.M.; BUSTAMANTE, M.M.C.; SOUSA JUNIOR, J.G.A.; VIVALDI, L.J. Decomposição de resíduos vegetais em latossolo sob cultivo de milho e plantas de cobertura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 32, p. 2831-2838, 2008.

CATTELAN, A. J. **Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal**. Londrina: Embrapa Soja, 1999. p. 36.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N. Caracterização fenotípica de rizóbio nativos isolados de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 32, p. 161-169, 2010.

CHANG, Y. L.; WANG, E. T.; SUI, X. H.; ZHANG, X. X.; CHEN, W. X. Molecular diversity and phylogeny of rhizobia associated with *Lablab purpureus* (Linn.) grown in Southern China. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, p. 276-284, 2011.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira : cana-de-açúcar, primeiro levantamento, abril/2014 - Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília : Conab 2014. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_04_15_15_44_37_bol_etim_cana_portugues_-_1o_lev_-_14.pdf acesso em 20/04/2014.

COSTA, J. V. T. **Adubação verde e nitrogênio no desenvolvimento e produção de cana-planta**. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2009. Tese de doutorado em Agronomia - Ciência do Solo.

DAS, A. C.; DEBNATH, A.; MUKHERJEE, D. Effect of the herbicides oxadiazon and oxyfluorfen on phosphates solubilizing microorganisms and their persistence in rice fields. **Chemosphere**, v. 53, p. 217-221, 2003.

DELARME LINDA, E.A.; SAMPAIO, F.A.R.; DIAS, J.R.M.; TAVELLA, L.B.; SILVA, J.S. Adubação verde e alterações nas características químicas de um Cambissolo na região de Ji-Paraná-RO. **Acta Amazonica**, v.40, p.625-628, 2010.

ELBOUTAHIRI, N.; THAMI-ALAMI, I.; UDUPA, S. M. Phenotypic and genetic diversity in *Sinorhizobium melilot* and *S. medicae* from drought and salt affected regions of Morocco. **BMC Microbiology**, v. 10, p. 1-13, 2010.

ENEBAK, S.A.; WEI, G.; KLOEPPER, J.W. Effects of plant-growth-promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedling. **Forest Science**, v. 44, p. 139-144, 1998.

FAGERLI, I. L.; SVENNING, M. M. Arctic and subarctic soil populations of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* nodulating three different clover species: Characterisation by diversity at chromosomal and symbiosis loci. **Plant and Soil**, v. 275, p. 371-381, 2005.

FARIAS, C. H. A., FERNANDES, P. D., AZEVEDO, H. M., DANTAS NETO, J. Índices de crescimento da cana-de-açúcar irrigada e de sequeiro no Estado da Paraíba. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 12, p. 356-362, 2008.

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

FONTOURA, R. A.; FRIZZO, M. L. S.; SÁ, E. L. S.; OSÓRIO FILHO, B. D.; TONON, B. C.; BINZ, A.; SILVA, M. C.; CAMARGO, F. A. O.; SELBACH, P. A. Rizóbios nativos do Rio Grande do Sul simbioticamente eficientes em *Lotus glaber*. **Ciência Rural**, v. 41, p. 440-446, 2011.

GARRIDO, M.S.; SOARES, A.C.F.; COIMBRA, J.L.; SOUSA, C.S. Management of crotalaria and pigeon pea for control of yam nematode diseases. *Summa phytopathology*. v. 34, n.3, p. 222-227, 2008.

GAUT, B.S. Evolutionary dynamics of grass genomes. *New Phytologist*, v. 154. p.15–28, 2002.

GRAHAM, P. H.; VANCE, C. P. Legumes: Importance and constraints to greater use - Update on legume utilization. *Plant Physiology*. v.131, p. 872-877, 2003.

HAN, J.; SUN, L.; DONG, X.; CAI, Z.; SUN, X.; YANG, H.; WANG, Y. & SONG, W. Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various pathogens. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 28, p.66–76, 2005.

INOMOTO, M.M.; ANTEDOMÊNICO, S.R.; SANTOS, V.P.; SILVA, R.A.; ALMEIDA, G.C. Avaliação em casa de vegetação do uso de sorgo, milho e crotalaria no manejo de *Meloidogyne javanica*. *Tropical Plant Pathology*. v. 33, n.2, p. 125-129, 2008.

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

LAFAY, B.; BURDON, J. J. Molecular diversity of rhizobia occurring on native shrubby legumes in southeastern Australia. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 64, p. 3989-3997, 1998.

LAKSHAMANAN, P., GEIJSKES, R. J., AITKEN, K. S., GROF, C. L. P., BONNETT, G. D., SMITH, G. R. Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*. v. 41. p. 345-363, 2005.

LANGE, A.; BOLOGNAI, I. R.; FARONI, C. E.; TRIVELIN, P. C. O. Aproveitamento pelo trigo do nitrogênio residual da crotalaria (*Crotalaria*

juncea) e da uréia aplicado ao solo em cultivo precedente. **Ciência Rural**, v.39, p. 1715-1720, 2009.

LANGER, H., NANDASENA, K. G., HOWIESON, J. G., JORQUERA, M., BORIE, F. Genetic diversity of *Sinorhizobium meliloti* associated with alfalfa in Chilean volcanic soils and their symbiotic effectiveness under acidic conditions. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 24, p. 301-308, 2008.

LI, Q. Q.; WANG, E. T.; ZHANG, Y. Z.; ZHANG, Y. M.; TIAN, C. F.; SUI, X. H.; CHEN, W. F.; CHEN, W. X. Diversity and Biogeography of Rhizobia Isolated from Root Nodules of *Glycine max* Grown in Hebei Province, China. **Microbial Ecology**, v. 61, p. 917-931, 2011.

LIMA, A.A.; FERNANDES JÚNIOR, P.I.; PASSOS, S.R.; PAULO, F.S.; NOSOLINE, S.M.; FARIA, S.M.; GUERRA, J.G.M.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R. Diversidade e capacidade simbiótica de rizóbios isolados de nódulos de *Mucuna-Cinza* e *Mucuna-Anã*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, p. 337-348, 2012 .

LONGO, R. M.; RIBEIRO, A. R.; MELO, W. J. Recuperação de solos degradados na exploração mineral de cassiterita: biomassa microbiana e atividade da desidrogenase. **Bragantia**, v.70, p.132-138, 2011.

LORITE, M. J.; MUÑOZ, S.; OLIVARES, J.; SOTO, M. J.; SANJUÁN, J. Characterization of strains unlike *Mesorhizobium loti* that nodulate *Lotus* spp. In saline soils of Granada, Spain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 4019-4026, 2010.

MARIANO, R.L.R.; KLOEPPER, J.W. Método alternativo de biocontrole: resistência sistêmica induzida por rizobactérias. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 8, p. 121-137, 2000.

MARTINS, A. F.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; SAMPAIO, J. A. T.; ARAÚJO, J. H. B.; TURCATEL, A. T.; DIEMER, G. D.; SÁ, E. L. S. Diversidade genética, tolerância aos fatores de acidez e eficiência simbiótica de rizóbios para cornichão de solos do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p. 1855-1864, 2011.

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

MASCARENHAS, H.A.A.; TANAKA, R.T.; COSTA, A.A.; ROSA, F.V.; COSTA, F.V. **Efeito residual das leguminosas sobre o rendimento físico e econômico da cana planta**. Boletim Científico IAC, 32, 1994. 15p.

MATSUDA, A.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Tolerância de rizóbios de diferentes procedências ao zinco, cobre e cádmio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, p. 343-355, 2002.

MELO, I.S.M.; AZEVEDO, J.L. (Eds.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, Cap.1, p. 15-60, 1998.

MILANEZ, A.Y.; NYKO, D.; GARCIA, J.L.F.; REIS, L.S.F.S. O déficit de produção de etanol no Brasil entre 2012 e 2015: determinantes, consequências e sugestões de política. BNDES Setorial, 35: p.277-302, 2012. Disponível em: http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/bnset/set3508.pdf. Acesso em 14/11/2012.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 13, DE 24 DE MARÇO DE 2011. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília, 25 de março de 2011.

MOREIRA F.M.S.; SIQUEIRA J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Ed :Lavras, p. 449-542, 2006.

ODEE, D. W.; HAUKKA, K.; MCINROY, S. G.; SPRENT, J. I.; SUTHERLAND, J. M.; YOUNG, J. P. W. Genetic and symbiotic characterization of rhizobia isolated from tree and herbaceous legumes grown in soils from ecologically diverse sites in Kenya. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, p. 801-811, 2002.

OTTO, R.; FARIA, M. R. M.; QUEIROZ, F. E. C.; MOURA, T. A.; VITTI, G. C.; CANTARELLA, H. Rendimento da cana-de-açúcar é afetado por flúor. **Bragantia**, v. 66, p. 505-509, 2007.

PELCZAR, JR.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. Microbiologia do Solo e do Ar. In: PELCZAR, JR.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. v. 2, Makron Books do Brasil Editora Ltda. 306-336. 1997.

PERIN, A.; GUERRA, J.G.M.; TEIXEIRA, M.G. Cobertura do solo e acumulação de nutrientes pelo amendoim forrageiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, p.791-796, 2003.

RESENDE, A. S. de; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. **Técnicas utilizadas na quantificação da fixação biológica de nitrogênio**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2003. 26 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 165).

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v.17, n.4-5, p.319-339, 1999.

RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P. Fixação biológica de nitrogênio. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (ed.). **Feijão-caupi: Avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa, 2005, cap. 8, p.279-335.

SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C. P.; RUNJANEK, N. G.; BORGES, W. L.; BEZERRA, R. V.; FREITAS, A. D. S. Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 2, p. 249-256, 2007.

SARAIVA, C. N., LIRA JUNIOR, M. A., STAMFORD, N. P., FREIRE, M. B. G. S., SOUSA, C. A. Produção do caupi (*Vigna unguiculata* L. walp) sob efeito de adubação verde e diferentes fontes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 579-587, 2008.

SEBBANE, N.; SAHNOUNE, M.; ZAKHIA, F.; WILLEMS, A.; BENALLAOUA, S.; LAJUDIE, P. Phenotypical and genotypical characteristics of root-nodulating bacteria isolated from annual *Medicago* spp. in Soummam Valley (Algeria). **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, p. 235-241, 2006.

SILVA, V. N.; SILVA, L. E. S. F.; FIGUEIREDO, M. V. B.; CARVALHO, F. G.; SILVA, M. L. R. B.; SILVA, A. J. N. Caracterização e seleção de populações

nativas de rizóbios de solo da região semiárida de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 37, p. 16-21, 2007.

TORRES, J. R. L.; PEREIRA, M. G.; FABIAN, E. J. Produção de fitomassa por plantas de cobertura e mineralização de seus resíduos em plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.3, p.421-428, 2008.

TÓTOLA, M. R.; CHAER, G. M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. In: VENEGAS, V. H. A. et al. (Eds.). **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 2. p. 195-276, 2002.

UCHÔAS, E. S.; FARIA, S. M. **Seleção de estirpes de rizóbio para sansão preto (*Mimosa sp*), dormideira comprida (*Mimosa quadrivalis*) e dormideira gigante (*Mimosa sp*). leguminosas florestais com potencial uso na recuperação de áreas degradadas**. Comunicado Técnico 89, 2006.

YATES, R. J.; HOWIESON, J. G.; NANDASENA, K. G.; O'HARA, G. W. Root-nodule bacteria from indigenous legumes in the north-west of Western Australia and their interaction with exotic legumes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, p. 1391-1329, 2005.

WEIR, B. S. **The current taxonomy of rhizobia**. New Zealand rhizobia website. <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.>, Last updated: 10 April, 2012.

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

3.CAPÍTULO 1

Diversidade bacteriana obtida de nódulos de adubos verdes e relação com os solos de origem de regiões canavieiras do nordeste

RESUMO

A utilização de bactérias fixadoras de nitrogênio e adubação verde com leguminosas pode resultar em boa produtividade da cultura da cana-de-açúcar com menor degradação ambiental. O conhecimento da diversidade rizobiana pode auxiliar a compreender as respostas à inoculação em diferentes condições edafoclimáticas. O objetivo desse trabalho foi avaliar a diversidade de isolados rizobianos de crotalária espectabilis (*Crotalaria spectabilis*) e mucuna preta (*Schizolobium aterrimum*) obtidos em solos de cana-de-açúcar. Foram coletadas 260 amostras de solo nos estados de Alagoas, Pernambuco e Paraíba e determinadas características químicas, físicas e meteorológicas das áreas. Plântulas de crotalária espectabilis e mucuna preta foram cultivadas em vasos de Leonard contendo mistura areia:vermiculita (1:1) e um grama de cada amostra de solo serviu como inoculante para formação de nódulos. Aos 60 dias os nódulos foram coletados e esmagados em placa de petri contendo meio de cultura YM para caracterização morfológica dos isolados. Foram construídos dendrogramas de similaridade com todos os isolados, e individuais por planta isca para cálculos dos índices de Shannon-Wiener, de Simpson e de Pielou. A autenticação dos isolados foi realizada em sua planta de origem cultivada em vaso de Leonard de mesma forma que no experimento de obtenção dos nódulos. Foi inoculado 5 mL de cada isolado multiplicado em meio de cultura YM. Foram autenticados 108 e 39 isolados em crotalária e mucuna respectivamente. O crescimento rápido e elevada produção de muco foram características comuns para a maioria dos isolados. Os dendrogramas demonstraram alta diversidade morfológica pela formação de 87 grupos da crotalária e 30 grupos da mucuna. A maioria dos grupos apresentou apenas um isolado. Diferentes grupos de bactérias provenientes de um mesmo solo se associaram a crotalária ou a mucuna. As características de pH, teores de Na, Ca, Mg, K, Al, CO, e teores de areia, silte e argila responderam por metade da variação existente nas características dos solos. Não foi observada relação

entre as características de solos de cana-de-açúcar e as características morfológicas dos isolados.

Introdução

Crotalaria spectabilis (*Crotalaria spectabilis*) e mucuna preta (*Schizolobium aterrimum*) são duas leguminosas muito utilizadas como adubos verdes no Brasil (Barreto e Fernandes, 2001; Espíndola et al., 2005; Mateus e Wutke, 2006). Os centros de origem do gênero *Crotalaria* são principalmente a África e a Índia (Flores & Miotto, 2005), regiões caracterizadas por terem parte de seu território com mesmas condições climáticas do Brasil. Já as mucunas possuem distribuição em todas as regiões tropicais do mundo, no entanto tem como principal centro de diversidade a América do Sul (Moura et al., 2013).

Diversas leguminosas usadas na adubação verde se associam com bactérias fixadoras de N₂, o que resulta em um grande aporte deste nutriente ao sistema solo-planta (Perin et al., 2003). Estimativas de quantidades de N incorporado ao solo por *crotalaria spectabilis* e mucuna preta situam-se em torno de 137 e de 162 a 214 kg ha⁻¹, respectivamente (Oliveira et al., 2002).

As espécies de *Crotalaria* e a mucuna formam simbiose com diversos gêneros de bactérias fixadoras de N₂ (Samba et al., 1999; Lombardi et al., 2009; Lima et al., 2012; Aserse et al., 2013). Por exemplo, as espécies do gênero *Crotalaria* são hospedeiras específicas de *Methylobacterium* spp. (Sy et al., 2001; Liu, et al., 2007; Renier et al., 2011).

No Brasil, diversos autores (Bratti et al., 2005; Lombardi et al., 2009; Lima et al., 2010; Lima et al., 2012) relatam a ocorrência natural de isolados bacterianos nodulando as espécies *crotalaria spectabilis* e mucuna preta, o que potencializa o uso dessas espécies como adubo verde. A avaliação da diversidade rizobiana de ocorrência natural em determinados solos pode trazer grandes benefícios aos sistemas produtivos, pois são adaptadas à condições de solo e clima local.

O primeiro trabalho avaliando diversidade de isolados em espécies do gênero *Crotalaria* foi publicado por Samba et al. (1999). Os autores avaliaram 117 isolados obtidos de 12 espécies de *crotalaria* no Senegal e verificaram que a maioria dos isolados foi de crescimento rápido e possuía uma especificidade maior, nodulando apenas com algumas espécies do gênero *Crotalaria*, já os de

crescimento lento, nodularam com outras espécies de *Crotalaria* além de *Acacia* e *Indigofera*.

Entre as ferramentas utilizadas para avaliar a diversidade, os índices de diversidade de Shannon-Wiener, Simpson e Pielou são alguns dos mais utilizados para o estudo das comunidades bacterianas.

Pinheiro et al. (2010) avaliou 63 isolados de cunhã obtidos de um Neossolo Flúvico e observou um índice de Shannon-Wiener de 3,36, valor semelhante ao encontrado por Santos et al. (2007) em populações de rizóbio nodulando leucena em solos do sertão de Pernambuco.

Estudos sobre a adubação verde no sistema produtivo da cana-de-açúcar evidenciam benefícios no uso de espécies leguminosas, a exemplo da crotalária juncea, crotalária spectabilis e da mucuna preta (Scheuer & Tomasi, 2011; Ambrosano et al., 2005; Ambrosano et al., 2011 a e b; Ambrosano et al., 2013). No entanto, estas leguminosas foram utilizadas sem inoculação, portanto nodularam com espécies de rizóbios nativas das áreas em estudo, ou em outros estudos, foram inoculadas com estirpes recomendadas provenientes de regiões com outras condições edafoclimáticas (Costa, 2009; Ambrosano et al., 2010).

O fato das pesquisas demonstrarem bons resultados dessas leguminosas na ausência da inoculação confirma que nos solos brasileiros existe uma população rizobiana eficiente na fixação biológica de nitrogênio para as leguminosas crotalária spectabilis e mucuna preta, no entanto, ainda não se conhece a diversidade, os níveis de especificidade e de eficiência simbiótica da comunidade rizobiana presente nos solos de regiões canavieiras.

Diante do contexto o objetivo deste estudo foi avaliar a diversidade e a distribuição geográfica de rizóbios isolados de mucuna preta e crotalária spectabilis em diferentes regiões canavieiras da Região Nordeste do Brasil.

Material e métodos

Espécies-isca

Foram avaliadas as espécies mucuna preta (*Schizolobium aterrimum*) e crotalária spectabilis (*Crotalaria spectabilis*) (Saraiva et al., 2008; Costa, 2009).

Obtenção de nódulos

O estudo foi conduzido à partir de solos coletados nas Usinas Japungu, Paraíba; Petribu e Trapiche, Pernambuco; e Coruripe, Alagoas (Figura 1). Em cada usina foram selecionadas áreas representando as diferentes condições de produção.



Figura 1: Localização geográfica das usinas produtoras de cana-de-açúcar onde foram coletadas as amostras de solos. Imagem: Google Earth.

Em cada área experimental foram retiradas 20 amostras simples da camada de 0 a 10 cm de profundidade do solo, sendo, de cada amostra simples, separada uma porção para utilização como inóculo nos adubos verdes e obtenção de nódulos para o isolamento das bactérias. Cada porção de solo reservado ao inóculo foi conservada em refrigerador a aproximadamente 4°C. O solo restante de cada amostra simples foi misturado formando uma amostra composta por área experimental. Após mistura e peneiramento das amostras compostas, foram realizadas as caracterizações físicas e químicas dos solos (Barreto et al., 1997; EMBRAPA, 1999). Os resultados dessas análises, bem como do número de áreas coletadas por usina e suas características meteorológicas estão descritas nas tabelas 1 e 2.

Os dados da caracterização química, física e meteorológica das áreas amostradas foram submetidos à análise multivariada utilizando a técnica dos

componentes principais e análise de agrupamento utilizando o método das ligações simples e a distância euclidiana como coeficiente de similaridade.

Tabela 1: Características químicas dos solos das 13 áreas canavieiras nos estados de AL, PE e PB, região Nordeste do Brasil.

Estado Usina	Área	pH água	P mg.dm ⁻³	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al ³⁺	CO g kg ⁻¹
				-----cmol _c .dm ⁻³ -----						
AL Coruripe	1	5,9	41,5	0,05	0,12	2,1	0,67	0,00	3,51	8,37
	2	6,1	50,1	0,04	0,12	2,3	0,76	0,00	3,11	10,73
	3	6,1	33,9	0,11	0,24	4,7	1,04	0,00	3,31	9,85
	4	4,9	7,9	0,04	0,11	1,5	0,25	0,35	4,95	8,94
	5	6,3	251,3	0,07	0,20	3,2	0,49	0,00	2,93	9,24
PE Trapiche	1	4,3	4,3	0,03	0,11	0,7	0,03	1,00	6,73	17,59
	2	6,0	54,7	0,17	1,64	4,5	1,61	0,00	4,19	21,40
	3	5,7	24,4	0,03	0,04	2,0	0,60	0,00	3,51	11,72
PE Petribu	1	6,4	191,3	0,14	0,12	4,1	0,87	0,00	3,51	10,63
	2	5,4	5,7	0,11	0,16	3,5	1,04	0,00	3,95	9,30
	3	5,0	19,5	0,13	0,64	2,2	0,67	0,10	4,43	9,30
PB Japungu	1	4,4	2,7	0,03	0,03	0,4	0,41	0,50	3,73	4,04
	2	4,5	3,2	0,03	0,04	0,8	0,18	0,75	4,68	6,15

CO – carbono orgânico

Tabela 2: Características físicas e meteorológicas, classificação do solo e posição geográfica das 13 áreas canavieiras nos estados de AL, PE e PB, região Nordeste do Brasil.

Estado Usina	Área	Areia -----%-----	Silte	Argila	Dp g cm ⁻³	Classe textural	Classificação do solo	Tmáx -----°C-----	Tmín	Precip (mm)	UR (%)	Posição Geográfica	Altitude (m)
AL Coruripe	1	87	5	8	2,55	Areia franca	Argissolo amarelo					10°11'26.42" S 36°15'02.46" O	51
	2	90	6	4	2,6	Areia	Espodossolo ferrocárbico					9°40'15.92" S 36°27'26.57" O	254
	3	79	9	12	2,53	Franco arenoso	Argissolo vermelho	29,0	20,9	159,8	78,3	10°05'17.37" S 36°32'33.45" O	132
	4	69	11	20	2,57	Franco arenoso	Plintossolo argilúvico					10°35'35.70" S 36°05'54.57" O	854
	5	87	3	10	2,61	Areia franca	Argissolo acizentado					10°08'22.76" S 36°12'12.81" O	47
PE Trapiche	1	46	12	42	2,53	Franco argilo arenoso	Argissolo amarelo					8°29'39.13" S 35°03'13.98" O	45
	2	28	23	49	2,57	Argila	Latossolo amarelo	29,6	21,6	151,5	77,6	8°26'50.71" S 35°06'03.81" O	79
	3	69	6	25	2,54	Franco argilo arenoso	Argissolo amarelo					8°29'56.06" S 35°02'06.18" O	32
PE Petribu	1	84	9	7	2,57	Areia franca	Argissolo vermelho escuro					7°44'29.98" S 35°11'17.21" O	96
	2	76	13	11	2,54	Franco arenoso	Argissolo vermelho amarelo	30,0	22,3	57,9	60,1	7°45'19.83" S 35°07'54.89" O	73
	3	50	9	41	2,61	Franco argilo arenoso	Latossolo amarelo					7°50'37.12" S 35°11'16.61" O	123
PB Japungu	1	92	1	7	2,64	Areia	Argissolo vermelho amarelo					6°48'29.59" S 34°58'58.90" O	44
	2	90	2	8	2,57	Areia	Argissolo vermelho amarelo	30,2	24,0	164,4	76,5	6°54'37.19" S 34°54'12.26" O	42

Dp – Densidade de partícula; T máx – temperatura máxima (média de 10 anos); T mín – temperatura mínima (média de 10 anos); Precip – precipitação (média de 10 anos); UR – umidade relativa do ar (média de 10 anos)

Sementes de mucuna preta foram submetidas a quebra de dormência por imersão em ácido sulfúrico durante 12 min, e lavadas por 10 vezes em água destilada. As sementes de crotalaria spectabilis sofreram desinfestação superficial submergidas em álcool etílico a 95% durante 1 min e hipoclorito de sódio a 2,5% durante 2 min, com subsequente lavagem por 10 vezes em água destilada. As sementes foram pré-germinadas por três a cinco dias em bandejas de plástico contendo areia esterilizada, e as plântulas foram transplantadas para vasos de Leonard constituídos por um copo plástico descartável com capacidade para 400ml perfurados na parte inferior e recipiente de poliestireno com um orifício em sua tampa de diâmetro igual ao fundo do copo. O copo plástico foi preenchido com uma mistura 1:1 (v/v) de vermiculita e areia lavada autoclavadas e a parte inferior contendo solução nutritiva de Hoagland sem nitrogênio (Hoagland & Arnon, 1950). As plântulas foram inoculadas com 1g de solo das amostras simples.

Aos 60 dias após inoculação, as plantas foram colhidas, os nódulos foram destacados da raiz e conservados em tubos com sílica-gel.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação para cada espécie isca individualmente em um delineamento em blocos casualizados com 13 tratamentos (número de áreas amostradas) e 20 repetições (cada amostra simples foi considerada como uma repetição), totalizando 260 vasos para cada espécie isca.

Isolamento bacteriano

O isolamento de bactérias dos nódulos desidratados foi realizado seguindo o procedimento padrão (Clark, 1965; Hungria, 1994). Os nódulos de cada tubo foram reidratados em água destilada autoclavada, e em seguida imersos em álcool 95% para quebra da tensão capilar superficial, seguido de esterilização por imersão em hipoclorito de sódio a 5% por cinco minutos, e lavados em água destilada esterilizada. O isolamento foi conduzido em placas de Petri com meio YMA, com azul de bromotimol (Vincent, 1970), e as colônias bacterianas foram repicadas tantas vezes quantas foram necessárias até o surgimento de colônias bacterianas isoladas em cada placa.

Autenticação dos isolados

A autenticação dos isolados foi realizada em experimentos separados para cada espécie, de forma semelhante à fase de obtenção dos nódulos.

Cada isolado foi multiplicado separadamente em 10 mL de meio YM adicionado em tubos de ensaio e colocados em agitador horizontal regulado a 120 rpm, por um período de 72 h. Foi utilizado 5 mL de caldo bacteriano para a inoculação das plântulas. Cada isolado foi inoculado na sua espécie de origem.

Aos 45 dias após o transplante, as plantas foram coletadas e verificadas as presenças e ausências de nódulos em suas raízes.

Caracterização dos isolados e diversidade morfológica

A caracterização morfológica foi realizada apenas para os isolados autenticados, e foi baseada nas características descritas na tabela 3 (Vincent, 1974; Araújo, 1994; Hungria, 1994; Somasegaran & Hoben, 1994; Maâtallah et al., 2002; Lima et al., 2005; Alberton et al., 2006; Sebbane et al., 2006; Uchôas & Faria, 2006; Silva et al., 2007).

Tabela 3: Características morfofisiológicas observadas nos isolados bacterianos obtidos em nódulos de mucuna preta e crotalaria spectabilis.

Característica	Classificação
Tempo (em dias)	1 a 3 ou >3
Diâmetro da colônia	<2mm ou >2mm
pH	Ácido; neutro; alcalino
Forma	Puntiforme; circular; irregular
Elevação	Plana; lente; convexa; drop-like; umbanada; umbilicada
Borda	Inteira; ondulada; lobada; denteada; filamentosa; nenhuma
Superfície	Lisa; rugosa; papilosa
Produção de muco	Escasso; pouco; moderado; abundante
Transparência	Opaca; transparente; translúcido
Consistência do muco	Seca; aquosa; gomosa; viscosa; butírica
Cor	Incolor; branca; creme; amarela; rosa
Muco	Homogêneo; heterogêneo
Elasticidade do muco	Com elasticidade; sem elasticidade

A caracterização morfológica foi codificada de forma binária com base na presença (1) ou ausência de cada característica (0) para construção de dendrogramas de similaridade dos isolados autenticados, utilizando a matriz de algoritmos UPGMA e o índice de similaridade de Jaccard. Foram construídos dendrogramas individuais para cada espécie de planta e também com todos os isolados obtidos nas duas espécies.

Além destes, foram construídos dendrogramas de todos os isolados que pertenceram a um mesmo grupo de solo definido na análise de agrupamento das características químicas, físicas e meteorológicas.

A diversidade foi analisada a partir dos dendrogramas e foram formados grupos com 100% de similaridade. Os índices de diversidade foram calculados utilizando o software DivEs v2.0.

A diversidade de isolados foi avaliada através do Índice de Shannon-Wiener (H), definido por:

$$H = - \sum_{i=1}^{S_{obs}} p_i \log_e p_i$$

Onde: p_i é a proporção de indivíduos do $i^{ésima}$ espécie em relação ao total de indivíduos, e S é o número total de espécies.

A dominância foi avaliada através do Índice de Simpson (D), calculado como:

$$D = 1 - \frac{\sum n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

Onde: n_i é o número de indivíduos de cada espécie, e N é o número total de indivíduos.

Para os dois índices citados foram considerados como sendo da mesma espécie os isolados que ficaram inseridos dentro de um mesmo grupo gerado pelo dendrograma.

Os índices de diversidade de Shannon-Wiener para cada grupo de solo foram comparados utilizando o teste t ao nível de 5% de probabilidade utilizando o software DivEs v2.0.

Resultados e discussão

Foram obtidos 369 isolados de *crotalária espectabilis* e 76 isolados de mucuna preta. O menor número de isolados em mucuna preta foi decorrente da baixa nodulação das plantas. De todas as 13 áreas analisadas apenas cinco áreas foram capazes de formar nódulos na mucuna, as três áreas da Usina Trapiche (T1, T2 e T3), uma área da Usina Petribu (P2) e uma área da Usina Coruripe (C4). Na *crotalária*, apenas quatro áreas não formaram nódulos, sendo três da Usina Coruripe (C1, C2 e C3) e uma da Usina Japungu (J1).

Foram autenticados 108 isolados de *crotalária* e 39 isolados de mucuna preta. O percentual de autenticação ficou em 29% e 51% para os isolados obtidos em *crotalária* e mucuna respectivamente.

Um fator que pode ter contribuído com a baixa nodulação tanto na fase de captura como na fase de autenticação dos isolados foi a temperatura elevada no local do experimento. A temperatura é um dos fatores ambientais que mais afeta a nodulação, interferindo em vários estágios da simbiose (Hungria & Vargas, 2000).

Os isolados que não formaram nódulos na fase de autenticação também podem pertencer a grupos de bactérias endofíticas não nodulíferas presentes nos nódulos. Vários gêneros de bactérias já foram observadas nos tecidos do nódulo e que não são formadoras de nódulos em leguminosas como *Agrobacterium*, *Pseudomonas* e *Bacillus* (Kan et al., 2007; Li et al., 2008; Ibáñez et al., 2009) e podem infectar a raiz juntamente com os rizóbios (Hung et al., 2007). Além disso, também deve ser considerada a possibilidade desses isolados serem contaminantes externos.

A *crotalária* obteve isolados autenticados provenientes de todas as Usinas, mas das 13 áreas coletadas, algumas não apresentaram isolados autenticados (Tabela 4).

Tabela 4: Números de isolados autenticados em mucuna preta e crotalária *espectabilis*, de amostras de solo que apresentaram isolados e média de isolados por amostra de solo em 13 áreas canavieiras nos estados de AL, PE e PB, região Nordeste do Brasil.

Estado Região (Usina)	Área	Número de isolados		Número de amostras de solo que apresentaram isolados		Número médio de isolados por amostra de solo	
		Mucuna	Crotalária	Mucuna	Crotalária	Mucuna	Crotalária
Alagoas (Coruripe)	1	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0
	4	1	12	1	3	1	4
	5	0	4	0	1	0	4
Total	-	1	16	1	4	1	4
Pernambuco	1	9	7	1	4	9	1,75
Mata Sul (Trapiche)	2	15	28	2	6	7,5	4,7
	3	14	6	3	4	4,6	1,5
Total	-	38	41	6	14	6,3	2,9
Pernambuco	1	0	8	0	2	0	4
Mata Norte (Petribu)	2	0	14	0	6	0	2,3
	3	0	6	0	3	0	2
Total	-	0	28	0	11	0	2,5
Paraíba	1	0	0	0	0	0	0
(Japungu)	2	0	23	0	6	0	3,8
	Total	-	0	23	0	6	0

Os solos da Usina Trapiche foram os que apresentaram o maior número de isolados autenticados em crotalária e maior número de amostras simples que tiveram isolados autenticados (Tabela 4). Dentro desta região, a área 2 foi a que apresentou os maiores números de isolados autenticados, amostras que tiveram isolados autenticados e média de isolados autenticados por amostra de solo. Isso demonstra que a proximidade geográfica entre uma área e outra na mesma usina, pode não ser determinante para a presença de isolados que nodulem crotalária. Outros fatores podem estar envolvidos na seleção da população que pode nodular uma leguminosa. A área 2 da Usina Trapiche apresenta boas características químicas, maior teor de matéria orgânica e a única que apresenta o solo argiloso, entre as áreas de todas as Usinas estudadas (Tabelas 1 e 2).

Lombardi et al. (2009) analisaram a ocorrência de rizóbios em solos de cinco áreas com diferentes coberturas vegetais no estado de São Paulo. Nas três leguminosas analisadas, uma delas *Crotalaria juncea*, o solo que proporcionou mais unidades formadoras de colônias de rizóbios nas raízes das plantas tinha o maior teor de matéria orgânica e era o menos ácido. Os

resultados obtidos por esses autores são semelhantes aos deste estudo. O solo da área 2 da Usina Trapiche é o que possui o maior teor de carbono orgânico, com $21,40 \text{ g kg}^{-1}$ refletindo conseqüentemente em maior teor de matéria orgânica entre todos os solos estudados, e pH 6,0; sendo também um dos menos ácidos (Tabela 1). Segundo os mesmos autores, o pH e $\text{H} + \text{Al}$ são propriedades do solo que afetam o crescimento de rizóbios e podem influenciar a disponibilidade de alguns nutrientes importantes para os rizóbios, como fósforo e cálcio. No solo da área 2 da Usina Trapiche também foi verificado que o teor de cálcio foi um dos mais elevados entre todos os solos, com $4,5 \text{ cmol}_c.\text{dm}^{-3}$ e o teor de fósforo foi de $54,7 \text{ mg.dm}^{-3}$. Estes resultados demonstram que as características químicas do solo exercem influência na população rizobiana.

Exceto um isolado proveniente da área 4 da Usina Coruripe, todos os outros 38 isolados de mucuna preta foram provenientes de áreas da Usina Trapiche. A ausência de isolados de mucuna nos solos das Usinas Petribu e Japungu, pode indicar que estas áreas não possuem bactérias capazes de nodular mucuna preta, ou se possuem, este estudo não detectou.

Todos os isolados de mucuna preta apresentaram crescimento entre um e três dias, sendo considerados de crescimento rápido. Além disso, outras características morfofisiológicas foram observadas na maioria dos isolados, como o diâmetro da colônia $< 2\text{mm}$, reação neutra de pH, forma circular, borda inteira, superfície lisa, muco homogêneo e sem elasticidade (Figura 2). Bratti et al. (2005) analisaram características morfológicas de rizóbios em um sistema agroecológico no estado do Rio de Janeiro e verificaram uma grande diversidade nas características das bactérias isoladas. Seus resultados demonstraram que a maioria dos isolados obtidos de plantas do gênero *Mucuna* apresentou crescimento rápido, no entanto, ao contrário do que foi encontrado neste estudo, eles acidificaram o meio de cultura.

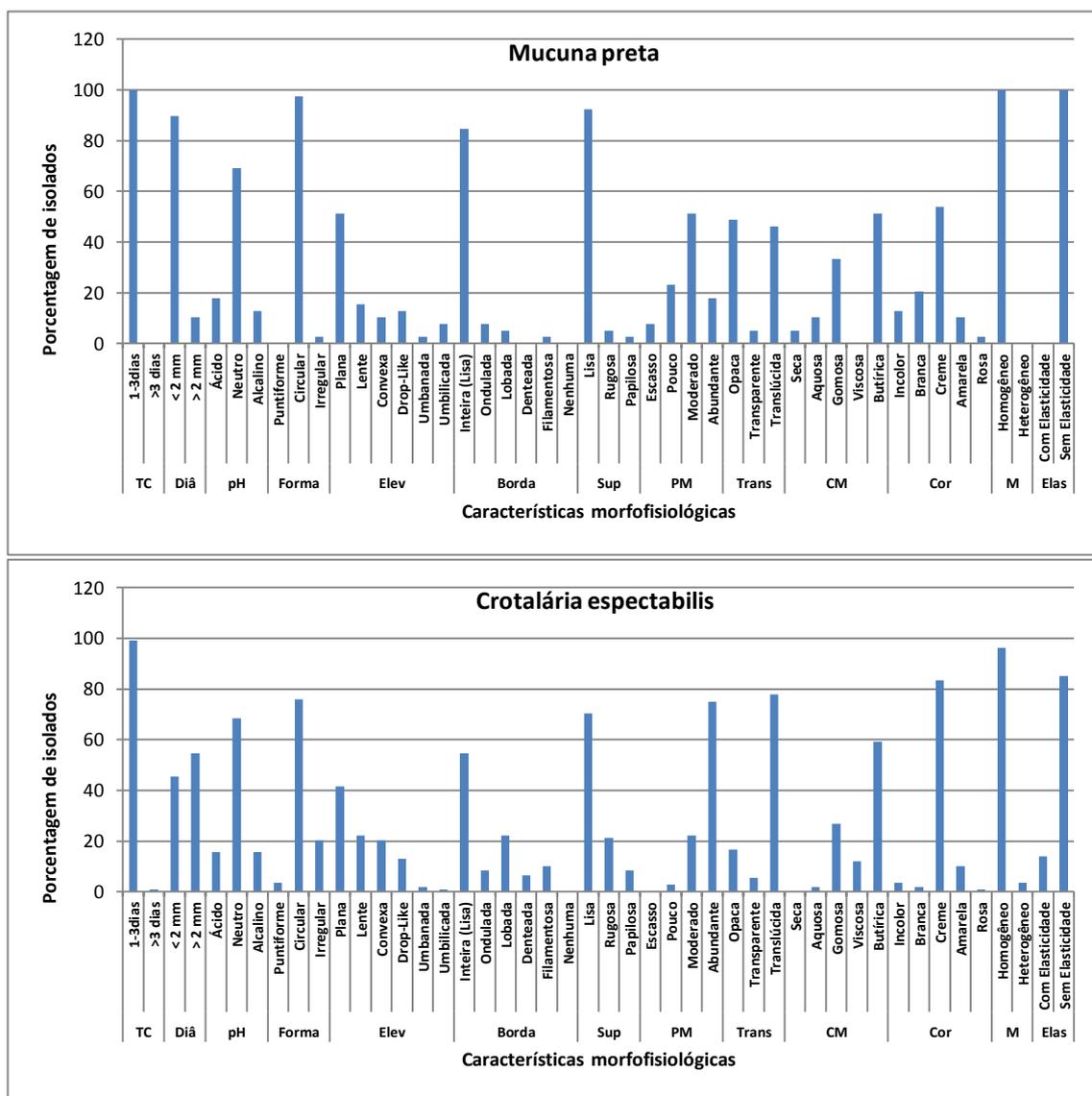


Figura 2: Características morfofisiológicas analisadas em isolados de mucuna preta e crotalaria spectabilis obtidos de solos de 13 áreas canavieiras nos estados de AL, PE e PB, região Nordeste do Brasil.

Crescimento rápido também foi uma característica presente em 100% dos isolados de mucuna preta avaliados por Lima et al. (2010) em solos de um sistema agroecológico. Já nas espécies mucuna cinza e anã, estes percentuais foram de 85 e 75% respectivamente. Segundo Chen et al. (2007 e 2008) o gênero *Burkholderia* apresenta como uma das características principais o crescimento rápido. Além deste, outros gêneros como *Rhizobium* e *Sinorhizobium* apresentam crescimento rápido como característica.

Os isolados obtidos na crotalaria apresentaram características menos uniformes. A maioria dos isolados autenticados apresentou tempo de

crescimento entre um e três dias, forma circular, borda inteira, superfície lisa, produção de muco abundante, translúcida, cor creme, muco homogêneo e sem elasticidade. Os resultados divergem dos encontrados por Samba et al. (1999) no primeiro trabalho avaliando diversidade de isolados em espécies do gênero *Crotalaria*. De 117 isolados de 12 espécies de crotalária coletados em diversas regiões do Senegal, 71 foram de crescimento rápido e 46 de crescimento lento. Os autores ainda verificaram que os isolados de crescimento rápido possuíam uma especificidade maior, nodulando apenas com algumas espécies do gênero *Crotalaria*, já os de crescimento lento, eram mais promíscuos, nodulando com outras espécies de *Crotalaria* além de outros gêneros de leguminosas, como *Acacia* e *Indigofera*.

Bratti et al. (2005) avaliaram morfologicamente isolados de rizóbios de cinco espécies de crotalária e encontraram a maioria dos isolados com crescimento rápido, porém acidificando o meio e com tamanho de até 2mm. Segundo os mesmos autores, a *Crotalaria spectabilis* foi a espécie que obteve isolados com as maiores diferenças morfológicas, portanto, nodulavam com uma faixa mais ampla de isolados. Esses resultados diferem dos obtidos nos solos de canaviais utilizados neste trabalho sob o aspecto da reação do meio de cultura, 68% deles mantiveram o pH do meio neutro (Figura 2).

Nosoline et al. (2010) verificaram que de 150 isolados de nódulos de *Crotalaria juncea*, 144 foram de crescimento rápido. Resultado semelhante aos deste estudo, onde a maioria dos isolados de crotalária tiveram crescimento rápido. A crotalária *juncea* é uma espécie que juntamente com a crotalária *spectabilis* é muito utilizada como adubação verde no Brasil. O fato da maioria das características morfológicas serem as mesmas para os grupos de isolados autenticados em mucuna e crotalária pode indicar que estas características são de presença comum às bactérias dessas regiões.

A produção de muco da maioria dos isolados de mucuna e crotalária foi de moderado a abundante. A alta produção de muco pode estar relacionada a uma maior resistência da bactéria às altas temperaturas (Xavier et al., 1998), como é o caso das regiões produtoras de cana-de-açúcar do Nordeste.

O dendrograma das características morfofisiológicas dos 108 isolados de crotalária mostrou a formação de 8 grupos (Tabela 5) e 79 ramos monofiléticos (Apêndice 1).

Tabela 5: Grupos, quantidade de isolados de cada área contido no grupo e quantidade total de isolados em cada grupo formado pelos dendrogramas individuais das características morfológicas de isolados de crotalária *espectabilis* e mucuna preta obtidos em solos de 13 áreas canavieiras nos estados de AL, PE e PB, região Nordeste do Brasil, agrupados pelo método UPGMA usando o Índice de Jaccard como coeficiente de similaridade.

Grupo	Usinas													Total
	Áreas													
	Coruripe					Trapiche			Petribu			Japungu		
	1	2	3	4	5	1	2	3	1	2	3	1	2	
Quantidade de isolados de crotalária <i>espectabilis</i>														
1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	2
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	2
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	2
4	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	2
5	-	-	-	-	-	1	2	-	-	1	-	-	6	10
6	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	2
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	3	4
8	-	-	-	2	-	-	-	1	-	-	-	-	-	3
Quantidade de isolados de mucuna preta														
1	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	5
2	-	-	-	-	-	1	1	2	-	-	-	-	-	4
3	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-	-	-	-	3

O grau de similaridade de 100%, que foi adotado para a formação dos grupos poderia ser responsável por este grande número de grupos com apenas um isolado, no entanto, verifica-se que a partir de aproximadamente 86% de similaridade são formados estes mesmo grupos.

O grupo 5, que conteve 10 isolados, foi o que apresentou maior número, e são originários de três regiões diferentes. Dos 10 isolados, 6 são provenientes da Usina Japungu, 3 são provenientes da Usina Trapiche e 1 isolado da Usina Petribu. Essas três regiões são bastante distantes entre si, como por exemplo, a Usina Japungu e a Usina Trapiche apresentam mais de 200 km de distância uma da outra. Apesar disto, isolados com as mesmas características foram encontrados nestas duas regiões, o que demonstra um

aspecto importante relacionado a uma grande capacidade de adaptação dos isolados pertencentes a este grupo, já que as condições de solo e clima são diferentes. Apesar desses isolados se inserirem no mesmo grupo, não é possível afirmar se pertencem ao mesmo gênero bacteriano.

Em análises morfológicas, os grupos formados pelo dendrograma podem conter bactérias de diferentes localidades, mas não é suficiente para demonstrar proximidade genética. A caracterização morfológica tem se mostrado uma ferramenta útil nas análises iniciais de diversidade microbiana, no entanto, a análise de diversidade através da caracterização genética possui maior precisão para separar grupos geneticamente semelhantes segundo Martins (2011). O mesmo autor avaliou isolados de nódulos de sabiá obtidos em cinco regiões do Nordeste brasileiro. O dendrograma das características morfológicas formou grupos com isolados de diversas regiões por grupo.

O dendrograma das características morfofisiológicas dos isolados de mucuna preta mostrou a formação de 3 grupos (Tabela 5) e 27 ramos monofiléticos (Apêndice 2). O grupo 1, que conteve cinco isolados foi o que apresentou maior número, e todos são originários da Usina Trapiche. De forma semelhante ao que aconteceu com os isolados da crotalária, a formação definitiva dos grupos de isolados da mucuna aconteceu com aproximadamente 86% de similaridade.

A diversidade de isolados que foram autenticados em crotalária foi maior que em mucuna preta. Para os isolados de crotalária foi obtido um índice de Shannon-Wiener de 4,28, enquanto que para os de mucuna o índice foi 3,23 (Tabela 5). Os dois índices são elevados e pode-se considerar que cada uma das culturas nodulou com uma faixa de isolados com características morfológicas bastante diferentes.

Tabela 5: Índices de diversidade de Shannon-Wiener e dominância de Simpson para isolados obtidos em crotalária *espectabilis* e mucuna preta provenientes de solos de 13 áreas canavieiras nos estados de AL, PE e PB, região Nordeste do Brasil.

Índices	Espécies	
	Crotalária <i>espectabilis</i>	Mucuna preta
Diversidade de Shannon-Wiener (H)	4,28	3,23
Dominância de Simpson (D)	0,02	0,05

Estudos de diversidade são importantes na busca por estirpes de rizóbios simbioticamente mais eficientes, que contribuam com nitrogênio tanto para a planta, como para o solo (Jesus et al., 2005; Lima et al., 2009).

Santos et al. (2007) avaliaram a diversidade de isolados de nódulos de leguminosas dos gêneros *Arachis*, *Stylosanthes* e *Aeschynomene*, obtidos de solos das regiões da Zona da Mata, Agreste e Sertão de Pernambuco. Os autores verificaram que os índices de Shannon-Wiener em solos cultivados com amendoim na região da Zona da Mata, que apresenta condições climáticas e de solos semelhantes aos deste trabalho, variaram de 2,12 a 2,18. Enquanto que nos solos do Sertão, os índices variaram de 3,78 em solo de caatinga nativa, até 3,33 em solo cultivado com *Stylosanthes*. Segundo os autores, a menor diversidade nos solos da Zona da Mata poderia ser explicada pela introdução de monocultivos, com uma perturbação maior do solo.

Em outro trabalho, a substituição de pasto formado por *Brachiaria decumbens* por soja resultou em redução da diversidade de rizóbios de feijão guandu (Coutinho et al., 1999). De mesma forma Zilli (2000) verificou redução da diversidade com a substituição de vegetação nativa do cerrado por soja.

Sistemas de cultivo que priorizem a manutenção das características químicas e físicas dos solos podem ter impactos positivos na microbiota. Lima (2009) avaliou isolados de mucuna obtidos em oito solos sob sistema de produção agroecológica. A autora obteve índices de diversidade de Shannon-Wiener entre 3,65 e 4,25, e índice de dominância de Simpson entre 0,05 e 0,10 nas áreas que tinham rotação de culturas entre espécies leguminosas, como crotalária e feijão guandu, e espécies não leguminosas, como o milho.

Os resultados demonstrados sugerem que a implantação de monocultivos têm causado impactos na diversidade rizobiana, mas que eles podem ser reduzidos se algumas características do solo forem preservadas. Apesar dos solos deste estudo serem cultivados com cana-de-açúcar, os resultados dos índices de diversidade de 4,28 para os isolados de crotalária, e 3,23 para os de mucuna, se assemelham aos índices de diversidade de solos com manejos mais ecológicos, provavelmente devido às condições químicas destes solos. Segundo Fierer & Jackson (2006) fatores edáficos como o pH do solo e a disponibilidade de nutrientes também interagem fortemente contribuindo para a diversidade microbiana.

Aliada à diversidade, também houve baixa dominância entre os isolados, com índice de Simpson de 0,02 e 0,05 para isolados de crotalária e mucuna respectivamente (Tabela 5). Apesar da crotalária ter obtido quantidade maior de isolados autenticados, e provenientes de todas as regiões estudadas, o índice de dominância foi semelhante ao obtido pela mucuna. Isto reforça a ideia que a crotalária teve uma capacidade de nodular com uma maior faixa de hospedeiros que a mucuna, provavelmente por ser de mais fácil adaptação que a mucuna, já que solos das mesmas áreas foram utilizados como inóculo nas duas culturas.

A análise conjunta de todos os isolados autenticados nas duas culturas mostrou a formação de grupos distintos entre os isolados de mucuna e crotalária (Tabela 7). Houve a formação de 13 grupos e os grupos com maior número de isolados foram compostos exclusivamente ou por isolados de crotalária ou de mucuna.

Tabela 7: Grupos, quantidade de isolados de cada área contido no grupo e quantidade total de isolados em cada grupo formado pelo dendrograma conjunto das características morfológicas de isolados de *crotalaria spectabilis* e mucuna preta obtidos em solos de 13 áreas canavieiras nos estados de AL, PE e PB, região Nordeste do Brasil, agrupados pelo método UPGMA usando o Índice de Jaccard como coeficiente de similaridade.

Grupo	Áreas												Total	
	Coruripe					Trapiche			Petribu			Japungu		
	1	2	3	4	5	1	2	3	1	2	3	1		2
Quantidade de isolados														
1	-	-	-	-	-	-	5 ^m	-	-	-	-	-	-	5
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2 ^c	-	-	2
3	-	-	-	-	-	-	2 ^c	-	-	-	-	-	-	2
4	-	-	-	-	-	1 ^m	1 ^m	1 ^m	-	-	-	-	-	3
5*	-	-	-	-	-	1 ^m	1 ^c	-	-	-	-	-	-	2
6*	-	-	-	-	-	1 ^m	-	-	-	1 ^c	-	-	-	2
7	-	-	-	-	-	1 ^m	1 ^m	2 ^m	-	-	-	-	-	4
8	-	-	-	-	1 ^c	-	-	-	-	-	-	-	2 ^c	3
9	-	-	-	-	1 ^c	-	-	-	-	1 ^c	-	-	-	2
10	-	-	-	-	-	-	2 ^c	-	-	-	-	-	-	2
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 ^c	-	3 ^c	4
12	-	-	-	-	-	1 ^c	2 ^c	-	-	1 ^c	-	-	6 ^c	10
13	-	-	-	2 ^c	-	-	-	1 ^c	-	-	-	-	-	3

*Grupos formados por isolados provenientes de plantas diferentes;
Espécie de planta que originou o(s) isolado(s): 'm' – mucuna preta e 'c' – *crotalaria spectabilis*.

Apenas dois grupos foram formados por isolados provenientes das duas espécies vegetais, e cada grupo com dois isolados. Mas estas observações podem ter consequências distintas.

O grupo 5 apresentou um isolado de *crotalaria* e um isolado de mucuna, ambos provenientes da Usina Trapiche. Esses dois isolados possuem as mesmas características morfofisiológicas, porém nodularam espécies de plantas diferentes. Isto pode indicar que uma maior diversidade rizobiana presente em um ambiente, também seja capaz de nodular uma variedade maior de leguminosas.

O grupo 6 apresentou um isolado de cada espécie vegetal, porém provenientes de regiões diferentes, com o isolado de crotalária proveniente da Usina Petribu, e o isolado de mucuna originário da Usina Trapiche (Tabela 7). A Usina Petribu está localizada na Zona da Mata Norte do estado de Pernambuco, apresenta solos mais arenosos, média mensal de precipitação de 57,9 mm e umidade relativa de 60,1%. A Usina Trapiche localiza-se na Zona da Mata Sul, apresenta solos mais argilosos, média mensal de precipitação de 151,5 mm e umidade relativa de 77,6%. Este resultado demonstra que isolados que possuam as mesmas características morfológicas podem se adaptar à diferentes condições de solo e clima, e nodularem com espécies vegetais diferentes.

Os grupos 1, 4 e 7 foram compostos por isolados obtidos somente de mucuna, todos da Usina Trapiche, enquanto os grupos 2, 3, e do grupo 8 ao 13 foram formados apenas por isolados de crotalária. Destes, os grupos 3, 10, 12 e 13 possuem isolados da Usina Trapiche. Isto pode indicar comunidades bacterianas distintas que se associam tanto à mucuna quanto à crotalária nesta mesma área, já que isolados de mucuna e crotalária ficaram em grupos diferentes (Tabela 7).

Foram encontradas 3 componentes principais como responsáveis por mais de 79,9% da variância observada nas características químicas, físicas e meteorológicas das áreas (Tabela 8).

Tabela 8: Autovalor, variância e contribuição das características químicas, físicas e meteorológicas nas componentes principais de solos de 13 áreas canavieiras nos estados de AL, PE e PB, região Nordeste do Brasil.

	CP1	CP2	CP3
Autovalor	6,08	4,44	3,07
Variância	35,75	26,12	18,05
pH	0,02	0,95*	-0,07
P	-0,15	0,64	-0,02
Na ⁺	0,59	0,57	0,52
K ⁺	0,91*	0,28	0,00
Ca ²⁺	0,34	0,83*	0,21
Mg ²⁺	0,52	0,73*	0,21
Al ³⁺	-0,02	-0,92*	-0,11
H ⁺ + Al ³⁺	0,39	-0,85*	0,06
CO	0,87*	0,05	-0,14
Areia	-0,95*	0,18	-0,07
Silte	0,89*	0,13	0,17
Argila	0,89*	-0,28	0,03
Dp	-0,18	0,10	-0,06
T máx	0,05	-0,41	0,71*
T mín	-0,18	-0,47	0,46
Precip	-0,08	-0,18	-0,94*
UR	-0,01	-0,13	-0,96*

*Contribuição referente as variáveis que compuseram cada componente principal

A componente principal 1 (CP1) foi composta pelo teor de K, CO, e teores de areia, silte e argila. Essas características foram responsáveis por 35,75% da variância observada entre os solos (Tabela 8).

Na componente principal 2 (CP2) houve uma maior predominância de características químicas, composta por pH, Na, Ca, Mg, Al e H + Al. Esta componente representou 26,12% da variância. A componente principal 3 (CP3) foi formada pela temperatura máxima (T_{máx}), precipitação (Precip) e umidade relativa (UR), e respondeu por 18,05% da variância observada entre as áreas.

Os resultados demonstram que a variabilidade entre as áreas são mais determinadas pelas características físicas e químicas, que pelas características climáticas.

Foram formados cinco grupos baseados nas características químicas, físicas e meteorológicas das áreas (Figura 3). O grupo 1 foi composto por solos de duas áreas da Usina Japungu (J1 e J2). Estes solos apresentam pH abaixo de cinco, além de baixos teores de Ca e Mg (Tabela 1), de acordo com a

contribuição individual de cada variável na componente principal 2 (CP2) indicada na Tabela 7.

O grupo dois foi composto por um solo da Usina Coruripe (C4) e um solo da Usina Trapiche (T3). O grupo três foi formado por três solos da Usina Coruripe (C1, C2 e C3). Todos estes solos possuem semelhanças de pH, Mg e Al (Tabela 1).

Um quarto grupo foi formado por dois solos da Usina Petribu (P2 e P3). Suas maiores semelhanças estão nos teores de Na, CO e silte.

O quinto grupo foi formado por um solo da Usina Coruripe (C5) e um solo da Usina Petribu (P1). Estes solos possuem os mais elevados teores de fósforo, além de valores semelhantes de pH, teor de Al, areia e argila.

Dois solos da Usina Trapiche (T1 e T2) formaram ramos isolados. Apesar de pertencerem a uma mesma usina, as características químicas e físicas destes solos são bastante diferentes. Enquanto o solo T1 é um solo ácido, com pH 4,3, o solo T2 apresentou pH 6,0. Outras características como teor de P de 54,7 mg.dm⁻³ e os teores das bases Na, K, Ca e Mg, respectivamente 0,17; 1,64; 4,5 e 1,61 $\mu\text{molc.dm}^{-3}$ no solo T2, diferem muito dos valores encontrados no solo T1, que foi de 4,3 mg.dm⁻³ para teor de P, e respectivamente de 0,03; 0,11; 0,7 e 0,03 $\mu\text{molc.dm}^{-3}$ para as bases. No entanto, os solos da Usina Trapiche foram os que apresentaram boa parte dos isolados obtidos, tanto em mucuna como em crotalária, como visto na tabela 4. Uma característica que estes dois solos apresentam em comum é ter os maiores teores de CO entre os 13 solos estudados, levando a reforçar que a presença de matéria orgânica contribui muito para a diversidade da população rizobiana.

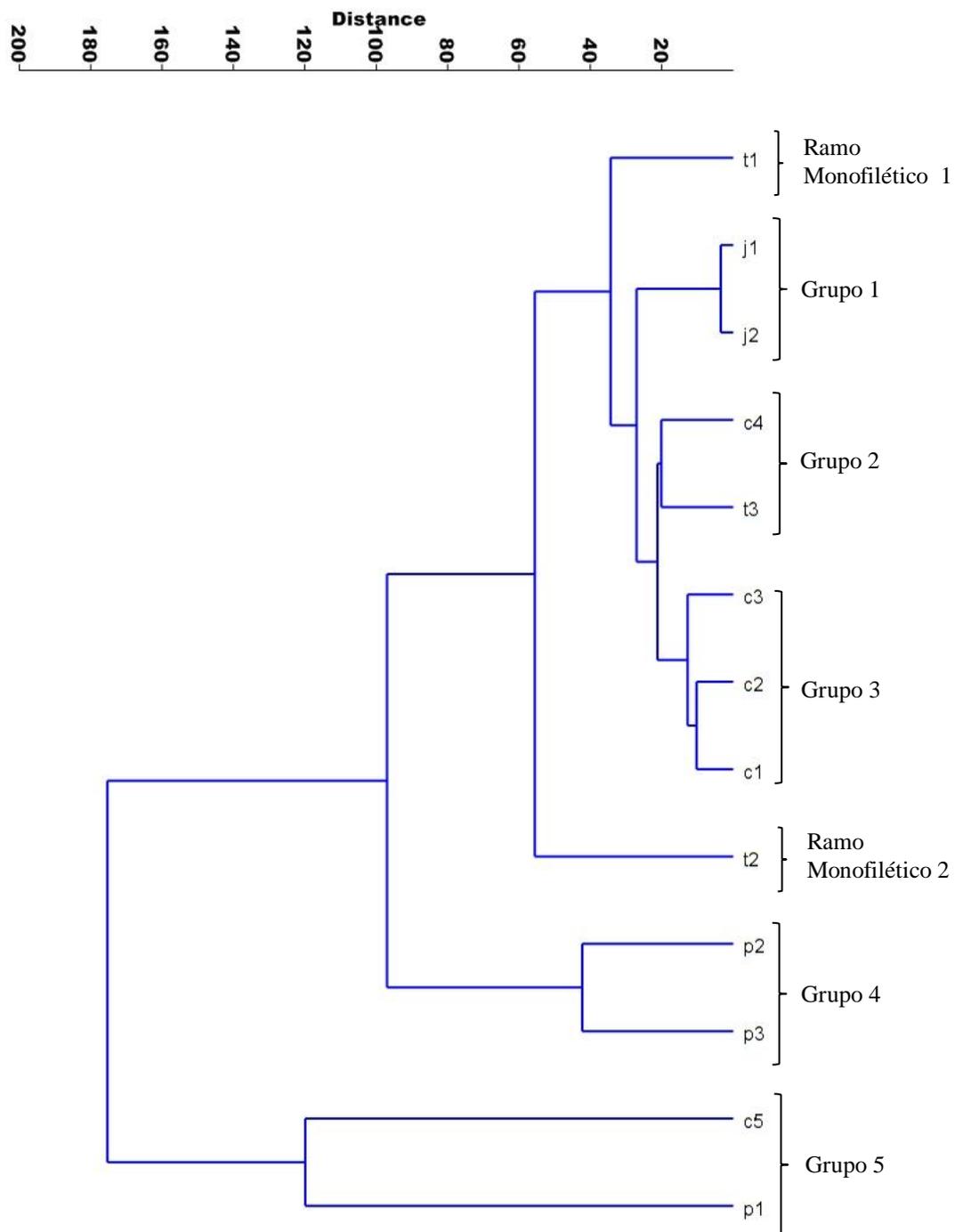


Figura 3: Dendrograma das características químicas e físicas dos solos, e meteorológicas de 13 áreas canvieiras nos estados de AL, PE e PB, região Nordeste do Brasil, agrupadas pelo método das ligações simples usando a distância euclidiana como coeficiente de similaridade.

*Solo coletado nas Usinas Petribu (P), Trapiche (T), Japungu (J) ou Coruripe (C); e valores de 1 a 5 - área da região onde foi coletado o solo.

Não foi verificada associação entre os grupos de isolados formados através dos dendrogramas de similaridade e os grupos de solos formados

baseados nas características químicas, físicas e meteorológicas. Os solos que originaram isolados agrupados morfologicamente, não se agruparam pelas características químicas, físicas e meteorológicas.

Além disso, foram verificadas diferenças entre os índices de diversidade de Shannon-Wiener (Tabela 9), obtidos dos isolados pertencentes a um mesmo grupo de solo definido na figura 3.

Tabela 9: Teste t entre os índices de diversidade de Shannon-Wiener para cada grupo de solos (G) ou ramo monofilético de solo (RM) obtido pela análise de agrupamento das características químicas e físicas dos solos, e meteorológicas de 13 áreas canavieiras nos estados de AL, PE e PB, região Nordeste do Brasil.

Grupo ou ramo monofilético (Índice de Shannon-Wiener)	G2 (1,4675)	G4 (1,2935)	G5 (1,0792)	RM1 (1,2304)	RM2 (1,5102)
G1 (1,0703)	*	*	ns	*	*
G2 (1,4675)		*	*	*	ns
G4 (1,2935)			*	*	*
G5 (1,0792)				*	*
RM1 (1,2304)					*

*Teste t significativo ao nível de 5% de probabilidade; G3 – não apresentou isolado

Essas diferenças demonstram que a diversidade dos isolados pode sofrer influência das características dos solos, no entanto, não se pode afirmar se essas diferenças são mais de origem química, física ou meteorológica das áreas.

Um fato que deve ser levado em consideração é que duas comparações não apresentaram diferenças em seus índices de diversidade. Foram as comparações entre os grupos G1 e G5; e entre o grupo G2 quando comparado com o RM2. Cada uma dessas comparações entre os grupos apresentam solos que são localizados a grandes distância um dos outros, e portanto, ao contrário do que se poderia pensar, a proximidade geográfica não é o fator mais importante para definir a semelhança entre a diversidade rizobiana.

Já foram observadas correlações claras entre espécies rizobianas e condições ecológicas, levando a indicação de que, além da interação rizóbio leguminosa, fatores edáficos também interagem fortemente, como por exemplo, o pH do solo, que contribui como um dos principais fatores para a

diversidade microbiana (Fierer and Jackson, 2006). Já é sabido que os fatores edáficos podem variar grandemente mesmo a pequenas distâncias.

As relações entre as características morfológicas dos isolados e as características químicas e físicas dos solos e meteorológicas das áreas precisam ser estudadas ainda sob o enfoque de outras ferramentas de análise como a biologia molecular, para que melhores conclusões possam ser obtidas sobre estas relações, no entanto, os resultados reforçam a complexidade das relações existentes entre a microbiota do solo, a vegetação local e os fatores edafoclimáticos que interagem nos sistemas agrícolas.

Conclusões

Solos cultivados com cana-de-açúcar em Alagoas, Pernambuco e Paraíba apresentam uma elevada diversidade de isolados que são capazes de nodular *crotalaria spectabilis*, no entanto, esta diversidade não está diretamente relacionada com a diversidade dos solos.

Características químicas e físicas do solos de regiões produtoras de cana-de-açúcar nos estados de Alagoas, Pernambuco e Paraíba são mais determinantes de semelhanças que a proximidade geográfica entre eles.

Referências

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

AMBROSANO, E.J.; AMBROSANO, G.M.B.; AZCÓN, R., CAN TARELLA, H.; DIAS, F.L.F.; MURAOKA, T.; TRIVELIN, P.C.O.; ROSSI, F.; SCHAMMASS, E.A.; SACHS R.C.C. Produtividade da cana-de-açúcar após o cultivo de leguminosas. **Bragantia**, v. 70, p. 8101-818, 2011a.

AMBROSANO, E.J.; TRIVELIN, P.C.O.; CANTARELLA, H.; AMBROSANO, G.M.B.; SCHAMMASS, E.A.; GUIRADO, N.; ROSSI, F.; MENDES, P.C.D. MURAOKA, T. Utilization of nitrogen from green manure and mineral fertilizer by sugarcane. **Scientia Agricola**, v.62, p.534-542, 2005.

AMBROSANO, E.J; CANTARELLA, H.; AMBROSANO, G.M. B.; DIAS, F.L.F.; ROSSI, F.; TRIVELIN, P.C.O.; MURAOKA, T. The role of green manure

nitrogen use by corn and sugarcane crops in Brazil. **Agricultural Sciences**, v. 4, p. 89-108, 2013.

AMBROSANO, E.J.; TRIVELIN, P.C.O.; CANTARELLA, H.; AMBROSANO, G.M. B.; SCHAMMASS, E.A.; MURAOKA, T.; ROSSI, F.; 15N-labeled nitrogen from green manure and ammonium sulfate utilization by the sugarcane ratoon. **Scientia Agricola**. v. 68, p. 361-368, 2011b.

ARAÚJO, R. S. **Caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica do rizóbio**. In: Hungria, M., Araújo, R. S. Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Brasília:Embrapa, 1994.p 157-170.

ASERSE, A.A.; RÄSÄNEN, L.A.; ASEFFA, F.; HAILEMARIAM, A.; LINDSTRÖM, K. Diversity of sporadic symbionts and nonsymbiotic endophytic bacteria isolated from nodules of woody, shrub, and food legumes in Ethiopia. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 97, p. 10117-10134, 2013.

BARRETO, A.C.; FERNANDES, M.F. Recomendações técnicas para o uso da adubação verde em solos de Tabuleiros Costeiros. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2001. 24p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Circular Técnica, 19).

BARRETO,W.O., PAULA,J.L.D., DUARTE,M.N. **Manual de Métodos de Análise de Solos**. Brasília:EMBRAPA, 1997.212 p.

BRATTI, A.E.; XAVIER, G.R.; RUMJANEK, N.G.; MARTINS, C. M.; ZILLI, J. E.; GUERRA, J. G. M.; ALMEIDA, D. L.; NEVES, M. C. P. **Levantamento de rizóbios em adubos verdes cultivados em Sistema Integrado de Produção Agroecológica (SIPA)**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005. 21p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 204).

CALHEIROS, A. S. **Diversidade e eficiência de isolados rizobianos para calopogônio (*Calopogonium mucunoides*) originados de um argissolo sob diferentes coberturas vegetais**. Tese de doutorado. Recife-UFRPE, 2012, 116p.

CHEN, W. M.; FARIA, S. M.; CHOU, J. H.; JAMES, E. K.; ELLIOTT, G. N.; SPRENT, J. I.; BONTEMPS, C.; YOUNG, J. P. W.; VANDAMME, P. *Burkholderia sabiae* sp nov., isolated from root nodules of Mimosa

caesalpiniiifolia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p. 2174-2179, 2008.

CHEN, W. M.; FARIA, S. M.; JAMES, E. K. B.; ELLIOTT, G. N.; SPRENT, J. L.; VANDAMME, P. *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 1055-1059, 2007.

CLARK, F. E. **Rhizobia**. In: BLACK, C. A., EVANS, D. D., WHITE, J. L., ENSMINGER, L. E., CLARK, F. E., DINAUER, R. C. *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties*. Madison:American Society of Agronomy, Inc., 1965.p 1487-1492.

COSTA, J. V. T. **Adubação verde e nitrogênio no desenvolvimento e produção de cana-planta**. Tese de doutorado. Recife, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2009, 99p.

COUTINHO, H.L.C., OLIVEIRA, V.M., MANFIO, G.P.; ROSADO, A.S. Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological innovations. **Anais Academia Brasileira de Ciências** v. 71, p.491-503, 1999.

EMBRAPA **Manual de análises químicas de solos**. Brasília:EMBRAPA, 1999.370 p.

ESPINDOLA, J.A.A.; GUERRA, J.G.M.; ALMEIDA, D.L. **Uso de Leguminosas Herbáceas para Adubação Verde**. In: AQUINO, A.M.; ASSIS, R.L. (orgs). *Agroecologia: princípios e técnicas para uma agricultura sustentável*. Brasília. Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p. 435-451.

FIERER, N.; JACKSON, R. B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 103, p. 626-631, 2006.

FLORES, A.S.; MIOTTO, S.T.S. Aspectos fitogeográficos das espécies de *Crotalaria* L. (Leguminosae, Faboideae) na Região Sul do Brasil. **Acta Botanica Brasileira**, v. 19, p. 245-249. 2005

HOAGLAND,D.R.; ARNON,D.I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley:California Agricultural Experiment Station, 1950.32 p.

HUNG, P. Q.; KUMAR, S. M.; GOVINDSAMY, V.; ANNAPURNA, K. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and cultivated soybean varieties. **Biology and Fertility of Soils**. v. 44, p. 155-162, 2007.

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

HUNGRIA, M. **Coleta de nódulos e isolamento de rizóbios**. In: Hungria, M., Araújo, R. S. Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola. Brasília:Embrapa, 1994.p 45-62.

IBÁÑEZ, F.; ANGELINI, J.; TAURIAN, T.; TONELLI, M. L.; FABRA, A. Endophytic occupation of peanut root nodules by opportunistic Gammaproteobacteria. **Systematic and Applied Microbiology** v. 32, p. 49–55, 2009.

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

KAN, F. L.; CHEN, Z. Y.; WANG, E. T.; TIAN, C. F.; SUI, X. H.; CHEN, W. X. Characterization of symbiotic and endophytic bacteria isolated from roots nodules of herbaceous legumes in Qinghai – Tibet plateau and in others zones of China. **Archives in Microbiology**. V. 188, p. 103-115, 2007.

LI, J. H.; WANG, E. T.; CHEN, W. F.; CHEN, W. X. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China, **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 238–246, 2008.

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

LIMA, A. S.; NÓBREGA, R. S. A.; BARBERI, A.; SILVA, K.; FERREIRA, D. F.; MOREIRA, F. M. D. S. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation

of siratro (*Macroptilium atropurpureum*). **Plant and Soil**, v. 319, p. 127-145, 2009.

LIMA, A.A. Caracterização e seleção de rizóbios de mucuna. Dissertação de mestrado. Rio de Janeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2009, 92p.

LIMA, A.A.; FERNANDES JUNIOR, P.I.; PASSOS, S.R.; NOSOLINE, S. M.; PAULO, F.S.; GUERRA, J.G.M.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R. **Caracterização morfofocultural de rizóbios nativos oriundos de diferentes espécies de mucuna em sistema integrado de produção agroecológico**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2010. 28p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 278).

LIMA, A.A.; FERNANDES JÚNIOR, P.I.; PASSOS, S.R.; PAULO, F.S.; NOSOLINE, S.M.; FARIA, S.M.; GUERRA, J.G.M.; RUMJANEK, N.G.; XAVIER, G.R. Diversidade e capacidade simbiótica de rizóbios isolados de nódulos de Mucuna-Cinza e Mucuna-Anã. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, p. 337-348, 2012.

LIU, X.Y.; WANG, E.T.; CHEN, W.X. Diverse bacteria isolated from root nodules of *Trifolium*, *Crotalaria* and *Mimosa* grown in the subtropical regions of China. **Archives of microbiology**, v. 188, p. 1-14, 2007.

LOMBARDI, M.L.C.O.; MOREIRA, M., AMBRÓSIO, L.A.; CARDOSO, E.J.B.N. Occurrence and host specificity of indigenous rhizobia from soils of São Paulo State, Brazil. **Scientia Agricola**, v. 66, p. 543-548. 2009.

MAÂTALLAH, J., BERRAHO, E. B., MUÑOZ, S., SANJUAN, J., LLUCH, C. Phenotypic and molecular characterization of chickpea rhizobia isolated from different areas of Morocco. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 531-540, 2002.

MARTINS, A. F.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; SAMPAIO, J. A. T.; ARAÚJO, J. H. B.; TURCATEL, A. T.; DIEMER, G. D.; SÁ, E. L. S. Diversidade genética, tolerância aos fatores de acidez e eficiência simbiótica de rizóbios para cornichão de solos do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p. 1855-1864, 2011.

- MARTINS, P. J. **Filogenia e diversidade molecular de sabiá (*Mimosa caesalpinifolia* Benth.) e de bactérias diazotróficas.** Recife-UFRPE. Dissertação de mestrado, 2011, 144p.
- MATEUS, G.P. WUTKE, E.B. Espécies de leguminosas utilizadas como adubos verdes. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 3, 2006, 15p.
- MOURA, T.M.; MANSANO, V.F.; GEREAU, R.; TOZZI, A.M.G.A. *Mucuna jarocho* (Leguminosae-Papilionoideae-Phaseoleae), a new species from Mexico. **Phytotaxa**, v. 89, p. 43–46, 2013.
- NOSOLINE, S. M.; PAULO, F. S.; LIMA, A. A.; LEITE, J.; ARAÚJO, E. S.; GUERRA, J. G. M.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. **Caracterização morfo-cultural de bactérias isoladas de nódulos de espécies de Crotalária. Seropédica:** Embrapa Agrobiologia, 2010. 24p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 276).
- OLIVEIRA, F. H. T.; NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H.; CANTARUTTI, R. B.; BARROS, N. F. Fertilidade do solo no sistema plantio direto. **Tópicos em Ciência do Solo**, v.2, p.393-486, 2002.
- PERIN, A.; GUERRA, J.G.M.; TEIXEIRA, M.G. Cobertura do solo e acumulação de nutrientes pelo amendoim forrageiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, p.791-796, 2003.
- PINHEIRO, C.A.; LEITE, J.; MARTINS, L.M.V.; MISTURA, C.; VIEIRA, P.A.S.; OLIVEIRA, F.A.; LIMA, A.R.S. Perfil morfológico de rizóbio nodulando cunhã (*Clitoria ternatea* L.) em Neossolo Flúvico. **Revista Científica de Produção Animal**, v.12, p.27-30, 2010.
- RENIER, A.; FARIA, S. M.; JOURAND, P.; GIRAUD, E; DREYFUS, B.; RAIPOR, S. Nodulation of *Crotalaria podocarpa* DC. by *Methylobacterium nodulans* displays very unusual features. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 3693-3697, 2011.
- SAMBA, R.T.; LAJUDIE, P.; GILLIS, M.; NEYRA, M.; SPENCER-BARRETO, M.M.; DREYFUS, B. Diversity of rhizobia nodulating *Crotalaria* spp. from Senegal. **Symbiosis**, v. 27, p. 259–268, 1999.
- SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; NEVES, M. C. P.; RUNJANEK, N. G.; BORGES, W. L.; BEZERRA, R. V.; FREITAS, A. D. S. Diversidade de

rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 2, p. 249-256, 2007.

SARAIVA, C. N., LIRA JUNIOR, M. A., STAMFORD, N. P., FREIRE, M. B. G. S., SOUSA, C. A. PRODUÇÃO DO CAUPI (*Vigna unguiculata* L. Walp) SOB EFEITO DE ADUBAÇÃO VERDE E DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 579-587, 2008.

SCHEUER, J.M.; TOMASI, D.B. A crotalaria na adubação intercalar e reforma do cultivo de cana-de-açúcar. **Vivências**, v. 7, p. 81-90, 2011.

SEBBANE, N.; SAHNOUNE, M.; ZAKHIA, F.; WILLEMS, A.; BENALLAOUA, S.; LAJUDIE, P. Phenotypical and genotypical characteristics of root-nodulating bacteria isolated from annual *Medicago* spp. in Soummam Valley (Algeria). **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, p. 235-241, 2006.

SOMASEGARAN,P.; HOBEN,H.J. **Handbook for Rhizobia. Methods in Legume-Rhizobium technology**. New York:Springer Verlag, 1994.

SY, A.; GIRAUD, E.; JOURAND, P.; GARCIA, N.; WILLEMS, A.; DE LAJUDIE, P.; PRIN, Y.; NEYRA, M.; GILLIS, M.; BOIVIN-MASSON, C.; DREYFUS, B. Methylophilic Methylobacterium bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**, v.183, p. 214–220, 2001.

UCHÔAS,E.S.; FARIA,S.M. **Seleção de estirpes de rizóbio para sansão preto (*Mimosa* sp), dormideira comprida (*Mimosa quadrivalis*) e dormideira gigante (*Mimosa* sp). leguminosas florestais com potencial uso na recuperação de áreas degradadas**. Comunicado Técnico 89, 2006.

VINCENT,J.M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford:Blackwell, 1970.164 p.

VINCENT, J. M. **Root-nodule symbioses with *Rhizobium***. In: Quispel, A. The biology of nitrogen fixation. Amsterdam:North-Holland Publishing Company, 1974.p 265-341.

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea, rhizobia population. **Biology and Fertility of Soils**. v. 27, p. 386-392, 1998.

ZILLI, J.E. **Caracterização e seleção de estirpes de rizóbios para inoculação do caupi (*Vigna unguiculata*) em áreas de Cerrado**. Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2000, 126p.

4. Capítulo 2

Eficiência de isolados rizobianos para mucuna preta de diferentes áreas produtoras de cana-de-açúcar do Nordeste brasileiro

RESUMO

A cultura da cana-de-açúcar é uma das principais do agronegócio brasileiro. A utilização de bactérias fixadoras de nitrogênio em leguminosas para adubação verde fornece nitrogênio ao solo. A seleção de bactérias mais eficientes é um processo contínuo que pode contribuir para a redução da utilização de fertilizantes nitrogenados na cana-de-açúcar. O objetivo desse trabalho foi avaliar a eficiência na fixação biológica de nitrogênio de isolados de mucuna preta (*Schizolobium aterrimum*) obtidos em solos de cana-de-açúcar. Foram utilizados 76 isolados obtidos de solos cultivados com cana-de-açúcar dos estados de Alagoas, Pernambuco e Paraíba. A autenticação dos isolados foi realizada em vasos de Leonard contendo uma mistura 1:1 de areia e vermiculita autoclavada. Sementes de mucuna foram pré-germinadas e transplantadas. Em cada planta foi inoculado 5 mL de meio YM com cada isolado. As plantas foram coletadas aos 45 dias para avaliação da presença/ausência de nodulação e da massa seca da parte aérea. As proporções de isolados autenticados e não autenticados e as proporções da massa seca das partes aéreas das plantas autenticadas e não autenticadas foram avaliadas pelo teste do qui-quadrado. A eficiência dos isolados autenticados foi avaliada em sacos plásticos pretos contendo 2L da mistura 1:1 de areia e vermiculita autoclavada. Sementes de mucuna preta foram pré-germinadas e transplantadas. O experimento foi conduzido com 46 tratamentos sendo 39 isolados autenticados na mucuna, multiplicados de forma idêntica ao experimento de autenticação, inoculação da mistura das estirpes Semia 6156/6158, ausência de inoculação, e 5 doses de nitrogênio equivalentes a 30, 60, 90, 120 e 150 kg N ha⁻¹, na forma de uréia com base no volume de substrato no vaso. As plântulas inoculadas receberam 3 mL do inóculo e mais 2mL 30 dias após a primeira inoculação. Aos 56 dias após transplântio as plantas foram coletadas para avaliação da massa seca da parte aérea, número e massa seca de nódulos. O nitrogênio fixado pelos isolados foi estimado com

base na regressão obtida a partir dos tratamentos que receberam nitrogênio mineral. A proporção de isolados autenticados foi maior na área que apresentou as melhores características químicas e de fertilidade. A massa seca da parte aérea e o número de nódulos dos isolados T2.16D e T1.17F foram maiores que a dos demais. Nestes isolados a fixação biológica de nitrogênio foi equivalente respectivamente a 40,25 kg ha⁻¹ e 36,12 kg ha⁻¹ em mucuna preta.

Introdução

A Fixação Biológica do Nitrogênio é realizada por microrganismos denominados diazotróficos, que convertem o nitrogênio atmosférico a uma forma disponível para assimilação pelas plantas. Esse processo constitui-se em um dos principais meios de incorporação do nitrogênio atmosférico ao solo, sendo responsável por cerca de 35% do nitrogênio anualmente fixado na Terra (Canfield et al., 2010).

Leguminosas tropicais comumente possuem a capacidade de nodular com uma ampla faixa de bactérias diazotróficas comumente chamadas de rizóbios. No entanto, o efeito da inoculação com estirpes de rizóbios previamente selecionadas como eficientes pode ser prejudicado, pois frequentemente existem estirpes nativas muito competitivas (Santos, 2001). Neste caso, a seleção de estirpes que privilegie aspectos relacionados a especificidade entre planta e bactéria, a eficiência agrônômica e a adaptação das novas estirpes às características da região poderá otimizar o processo de FBN em leguminosas tropicais (Rumjanek et al., 2006).

Diversas leguminosas são utilizadas como adubo verde. Além da cobertura do solo, melhoria e manutenção da capacidade produtiva dos solos, estas espécies apresentam maior produção de biomassa e maior aporte de N no sistema solo-planta devido à FBN (Espindola et al., 2005; Teodoro et al., 2011), reduzindo ou até eliminando o uso de fertilizantes nitrogenados na cultura subsequente (Crews & Peoples, 2004, Guerra et al., 2007, Silva et al., 2007).

Mucuna preta (*Schizolobium aterrimum*) como adubação verde em cana-de-açúcar vem mostrando bons resultados, mesmo sem haver inoculação da leguminosa (Wutke & Arévalo, 2006; Duarte Junior & Coelho, 2008; Ambrosano et al., 2011), com estimativas de N incorporado ao solo em torno de 162 a 214 kg ha⁻¹ (Oliveira et al., 2002).

Assim, a seleção de rizóbios que nodulam a mucuna preta em solos cultivados com cana-de-açúcar poderá resultar em produção de inoculantes com estirpes adaptadas aos solos e eficientes na FBN, potencializando seu uso como adubo verde.

Diante do exposto o objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência de isolados bacterianos obtidos de nódulos de mucuna preta na fixação biológica de nitrogênio para a espécie.

Material e métodos

A mucuna preta (*Schizolobium aterrimum*) foi avaliada por ser considerada promissora para uso na adubação verde sob condições tropicais (Saraiva et al., 2008).

Foram utilizados neste trabalho todos os isolados autenticados na mucuna preta descritos no capítulo 1.

Análise da autenticação dos isolados

Os resultados do experimento de autenticação descrito no capítulo anterior foram utilizados para verificar a proporção de isolados autenticados e não autenticados em relação ao total de isolados, e da massa seca da parte aérea das plantas que tiveram isolados autenticados e não autenticados em relação a massa seca da parte aérea média em cada área amostral, em cada usina e no total. Essas proporções foram analisadas pelo teste do Qui-quadrado ao nível de 5% de probabilidade.

Teste de eficiência

Os tratamentos foram compostos por 39 isolados autenticados anteriormente, a mistura das estirpes Semia 6156/6158 recomendadas para a espécie (Secretaria de Defesa Agropecuária - Ministério da Agricultura, 2006), bem como da fertilização nitrogenada (30, 60, 90, 120 e 150 kg N ha⁻¹) na forma de uréia calculada com base no volume de substrato utilizado, em adição ao tratamento controle sem fertilização e sem inoculação, perfazendo um total de 46 tratamentos.

O experimento foi conduzido utilizando o delineamento em blocos casualizados com três repetições, totalizando 138 unidades experimentais.

As unidades experimentais foram compostas por sacos plásticos pretos para mudas preenchidos com 2L de uma mistura 1:1 (v/v) de vermiculita e areia lavada autoclavada, e cada um recebeu uma plântula, obtida por quebra de dormência e pré-germinação das sementes como descrito na fase de obtenção dos nódulos (vide capítulo 1).

Cada isolado e as estirpes recomendadas foram multiplicados em meio de cultura YM submetido à agitação horizontal por um período de 72h. Cada planta foi inoculada isoladamente com três mL de meio. Aos 30 dias após o transplântio foi dado um reforço na inoculação, com o fornecimento de 2 mL do mesmo isolado, multiplicado da mesma forma que anteriormente, para cada planta.

Durante o período do experimento todas as plantas receberam 200 mL de solução nutritiva de Hoagland & Arnon sem nitrogênio a cada dois dias. Nos tratamentos nitrogenados as doses de nitrogênio foram preparadas diluindo-se a quantidade de uréia calculada em 300 mL de água destilada. Às plantas designadas para receberem o nitrogênio mineral foram fornecidos 50 mL desta solução de uréia sete dias após a inoculação, e a mesma quantidade semanalmente durante as cinco semanas seguintes, enquanto as plantas não tratadas com nitrogênio receberam 50 mL de água destilada.

Aos 56 dias após o transplântio, as plantas foram coletadas e a parte aérea e a raiz foram separadas. A parte aérea foi acondicionada em sacos de papel, devidamente identificados e colocados em estufa de circulação forçada regulada a 65°C para secagem. Os nódulos foram destacados do sistema radicular, contados, e raiz e nódulos foram separadamente colocados para secar em sacos de papel nas mesmas condições já descritas para a parte aérea. Foram determinados o número de nódulos (NNOD) e massa seca dos nódulos (MSN) e da parte aérea (MSPA) através de pesagem em balança analítica.

Os dados de NNOD, MSN e MSPA foram submetidos à análise de normalidade, presença de outliers e necessidade de transformação utilizando o Guided Data Analysis Procedure do SAS (SAS Institute, 1999). Foi realizada análise de variância e comparação de médias pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade utilizando o software Sisvar.

Foi realizada análise de regressão tomando-se a produção de massa seca da parte aérea das plantas que receberam nitrogênio mineral como

variável dependente e as doses de nitrogênio mineral como variável independente. O modelo obtido foi utilizado para estimar a quantidade de nitrogênio fixado por cada isolado, substituindo a massa seca da parte aérea produzida pelas plantas inoculadas na variável dependente do modelo selecionado. Para a seleção do modelo foi utilizado como critério o maior coeficiente de determinação (R^2) e a significância dos coeficientes. Os resultados de todos os isolados que promoveram fixação maior que 1kg de N ha⁻¹ foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Resultados e discussão

Com exceção da área 2 da Usina Trapiche, não houve diferenças entre as proporções de isolados autenticados e não autenticados das áreas (Tabela 1).

A área 2 da Usina Trapiche obteve 22 isolados, sendo que 15 foram autenticados e 7 não foram autenticados. A proporção de isolados autenticados sobre os não autenticados nesta área foi maior que nas outras áreas ($P=0,0025$; Tabela 1). Já para as áreas 1 e 3, não foi significativa. Na área 1 foram obtidos 17 isolados, sendo que nove foram autenticados e 8 não foram autenticados ($P=0,7236$; Tabela 1), enquanto que na área 3 foram obtidos 26 isolados, desses 14 foram autenticados e 12 não foram autenticados ($P=0,5637$; Tabela 1). Isto demonstra que o solo de origem tem influência na quantidade de isolados autenticados e não autenticados.

O solo da área 2 da Usina Trapiche é o que tem as melhores características químicas e de fertilidade entre todos os solos coletados. Possui pH próximo a neutralidade, maiores teores de K, Ca, Mg e carbono orgânico, e ausência de Al. Apesar dos outros solos da Usina Trapiche estarem próximos, as características químicas e de fertilidade não são as mesmas. Segundo Yates et al. (2004), alterações nas características dos solos podem promover grandes alterações sobre a diversidade microbiana. Os mesmos autores verificaram que a autenticação de isolados por uma mesma espécie de leguminosa variou entre solos semelhantes localizados à pequenas distâncias.

A proporção de isolados autenticados sobre os não autenticados da área 2 da Usina Trapiche também foi maior que nas outras regiões. Apesar de não ser significativa, a proporção de isolados autenticados e não autenticados da

área 1 da usina Petribu apresentou uma tendência a diferirem ($P=0,0832$) reforçando o fato que o local influencia no potencial de obtenção de um isolado formador de nódulo em mucuna preta.

Tabela 1: Qui-quadrado para quantidade de isolados autenticados/não autenticados e razão massa seca da parte aérea (MSPA) de isolados autenticados/não autenticados de plantas de mucuna em experimento de autenticação de isolados obtidos em solos dos estados de AL e PE, região Nordeste do Brasil.

Estado/Região (Usina)	Área	Quantidade de isolados	MSPA
		Probabilidade	
Alagoas (Coruripe)	4	0,4795	0,7620
Pernambuco/Mata Sul (Trapiche)	1	0,7236	0,7833
	2	0,0025	0,8082
	3	0,5637	0,8982
Total	-	0,0342	0,8262
Pernambuco/Mata Norte (Petribu)	1	0,0832	0,2059
Total geral		0,2159	0,9744

Este resultado específico da área 2 influenciou a proporção de isolados autenticados total da usina Trapiche. Apenas esta área apresentou diferença nas proporções, no entanto, o resultado geral para a usina também foi significativo ($P=0,0342$).

As diferenças que existiram entre as áreas para a ocorrência de isolados autenticados não se refletiram da mesma forma na massa seca da parte aérea das plantas. A MSPA das plantas que tiveram isolados autenticados não diferiu das plantas que não tiveram autenticação. Isto aconteceu para cada área, cada usina e no total geral.

O fato da MSPA das autenticadas/não autenticadas não diferir pode estar relacionado ao tempo de duração do experimento, que foi de 45 dias, tempo suficiente apenas para se observar a formação do nódulo. Experimentos de seleção rizobiana normalmente adotam a fase de autenticação apenas para observar se houve ou não a formação do nódulo, buscando eliminar possíveis contaminantes. A observação da nodulação por um isolado comprova que existe grande chance dele ser uma bactéria fixadora de nitrogênio. No entanto, o tempo para a formação do nódulo varia de acordo com a espécie vegetal em estudo. Na fase inicial do experimento foi observado que aos 45 dias após a

inoculação com os solos, as plantas de mucuna já haviam formado nódulos, desta forma, foi adotado o prazo de 45 dias também para a fase de autenticação. Este prazo, porém, não foi suficiente para haver fixação de nitrogênio bastante a ponto de promover alterações na MSPA das plantas com isolados autenticados superiores às plantas que não tiveram isolados autenticados.

Outro aspecto que merece destaque é que nem sempre um isolado autenticado é eficiente na fixação biológica de nitrogênio. Vários trabalhos de seleção de estirpes rizobianas tem início com um número alto de isolados até atingirem a quantidade de uns poucos isolados eficientes promissores para recomendação como inoculante para leguminosas (Date, 1997; Faria & Franco, 2002; Motasso, et al., 2002; Melloni et al., 2006; Nascimento et al., 2009).

Na análise de eficiência dos isolados a MSPA e o NNOD foram influenciados pelos isolados (Tabela 2). Os isolados T2.16D e T1.17F, ambos provenientes da Usina Trapiche, proporcionaram maior MSPA e NNOD que os demais, com MSPA de 7,87 e 7,39g, e NNOD de 42 e 40 respectivamente.

Tabela 2: Massa seca da parte aérea (MSPA) e número de nódulos (NNOD) em plantas de mucuna preta inoculadas com isolados obtidos em solos de 13 áreas canavieiras nos estados de AL, PE e PB, região Nordeste do Brasil.

Isolados	MSPA (g)	NNOD
SEMIA 6156-6158	1,40 b	0,0 b
C4.8A	1,85 b	0,3 b
T1.17C	1,52 b	6,0 b
T1.17D	0,86 b	0,0 b
T1.17F	7,39 a	40,0 a
T1.17G	0,90 b	0,0 b
T1.17I	0,94 b	0,0 b
T1.17M	1,10 b	0,0 b
T1.17Q	1,41 b	1,0 b
T1.17R	1,82 b	4,3 b
T1.17T	2,31 b	3,7 b
T2.16D	7,87 a	42,0 a
T2.19A	0,96 b	0,0 b
T2.19AF	1,04 b	0,0 b
T2.19AG	2,43 b	9,7 b
T2.19C	1,84 b	1,3 b
T2.19E	0,99 b	0,0 b
T2.19H	2,31 b	0,7 b
T2.19I	2,34 b	1,0 b
T2.19O	1,91 b	3,0 b
T2.19P	2,18 b	0,7 b

T2.19T	1,62 b	0,7 b
T2.19U-1	1,06 b	0,3 b
T2.19U-2	1,02 b	0,0 b
T2.19X	1,33 b	1,3 b
T2.19Z	0,78 b	0,0 b
T3.12A	1,48 b	0,3 b
T3.12C	1,13 b	0,0 b
T3.16D	1,45 b	0,3 b
T3.16E	1,25 b	0,0 b
T3.16F	1,12 b	0,0 b
T3.16G	1,12 b	0,3 b
T3.16H	1,02 b	0,0 b
T3.16I	2,00 b	11,0 b
T3.16L	2,37 b	7,7 b
T3.16N	0,03 b	0,0 b
T3.16P	1,18 b	0,7 b
T3.16Q	0,70 b	0,0 b
T3.18F	1,70 b	0,7 b
T3.18G	0,89 b	0,0 b

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott.

A massa seca da parte aérea de mucuna preta variou em função das dosagens de nitrogênio mineral. O modelo quadrático obtido mostrou um aumento na massa seca da parte aérea da mucuna até a dosagem de 106 kg N ha⁻¹ (Figura 1). A estimativa gerada pelo modelo foi confiável, visto que seu coeficiente de determinação foi de 0,88; além dos parâmetros serem significativos.

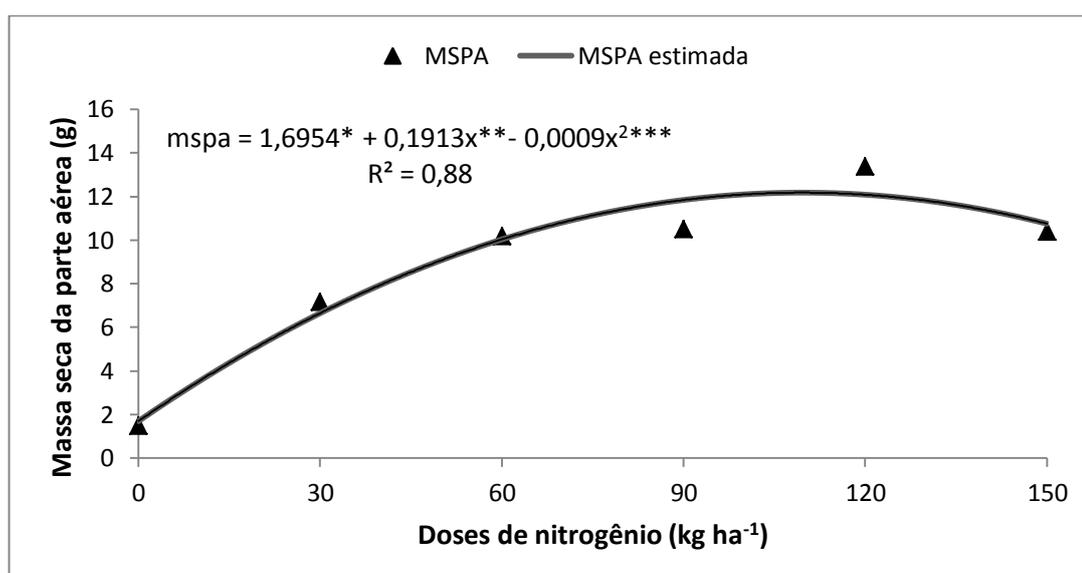


Figura 1: Massa seca da parte aérea de mucuna preta (*Schizolobium aterrimum*) em função de doses de nitrogênio na forma de ureia.

Apenas 11 isolados promoveram fixação de nitrogênio superior a 1 kg N ha⁻¹. A mistura das estirpes Semia 6156/6158 não chegou a fixar mais do que 1 kg N ha⁻¹ nas condições do experimento. Dois isolados promoveram as maiores fixações de N, o isolado T2.16D e o isolado T1.17F, ambos provenientes de solos da Usina Trapiche. A fixação de nitrogênio do isolado T2.16D foi equivalente a 40,25 kg ha⁻¹ e do isolado T1.17F foi estimada em 36,12 kg ha⁻¹. A quantidade de nitrogênio fixado por esses isolados demonstra a existência de isolados eficientes na FBN para adubos verdes em solos cultivados com cana-de-açúcar e se equivale a dose de 40 kg N ha⁻¹ de fertilizante mineral, muito utilizada para cana planta na região Nordeste do Brasil. Todos os outros isolados fixaram menos que 5 kg N ha⁻¹ (Tabela 3).

Tabela 3: Estimativa do nitrogênio fixado por isolados de mucuna preta, obtidos de solos de regiões canavieiras de AL, PE e PB.

Isolados	Nitrogênio fixado (kg ha ⁻¹)
T1.17F	36,12 a
T1.17T	3,79 b
T2.16D	40,25 a
T2.19C	1,14 b
T2.19H	3,78 b
T2.19I	3,61 b
T2.19O	1,22 b
T2.19P	2,80 b
T2.19AG	4,76 b
T3.16I	1,83 b
T3.16L	4,44 b

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A baixa fixação obtida em vários isolados não significa necessariamente que eles sejam ineficientes. Aos 56 dias após transplântio algumas plantas estavam visualmente mudando de coloração de amarelada para verde, sinal da presença do nitrogênio nos tecidos foliares. Esses sintomas visuais foram notáveis após o reforço da inoculação aos 30 dias após o transplântio. Esses

resultados indicam que alguns isolados podem ter efeito tardio, mas que podem ser melhor estudados. A coleta do experimento com um prazo maior iria proporcionar a esses isolados demonstrarem se seriam eficientes na fixação.

Conclusões

Solos sob cultivo de cana-de-açúcar possuem isolados eficientes na FBN para a mucuna preta, que podem beneficiar a espécie com quantidades de nitrogênio equivalente à dose aplicada do fertilizante na cana-de-açúcar.

Os isolados T2.16D e T1.17F são promissores como recomendação de inoculante na mucuna preta para adubação verde.

Referências

AMBROSANO, E.J.; AMBROSANO, G.M.B.; AZCÓN, R., CAN TARELLA, H.; DIAS, F.L.F.; MURAOKA, T.; TRIVELIN, P.C.O.; ROSSI, F.; SCHAMMASS, E.A.; SACHS R.C.C. Produtividade da cana-de-açúcar após o cultivo de leguminosas. **Bragantia**, v. 70, p. 8101-818, 2011.

BARRETO,W.O., PAULA,J.L.D., DUARTE,M.N. **Manual de Métodos de Análise de Solos**. Brasília:EMBRAPA, 1997.212 p.

CREWS, T.E.; PEOPLES, M.B. Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoffs and human needs. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 102, p. 279 – 297, 2004.

DATE, R. A. The contribution of R & D on root-nodule bacteria to future cultivars of tropical forage legumes. **Tropical Grasslands**, v. 31, p. 350-354, 1997.

DUARTE JUNIOR, J.B.; COELHO, F.C. Adubos verdes e seus efeitos no rendimento da cana-de-açúcar em sistema de plantio direto. **Bragantia**, v. 67, p. 123-132, 2008.

EMBRAPA **Manual de análises químicas de solos**. Brasília:EMBRAPA, 1999.370 p.

ESPINDOLA, J.A.A.; GUERRA, J.G.M.; ALMEIDA, D.L. Uso de Leguminosas Herbáceas para Adubação Verde. In: AQUINO, A.M.; ASSIS, R.L. (Orgs). **Agroecologia: princípios e técnicas para uma agricultura sustentável**. Brasília. Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 435-451.

FARIA, S. M.; FRANCO, A. A. **Identificação de bactérias eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies leguminosas arbóreas.** Documentos 158, 2002.

GUERRA, J.G.M.; NDIAYE, A.; ASSIS, R. L. DE; ESPINDOLA, J. A. A. Uso de plantas de cobertura na valorização de processos ecológicos em sistemas orgânicos de produção na região serrana fluminense. **Revista Agriculturas**, v. 4, p. 24-28, 2007.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water-culture method for growing plants without soil.** Berkeley: California Agricultural Experiment Station, 1950. 32 p.

HUNGRIA, M. & CAMPO, R.J. **Fixação biológica do nitrogênio em sistemas agrícolas.** In: Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 30, 2005, Recife. Anais. Recife, 1 CD-ROM, 2005.

MELLONI, R.; MOREIRA, F. M. S.; NOBREGA, R. S. A.; SIQUEIRA, J. O. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 30, p. 235-246, 2006.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 13, DE 24 DE MARÇO DE 2011. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília, 25 de março de 2011.

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

NASCIMENTO, L.R.S.; SOUSA, C. A.; SANTOS, C. E. R. S.; FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, I. M. M. B.; SAMPAIO, E. V. S. B. Eficiência de isolados de rizóbios nativos do agreste paraibano em caupi. **Agrária**, v. 4, p. 36-42, 2010.

OLIVEIRA, F. H. T.; NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H.; CANTARUTTI, R. B.; BARROS, N. F. Fertilidade do solo no sistema plantio direto. **Tópicos em Ciência do Solo**, v.2, p. 393-486, 2002.

RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M.V.; MORGADO, L. B. NEVES, M. C. P. Feijão-Caupi tem uma nova Estirpe de Rizóbio, BR3267, Recomendada

como Inoculante. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. **Boletim de Pesquisa e desenvolvimento**, n.15, 2006, 16p..

SANTOS, C.E.R. S. **Diversidade de rizóbio nativo na Região Nordeste do Brasil capaz de nodular amendoim (*Arachis hypogala*) *Stylosanthes* e *Aeschynomene***. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 174p, 2001. Tese de Doutorado.

SARAIVA, C. N., LIRA JUNIOR, M. A., STAMFORD, N. P., FREIRE, M. B. G. S., SOUSA, C. A. PRODUÇÃO DO CAUPI (*Vigna unguiculata* L. Walp) SOB EFEITO DE ADUBAÇÃO VERDE E DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 579-587, 2008.

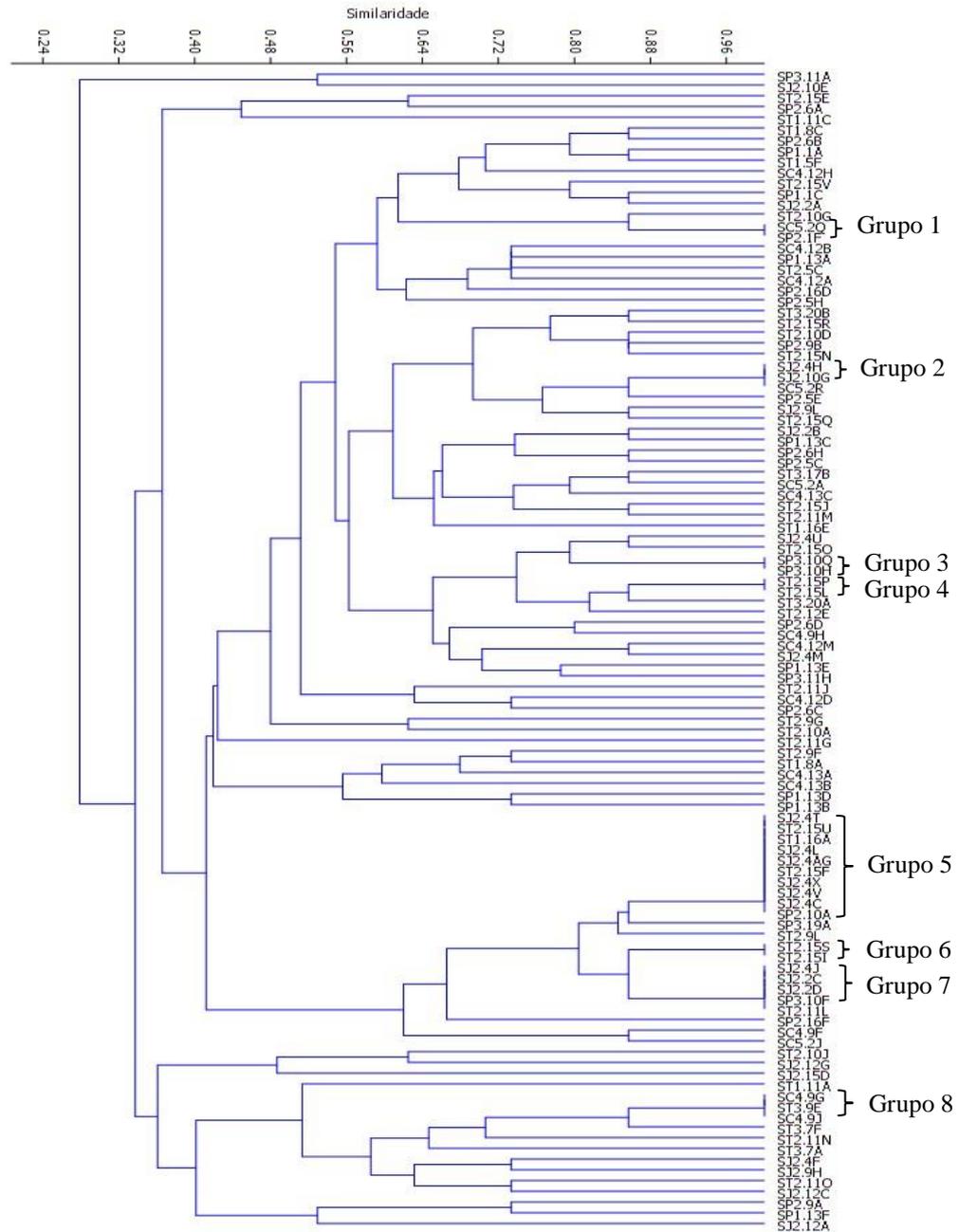
SILVA, G.; LIMA, A.; NOSOLINE, S.; RUMJANEK, N.; XAVIER, G. Seleção de inoculante rizobiano para feijão-de-porco. **Revista Brasileira de Agroecologia**. v. 2, n. 2, p.1232-1235, 2007.

TEODORO, R.B.; OLIVEIRA, F.L.; SILVA, D.M.N.; FÁVERO, C.; QUARESMA, M.A.L. Aspectos agronômicos de leguminosas para adubação verde no Cerrado do Alto Vale do Jequitinhonha. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p. 635-643, 2011.

WUTKE, E.B.; ARÉVALO, R.A. **Adubação verde com leguminosas no rendimento da cana-de-açúcar e no manejo de plantas infestantes**. Campinas: Instituto Agronômico, 2006. Série Tecnologia APTA. 28p. (Boletim Técnico IAC, 198).

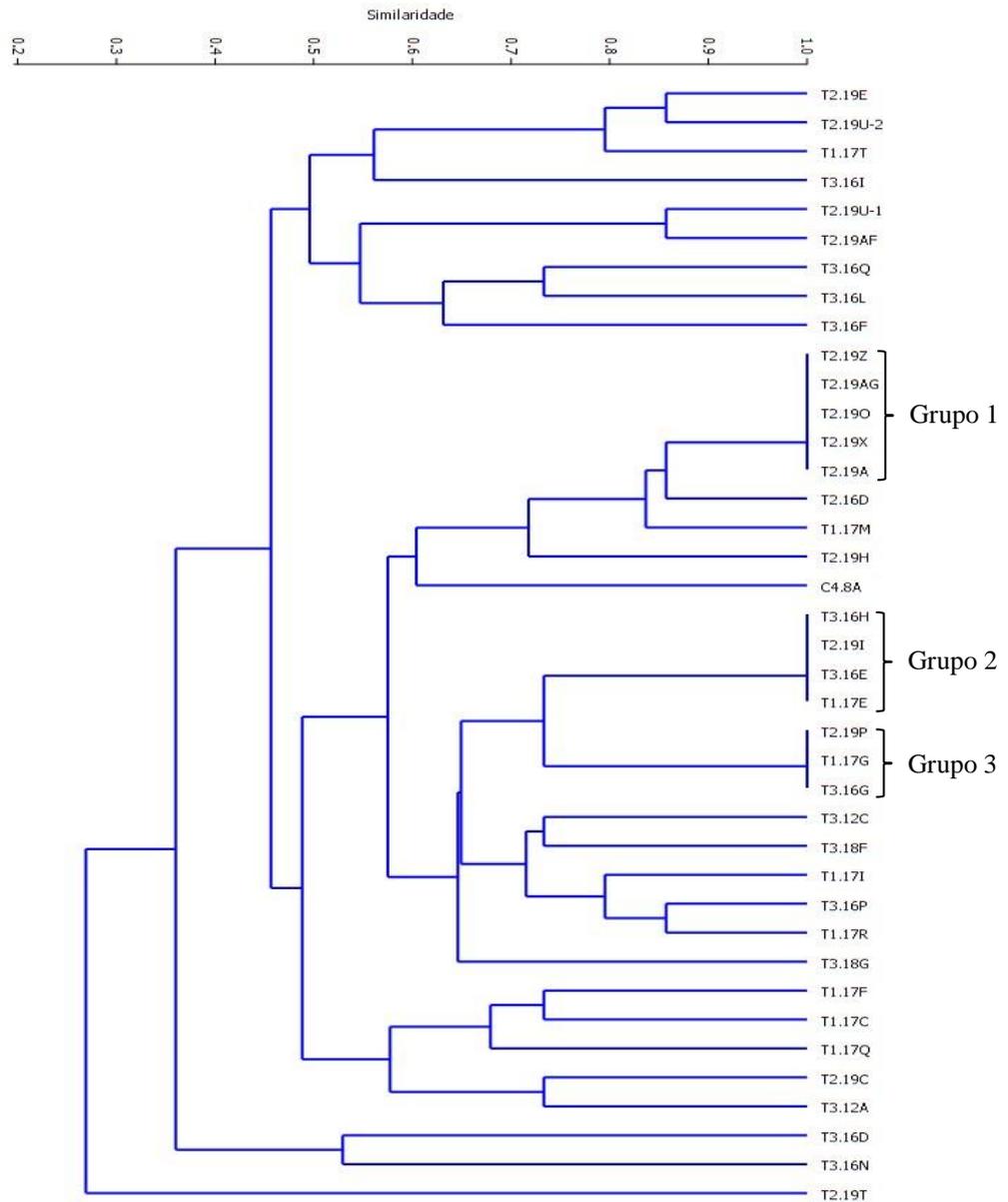
YATES, R.J.; HOWIESON, J.G.; NANDASENA, K.G.; O'HARA, G.W. Root-nodule bacteria from indigenous legumes in the north-west of Western Australia and their interaction with exotic legumes, **Soil Biology & Biochemistry**, v. 36 p. 1319–1329, 2004.

APÊNDICE 1



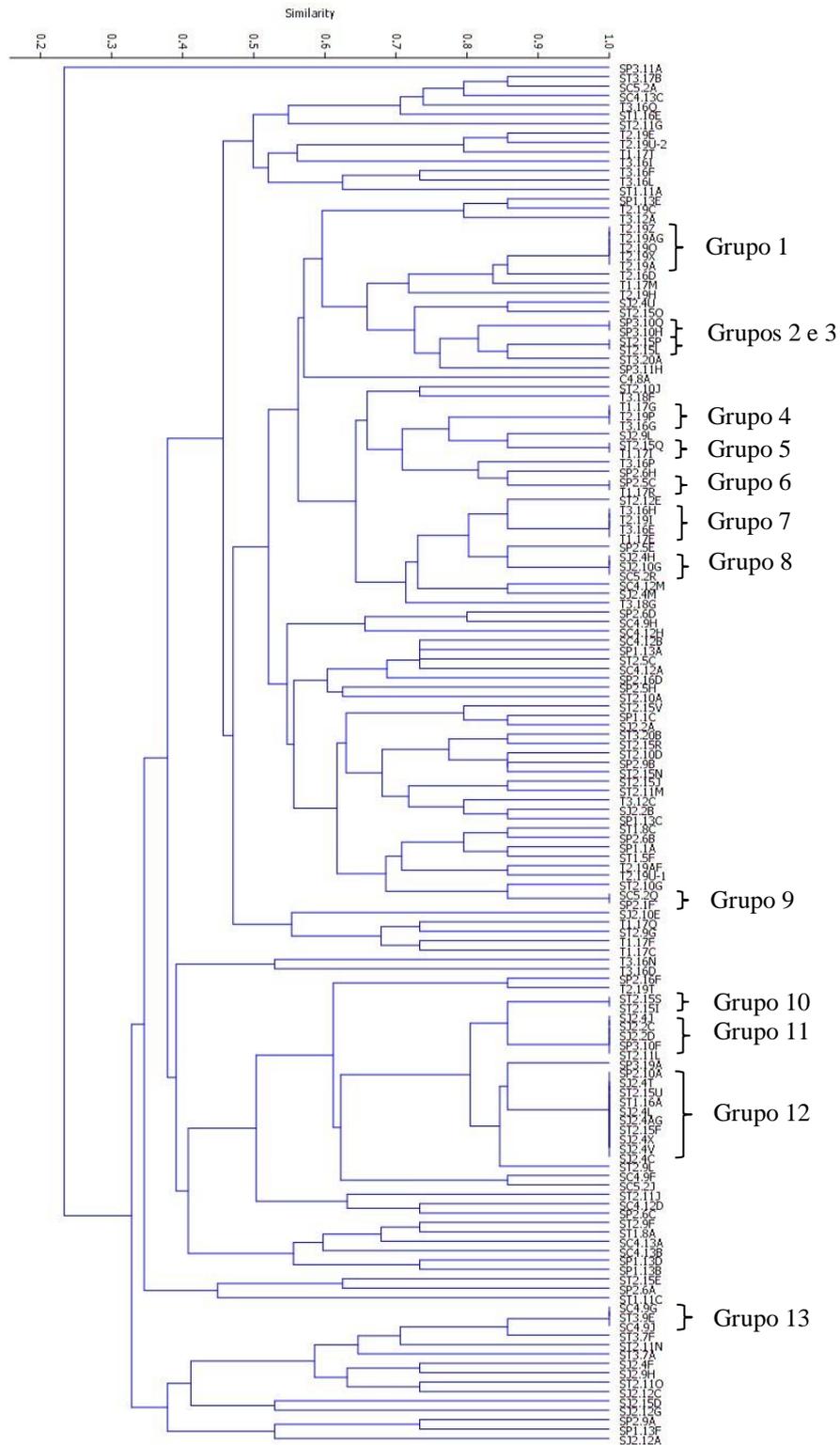
Dendrograma das características morfológicas dos isolados de crotalária *espectabilis* (*Crotalaria spectabilis*) obtidos em solos de 13 áreas canavieiras nos estados de AL, PE e PB, região Nordeste do Brasil, agrupados pelo método UPGMA usando o Índice de Jaccard como coeficiente de similaridade.

APÊNDICE 2



Dendrograma das características morfológicas dos isolados de mucuna preta (*Schizolobium aterrimum*) obtidos em solos de 13 áreas canaveiras nos estados de AL, PE e PB, região Nordeste do Brasil, agrupados pelo método UPGMA usando o Índice de Jaccard como coeficiente de similaridade.

APÊNDICE 3



Dendrograma das características morfológicas dos isolados de mucuna preta (*Schizolobium aterrimum*) e crotalária espectabilis (*Crotalaria spectabilis*) obtidos em solos de 13 áreas canavieiras nos estados de AL, PE e PB, região Nordeste do Brasil, agrupados pelo método UPGMA usando o Índice de Jaccard como coeficiente de similaridade.